

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

U.B.A.



INGEBI 2000

1

1.- INSTITUTO: de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular -
-INGEBI-

2.- CARRERA de: a) Licenciaturas en Cs. Químicas y Cs. Biológicas

b) Doctorado y/o Post-grado en Cs. Químicas y Cs. Biológicas

3.- 1er. Cuatrimestre de 2000.

4.- CODIGO DE CARRERA: 01 y 05.

5.- MATERIA: **BIOQUIMICA AVANZADA - REGULACION METABOLICA**
(Cód. 6076)

6.- PUNTAJE PROPUESTO: 5 puntos.

7.- PLAN DE ESTUDIO: Año 1984 (01) y 1987 (05).

8.- CARACTER DE LA MATERIA: Optativa

9.- DURACION: Un cuatrimestre.

10.- HORAS DE CLASES SEMANAL:

a) Teóricas: 8.

b) Problemas: 2.

c) Laboratorio: 40.

d) Seminarios: 2.

e) Teórico-problemas: -

f) Teórico-prácticas: -

g) TOTAL HORAS: 12.

11.- CARGA HORARIA TOTAL: 240.

12.- ASIGNATURAS CORRELATIVAS: Química Biológica.

13.- FORMA DE EVALUACION: Examen escrito.

14.- PROGRAMA ANALITICO:

Pro. BEATRIZ S. MENDEZ
DIRECTORA
Dpto. QUIMICA BIOLOGICA
F.C.E. y N. - UBA

PROGRAMA TEORICO

- **Proteínas. Purificación.** Aminoácidos y polipéptidos. Estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Disociación. Monómeros y polímeros. Purificación de proteínas. Distintos tipos de resinas. Filtración por geles. Intercambio iónico. Ultracentrifugación. Parámetros moleculares e hidrodinámicos. Cromatografía de afinidad. Secuenciación de péptidos. Síntesis de péptidos. E.L.I.S.A.

2 - **Enzimas.** Cinética de Michaelis. Inhibidores competitivos y no competitivos. Sitios activos. Tipos de enzimas. Proteasas. Nucleasas. Lipasas, etc. Enzimas alostéricas. Plot de Hill. Modelos de Monod y Koshland, etc.

3 - **Membranas biológicas.** Estructura. Fosfolípidos. Modelos de membranas.

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

5 - **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 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.

6 - **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.

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

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



Dr. BEATRIZ S. MENDEZ
DIRECTORA
Dpto. QUIMICA BIOLÓGICA
F.C.E. y N. - UBA

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

10 - **Regulación de la acción hormonal. Nucleótidos cíclicos.** Adenilil ciclasa. Localización. Características termodinámicas de la reacción. Acción de los nucleótidos sobre la actividad enzimática. Efecto del GTP. GTP análogos, toxinas y hormonas. Parámetros hidrodinámicos y moleculares. Tipos de adenilil ciclasa; clonado, secuenciación, homologías. Genes quiméricos. Dominios catalíticos y regulatorios. Filogenia. Interacción con las proteínas G. Activadores e inhibidores. Estructura molecular de la enzima. Proteínas truncadas.

11 - **Toxina del cólera.** Receptores. G_{Mi} . 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.

12 - **Proteínas G.** Subunidades estimuladoras e inhibitoras (G_s - G_i). Subunidades. Criterios para caracterizar una proteína G. Funciones reguladas por G. Estructuras moleculares. Interacciones ligando-proteína G. Receptores proteína G. Proteínas G y efectores. Proteínas G y membranas. Modificaciones covalentes. ADP ribosilación. Actividad de GTPasa. Diferentes tipos de G (G_s , G_i , G_o , G_p , etc.) Clonado molecular; zonas de homología de secuencias. Fusión de membranas. Reconstitución de sistemas. Liposomas. Proteínas G quiméricas. Interacciones con receptores, efectores y subunidades.

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

14 - **Proteína G y canales iónicos.** Apertura y cierre de canal K^+ y canal Ca^{++} . Patch clamps. Receptores olfatorios y gustativos. Regulación. Caracterización y segundos mensajeros. PDE de AMP cíclico. Canales iónicos. G gust.

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


16 - **Regulación de la contracción muscular.** Proteínas del tejido muscular. Miosina. Actina. Tropomiosina. B. Sistema troponinas. Papel del Ca^{++} en la contracción muscular ATPasa Ca^{++} . ATPasa de las cabezas de miosina. Modelos de contracción muscular (davis, Power stroke, etc.). Transmisión del impulso nervioso. Placa neuromuscular. Músculo liso. Proteínas quinasas y fosforilaciones.

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


Dra. BEATRIZ S. MENDEZ
DIRECTORA
Dpto. QUIMICA BIOLÓGICA
F.C.E. y N. - UBA



- 18 - **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.
- 19 - **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.
- 20 - **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.
- 21 - **GDF (globin derived factors).** Novel sistema de activación de la adenilil ciclasa de *T. cruzi*. Efecto en la metaciclogénesis.
- 22 - **Adenilil ciclasa de plantas superiores.** Localización. Purificación. Regulación por Ca y calmodulinas. Proteínas G. ADP ribosilación. Regulación por la luz. Guanilato ciclasas. Localización, caracterización y regulación por auxinas y citoquininas.
- 23 - **Proteínas G en plantas.** Tipos de G. ADP ribosilación. Regulación de la luz.
- 24 - **Señales transmembranas y defectos genéticos.**
- 25 - **Regulación de los niveles de AMP cíclico.** Proteínas quinasas y fosfodiesterasas. Tipos de quinasas. Localización. Estructura. Separación. Titulación de las subunidades. Quinasas dependientes e independientes de AMP cíclico. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.
- 26 - **Regulación de las señales extracelulares.** Mecanismos asociados a Ca^{+2} y calmodulina. Calmodulina. Estructura y función. Activación de enzimas. Regulación de la concentración intracelular de Ca^{+2} . Hormonas que lo movilizan. Inhibidores del sistema. Ciclo de los inositoles fosfato. Fosfolipasa C: tipos y función.
- 27 - **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. Sustrato. Interrelación del sistema quinasas de serina, tirosina y treonina. Receptores de factores de crecimiento.
- 28 - **Fosfatasa de proteínas.**


Dra. BEATRIZ S. MENDEZ
DIRECTORA
Dpto QUIMICA BIOLÓGICA
F.C.E. y N. - UBA



29 - Ciclo celular. Regulación del crecimiento celular. Relación con factores de crecimiento. Sistemas de fosfoinosítidos. Regulación del ciclo en ovocitos de *Xenopus*, levaduras y células de mamíferos. Ciclinas. Caracterización y participación en las distintas etapas del ciclo. Ubiquitinación de ciclinas. Sustratos de p34. Regulación del ciclo por Rb.

30 - Oncogenes. Oncogenes ras, Src, P53, fos, jun, myc, CREM-CREB. Mecanismos de transformación celular. Actividad transformante de insulina y factores de crecimiento.

31 - Regulación de la expresión de genes. Animales transgénicos. Introducción de genes heterólogos en animales. Construcción de genes por fusión. Secuencias reguladoras. Promotores. Producción de ratones transgénicos. Metilación de los nuevos genes. Transmisión hereditaria. Análisis de la expresión de genes en ratones transgénicos. Modelo de ratones transgénicos para el estudio de fisiopatologías humanas. Oncogénesis dirigida: expresión de oncogenes en ratones transgénicos y estudio del desarrollo de tumores. Ratones transgénicos y genes que participan en el desarrollo embrionario y en la diferenciación celular. Modelo de animales transgénicos para uso de la farmacología experimental: MDR, beta adrenérgicos, anemias, hipercolesteronemias, epilepsia, hemofilia, etc.

32 - "Knock-out" de genes. Células embrionarias totipotentes. Producción de ratones mutantes como modelo de estudio de enfermedades genéticas hereditarias. "Knock-in" de genes. "Knock-out" condicionales: espacial y temporal.

33 - Animales de granja transgénicos. Producción de proteínas recombinantes de interés económico en la leche de animales transgénicos. Producción de cerdos transgénicos: xenotransplantes. Clonado de animales de granja.

34 - 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. Promotores y expresión de genes heterólogos en plantas. Plantas transgénicas. Resistencia a plaguicidas, antibióticos e insectos. Clonado de genes. Genes regulados por fitocromos y luz.

35 - Regulación de la fijación de nitrógeno. Simbiosis bacteria-leguminosa. Infección y nodulación. Propiedades y estructura del nódulo. Genes. Bacterioide. Nitrogenasas. Purificación. Cinética de la fijación. Subunidades. Genes que codifican los distintos polipéptidos. Operon nif. Genes regulatorios y estructurales. Glutamino sintetasa. Utilización del NH₄. Inhibición por el O₂. Regulación de la expresión de los genes nif. Mutantes. Genes Fix. Regulación. Interacción con genes Nif. Clonado y secuenciación.

D^{CA} BEATRIZ S. MENDEZ
DIRECTORA
Dpto QUIMICA BIOLÓGICA
F.C.E. y N. - UBA



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.

15.- BIBLIOGRAFIA

"Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenyl cyclase by an α D-globin fragment from *Triatoma hindgut*: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms". Fraidenaich, D., Peña, C., Isola, E., Lammel, E., Coso, O., Díaz Añel, A., Pongor, S., Baralle, F., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10140-10144 (1993).

"The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*". Paveto, C., Pereira, C., Espinosa, J., Montagna, A., Farber, M., Esteva, M., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. *J. Biol. Chem.* **270**, 16576-16579 (1995).

"Structure and function of voltage-gated ion channels". Catterall, W.A. *Ann. Rev. Biochem.* **64**, 493-531 (1995).

"PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface". Lemmon, M.A., Ferguson, K., y Schlessinger, J. *Cell* **85**, 621-624 (1996).

"TRP: Its role in phototransduction and store-operated Ca^{2+} entry". Friel, D. *Cell* **85**, 617-619 (1996).

"Calcium spiking in plant root hairs responding *Rhizobium* nodulation signals". Ehrhardt, D., Wais, R., y Long, S. *Cell* **85**, 673-681 (1996).

"Effects of nod factors on alfalfa root hair Ca^{++} and H^{+} currents and cytoskeleton behavior". In advances in Molecular Genetics of plant-micobe interactions. Danies, M., Downie, J., y Osborne, A., eds., pp 107-114 (1994).


Dra. BEATRIZ S. MENDEZ
DIRECTORA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLÓGICA
F.C.E. y N. - UBA



"Structure and biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipo-oligosaccharide nodulation signals". Atkinson, E., PhD thesis, Stanford University, Stanford, California (1994).

"Chemoperception of microbial signals in plant cells". Boller, T. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214 (1995).

"Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome signal transduction". Bowler, C., Nauhaus, G., Yamaguta, H. y Chua, N. *Cell* **77**, 73-81 (1994).

"Calcium regulation in plant cells and its role in signaling". Bush, D. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 95-122 (1995).

"Calcium signaling". Clapham, D. *Cell* **80**, 259-268 (1995).

"Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*". *Planta* **171**, 289-301 (1987).

"Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors". Ehrhardt, D., Atkinson, E. y Long, S. *Science* **256**, 998-1000 (1992).

"In vitro sulfotransferase activity of NodH, a nodulation protein of *Rhizobium meliloti* required for host-specific nodulation". Ehrhardt, E., Atkinson, E., Faul, K., Freedberg, D., Sutherlind, D., Armstrong, R., y Long, S. *J. Bacteriol.* **117**, 6237-6245.

- Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase system, the pure β -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).

- Mutant "ras" proteins and cell transformation. Rob Newbold. *Nature* **310**, 628-629 (1984).

- The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nishizuka, Y. *Nature* **308**, 693 (1984).

- Regulatory protein. Miles D. Houslay. *Trends Biochem. Sci.*, vol. 9, 39-40 (1984).

- Activation of *Neurospora crassa* soluble adenylate cyclase by calmodulin. Reig, J.A., Téllez-Iñón, M.T., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. *Biochem. J.* **221**, 541 (1984).


- Characterization of *Neurospora crassa* cAMP phosphodiesterase activated by calmodulin. Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R., Torruella, M. y Torres, H.N. *Mol. Biochem. Parasitol.* **17**, 143 (1985).


Dra. BEATRIZ S. MENDEZ
DIRECTORA
Dpto. QUÍMICA BIOLÓGICA
F.C.E. y N. - UBA

4



- Calmodulin and Ca^{2+} -dependent cyclic AMP phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R., Torruella, M. y Torres, H.N. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 143 (1985).
- The G-protein of retinal rod outer segments (Transducin). Nelly Bennett and Yves Dupont. *J. Biol. Chem.* 260, 4156-4168 (1985).
- Involvement of circular intermediates in the transfer of T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. Konkilikova, Z., Wang, K., Van Montagu, M. and Zembryski, P. *Nature* 313, 193 (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. 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, J., 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).
- A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with maize gene. Meyer, P., Forkmann, G. y Saedler, H. *Nature* 330, 667 (1987).
- Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. Koncz, C., Olsson, O., Landridge, W., Szdey, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 131 (1987).
- Did vertebrate signal transduction mechanisms originate in eukaryotic microbes. Jansses, P. *TIBS* 12, 457 (1987).
- Regulation of ciliary adenylate cyclase by Ca^{2+} in Paramecium. Justin, M. and Nelson, D. *Biochem. J.* 246, 337 (1987).
- Hormone genes and crown gall disease. *TIBS* 12, 271 (1987).
- G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 615 (1987).
- The multiple membrane spanning topography of the α_2 adrenergic receptor. Dohlman, H., Benovic, J., Caron, M. y Lefkowitz, R., *J. Biol. Chem.* 262, 14282 (1987).


Dña. BEATRIZ S. MENDEZ
DIRECTORA
Dpto. QUÍMICA BIOLÓGICA
F.C.E. y N. - UBA



- Molecular basis of transmembrane signal transduction in *Dictyostelium discoideum*. Janssens, P., Van Haasterb, P. *Microbiological Reviews*, vol. 51, 396 (1987).
- The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. *Science* 241, 42-52 (1988).
- Cellular regulators. *Methods in Enzymol.* 139 Eds. A.R. Means and Conn. P.M. (1987).
- Heart and bone tumors in transgenic mice. Behringer, R., Peschon, J., Messing, A., Garside, C., Palmiter, R. and Brinster, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2648 (1988).
- Receptor classes and the transmitter gated ion channels. Barnard, E. *TIBS* 17, (1992).
- G protein-coupled receptors. Shine et al. *Current in Cell Opinion* 4, (1992).
- Rhodopsin of the rod cell. *J. Biol. Chem.* 267 (1992).
- On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *TIBS* 18 (1993).

Fecha 23 Nov. 1999

Firma Profesor Mirtha M. Flawia

Firma Director [Signature]

Aclaración firma

Sello aclaratorio **Dra. BEATRIZ S. MENDEZ**
DIRECTORA
Dpto QUIMICA BIOLOGICA
F.C.E. y N. - UBA

Dra. Mirtha M. Flawia
Profesor Titular
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
U.B.A.

4