

**1- INSTITUTO: DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR -INGEBI.**

2.- CARRERA de: a) Licenciatura en Ciencias Químicas y Cs. Biológicas.  
b) Doctorado y/o post-grado en Cs. Químicas y Cs. Biológicas.

3.- 1er. Cuatrimestre de 1994.

4.- CODIGO DE CARRERA: 01 y 05.

**5.- MATERIA: BIOQUIMICA AVANZADA- REGULACION METABOLICA**

Directora: Dra. Mirtha M. Flawiá.

6.- PUNTAJE PROPUESTO: 5 puntos.

7.- PLAN DE ESTUDIO año 1982 (05).

8.- CARACTER DE LA MATERIA: Optativa.

9.- DURACION: Un cuatrimestre.

10.- HORAS DE CLASES SEMANAL:

a) Teóricas: 12.

b) Problemas: 6.

c) Seminarios: 2

d) Total de horas de laboratorio: 40.

11.- CARGA HORARIA TOTAL: 240.

12.- ASIGNATURAS CORRELATIVAS: Química Biológica - Biología Celular.

13.- FORMA DE EVALUACION: Examen escrito.

14.- PROGRAMA ANALITICO

Nota N° 087 INGERBI

APROBADO POR RESOLUCION CD 739/94. 447695/93 A/16

## PROGRAMA TEORICO

1994

REGULACION DE LAS FUNCIONES ASOCIADAS A MEMBRANAS.  
TRANSDUCCION DE SEÑALES

**Receptores.** Receptores de membranas y acción hormonal. Relación entre binding y actividad biológica. Identificación. Consideraciones generales. Ensayos de binding a células y membranas. Cinética de interacción hormona-receptor. Análisis del steady state. Cooperatividad negativa versus heterogeneidad. Plot de Scatchard. Solubilización de receptores. Purificación. Parámetros moleculares e hidrodinámicos.

**Receptor de insulina.** Generalidades. Ensayo y localización. Modificaciones enzimáticas. Cromatografía de afinidad. Purificación del receptor. Subunidades. Endocitosis. Función de los distintos polipéptidos. Proteínas quinasas de serina y tirosina. Mecanismos de autofosforilación del receptor. Relación con los oncogenes y la transformación celular. Clonado molecular del receptor. Análisis de los diferentes dominios de la secuencia. Homología con factores de crecimiento. Acción de insulina en la transducción de señales.

**Receptores alfa y beta adrenérgicos.** Farmacología. Agonistas y antagonistas. Activación de la Gs de adenilil ciclasa. Interacción receptor-enzima. Purificación. Topografía. Zonas transmembranas. Localización de los sitios de binding. Glicosilación. Fosforilación. Coupling con la adenilil ciclasa. Homología con receptores de rodopsina y muscarínicos. Clonado. Receptores híbridos.

**Receptor del glucagón.** Caracterización. Solubilización. Purificación. Secuenciación.

**Receptores de narcóticos.** Enkefalinas. Endorfinas. Tipos de receptores. Estructura. Segundos mensajeros. Inhibición de la adenilil ciclasa. Mecanismos de analgesia. Relación con hormonas hipofisiarias.

**Receptores de acetil colina.** Muscarínicos y nicotínicos. Estructura y localización. Interacción lípidos-proteínas. Clonado. Zonas transmembranas. Fosforilación. Glicosilación. Unión del ligando. Cooperatividad entre los sitios. Formación del canal iónico. Interacción con la proteína Gi, etc.

## REGULACION DE LA ACCION HORMONAL. NUCLEOTIDOS CICLICOS.

**Adenilil ciclasa.** Localización. Peso molecular de la holoenzima. Características termodinámicas de la reacción. Acción de los nucleótidos sobre la actividad enzimática. efecto el GTP. GTP análogos. F, Al, toxinas, y hormonas. Parámetros hidrodinámicos y moleculares.. Tipos de adenilil ciclasa; clonado, secuenciación, homologías. Filogenia. Interacción con las proteínas G. activadores e inhibidores

**Toxina del cólera.** Receptores. G<sub>Mi</sub>. Estructura de la toxina. Binding de las subunidades. Activación de la adenilil ciclasa. Modelo del receptor móvil. Toxina pertussis. Estructura. Modo de acción. Interacción con subunidades inhibitorias.

**Proteínas G.** Subunidades estimuladoras e inhibitoras (G<sub>s</sub>-G<sub>i</sub>). Subunidades. Criterios para caracterizar una proteína G. Funciones reguladas por G. Estructuras moleculares. Interacciones ligando-proteína G. Receptores-proteína G. Proteína G y efectores. Proteínas G. y membranas. Modificaciones covalentes. ADP ribosilación. Actividad de GTPasa. Diferentes tipos de G (G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>o</sub>, G<sub>p</sub>, etc.). Clonado molecular, zonas de homología de secuencias. Modelo de Halliday. Fusión de membranas. Reconstitución de sistemas. Liposomas. Proteínas G quiméricas.

**Regulación del mecanismo de visión.** Receptor de rodopsina. Transducina. Fosfodiesterasa y guanilato ciclasa. Interacción entre ls distintas subunidades. Retinitis pigmentosa. Mutante rd. Proteínas quinasa de rodopsina. Mecanismos de desensibilización.

**Proteína G y canales iónicos.** Apertura y cierre de canal K<sup>+</sup> y canal Ca<sup>++</sup>. Patch clamps.

**Receptores olfatorios y gustativos.** Regulación. Caracterización y segundos mensajeros. PDE de AMP cíclico. Canales iónicos. G gust.

**Regulación de la contracción muscular.** Proteínas del tejido muscular. Miosina. Actina. Tropomiosina B. Sistema Troponinas. Papel del Ca<sup>++</sup> en la contracción muscular ATPasa Ca<sup>++</sup>. ATPasa de las cabezas de Miosina. Modelos de contracción muscular (Davis, Power stroke, etc.). Transmisión del impulso nervioso. Placa neuromuscular. Muscu,lo liso. Proteínas quinasa y fosforilaciones.

**Fosfolipasas A<sub>2</sub>.** Estructura. Función y regulación.

**Guanilil ciclasa.** Receptores y ligandos relacionados.

**Segundos mensajeros del SNC.** Señales concertadas. Aprendizaje y memoria.

**Sistema del óxido nítrico.** El NO como segundo mensajero. Rol inmunológico. Interacción NO-GMP cíclico. Transducción de señales. Caracterización de la NOS. Guanilil ciclasa soluble.

**Genes ras.** Proteínas target. P21. GTPasa. Localización. Binding de GTP. Expresión de los genes ras en *Escherichia coli*. Mutantes. Relaciones con la adenilil ciclasa, crecimiento celular y fuentes de carbono. Clonado y secuenciación. Genes ras humanos. Proteínas *small G*.

**Adenilil ciclasa en eucariotes inferiores y procariotes.** Control por el AMP cíclico del crecimiento y la diferenciación. Proto y holociclasas. Adenilil ciclasa de *Neurospora crassa*, *Mucor rouxii*, *Trypanosoma cruzi*, etc. Reconstitución de sistemas: receptor G-C. Subunidades homólogas y heterólogas. Anticuerpos monoclonales. Evolución de los distintos componentes proteicos. Adenilil ciclasa de cianobacterias y rizobium. Purificación y caracterización.

**GDF** (globin derived factors). Novel sistema de activación de la adenilil ciclasa de *T. cruzi*. Efecto en la metaciclo génesis.

**Adenilil ciclasa de plantas superiores.** Localización. Purificación. Regulación por Ca y calmodulinas. Proteínas G. Localización. ADP ribosilación. Regulación por la luz. Guanilato ciclasas. Localización, caracterización y regulación por auxinas y citoquininas.

**Proteínas G en plantas.** Tipos de G. ADP ribosilación. Regulación por la luz.

**Señales transmembranas y defectos genéticos.**

#### REGULACION DE LOS NIVELES DE AMP CICLICO.

**Proteínas quinasas y fosfodiesterasas.** Tipos de quinasas. Localización. Estructura. Separación. Rotulación de las subunidades. Quinasas dependientes e independientes de AMP cíclico. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.

**Regulación de las señales extracelulares.** Mecanismos asociados a Ca<sup>2+</sup> y calmodulina. Calmodulina. Estructura y función. Activación de enzimas. Regulación de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>. Hormonas que lo movilizan. Inhibidores del sistema. Turnover de los fosfolípidos del inositol. Ciclo de los inositoles fosfato. Fosfolipasa C: tipos y función.

**Proteína quinasa C.** Rol como señal de superficie. Actividad promotora de tumores. Diacilglicerol. Respuesta celular. Esteres de forbol. MAP quinasas. Relación con otros moduladores de la transducción de señales.

**Proteínas quinasas que fosforilan tirosina.** Sustratos. Interrelación del sistema quinasas de serina, tirosina y treonina. Receptores de factores de crecimiento.

Fosfatasa de proteínas fosforiladas en serina, treonina y tirosina.

## CICLO CELULAR

**Ciclo celular.** Regulación del crecimiento celular. Relación con factores de crecimiento. Sistemas de fosfoinosítidos. Regulación del ciclo en levaduras y células de mamíferos.

**Oncogenes.** Oncogen ras. Src. P53. Jun. Fos. Myc. CREM. CREB. Oncogenes y mecanismos de transformación celular. Actividad transformante de insulina y factores de crecimiento.

## REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES.

**Animales transgénicos.** Introducción de genes heterólogos en animales. Construcción de genes por fusión. Secuencias reguladoras. Promotores. Metalotioneína. Integración de los genes heterólogos en el DNA cromosómico. Inducción de la expresión. Expresión en ratones transgénicos. Metilación de los nuevos genes. Transmisión hereditaria.

**Regulación de la expresión de genes.** Hormona de crecimiento. Promotores. Regulación. Integración. Análisis del DNA-RNA y proteínas de fusión. Inducción de la expresión. Corrección de enfermedades hereditarias. Thy 1, elastasa. Antígenos de SV40; cmyc; cfos; alfa fetoproteína, insulina, gamma y beta globina; protamina, beta lactoglobulina, etc. Regulación de promotores. Terapias génicas. Corrección y obtención de mutantes. Mutagénesis dirigida para suprimir genes en animales transgénicos.

**Regulación de la expresión de genes en plantas.** Agrobacterium tumefaciens. Infección. Plásmido Ti; T-DNA; genes vir. Regulación. Inducción. Siringonas y flavonoides. Proceso de transferencia. Octopinas y nopalinas. Genes marcadores. Genes quimeras. Expresión de genes bacterianos en plantas. Plantas resistentes a plaguicidas, antibióticos e insectos. Clonado de genes lux. Expresión. Genes regulados por fitocromos y luz.

**Regulación de la fijación de nitrógeno.** Simbiosis bacteria-leguminosa. Infección y nodulación. Propiedades y estructura del nódulo. Genes. Bacterioide. Nitrogenasa. Purificación. Cinética de la fijación. Subunidades. Genes que codifican los distintos polipéptidos. Operon nif. Genes regulatorios y estructurales. Glutamino sintetasa. Utilización del NH. Inhibición por el O<sub>2</sub>. Regulación. de la expresión de los genes nif. Mutantes. Genes Fix. Regulación. Interacción con genes  
N i f .                      C l o n a d o                      y                      s e c u e n c i a c i ó n .

**PROGRAMA PRACTICO.**

- Caracterización, purificación y regulación de adenilil ciclasas de eucariotes inferiores y superiores.
- Proteínas G: purificación y caracterización, actividad GTPasa, unión de GTP y ADP ribosilación.
- Reconstitución de sistemas heterólogos R-G-C.
- Transducción de señales en plantas.
- Purificación parcial de quinasaas de proteína C de cerebro. Dependencia de  $Ca^{2+}$  y fosfolípidos.
- Adenilil ciclasa de *T. cruzi*. Activación por péptidos derivados de globina.

**En cada tema se desarrollarán clases de problemas y seminarios.**

## BIBLIOGRAFIA.

- G Protein. Ed. R. Iyenga y L. Birnbaumer. Academic Press (1990).
- Advances in Second Messenger and Phosphoproteins Research. Vol. 27. Ed. Greengard y Robinson, Raven Press (1993).
- Advances in Second Messenger and Phosphoproteins Vol. 25. Ed. Greengard y Robinson, Raven Press (1992).
- Advances in Second Messenger and Phosphoproteins Vol. 26. Ed. Greengard y Robinson, Raven Press (1992).
- Advances in Second Messenger and Phosphoproteins. Vol. 28. Ed. Greengard y Robinson. Raven Press (1994).
- Method in Enzymology, Vol. 195, Johnson y Corbin (1991).
- Gene Expression Technology. Ed. Goeddel. Academic Press (1993).
- Oncogenes and the Molecules Oncogenes of Cancer. Weinberg, R. Cold Spring Harbor Lab. Press (1989).
- Reconstitution of an hormone-sensitive adenylate cyclase with membrane extracts from *Neurospora crassa* and avain erythrocytes. Flawiá, M.M., Kornbliht, A.R., Reig, J.A. and Torres, H.N. *J. Biol. Chem.* 258, 8255 (1983).
- Transgenic Animals. Jaenisch, R. *Science* 240, 1462 (1988).
- Transmembrane signalling to adenylate cyclase in mammalian cells and in *Sccharomyces cerevisiae*. A. Levitzki. *TIBS* 13, 298 (1988).
- The G-protein of retinal rod outer segments (Transducin). Nelly Bennett and Yves Dupont. *J. Biol. Chem.* 260, 4156-4168 (1985).
- *Trypanosoma cruzi* adenylate cyclase activity. Purification, characterization and preparation of monoclonal antibodies. Torruella, M. Flawiá, M.M., Eisenschlos, C., Molina y Vedia, L., Rubinstein, C. y Torres, H.N. *Biochem. J.* 234, 145 (1986).
- Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase with membranes from rat liver and *Trypanosoma cruzi*. Flawiá, M.M., Torruella, M., Eisenschlos, C., y Torres, H.N. *Biochem. B.J.* 236, 185 (1986).

- Evidence for the existence of an Ns type regulatory protein in *Trypanosoma cruzi* membranes. Eisenschlos, C., Paladini, A., Molina y Vedia, L., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. *Biochem. J.* **237**, 913 (1986).
- Studies and perspectives of protein kinase C. Nishizuka, Y. *Science* **233**, 305-312 (1986).
- G proteins and dual control of adenylate cyclase. Alfred G. Gilman. *Cell* **36** (3), 577-579 (1984).
- Message transmission: Receptor controlled adenylate cyclase system. Michael Schram and Zvi Selinger. *Science* **225**, 1350-1356 (1984).
- Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase system, the pure  $\beta$ -adrenergic receptor and guanine nucleotide regulatory protein confers hormone responsiveness on the resolved catalytic unit. Richard A. Cerione, David R. Sibley, Juan Codina, Jeffrey L. Benovic, John Winslow, Eva J. Neer, Lutz Birnbaumer, Marc G. Caron and Robert J. Lefkowitz. *J. Biol. Chem.* **259** (16), 9979-9982 (1984).
- The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nishizuka, Y. *Nature* **308**, 693 (1984).
- Adenylyl Cyclases. Wei-Jen Tang and Alfred G. Gilman. *Cell* **70**, 869-872 (1992).
- Receptor-to-Effector Signaling through G Proteins: Roles for  $\beta\gamma$  Dimers as well as  $\alpha$  Subunits. Lutz Birnbaumer. *Cell* **71**, 1069-1072 (1992).



Dr. HECTOR N. TORRES  
Director  
INCEBI - CONICET



Dra. MARIHA MARIA FLAWIA  
PROFESORA ASOCIADA  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
INGEBI - CONICET

Marzo/94.