

14. PROGRAMA ANALITICO

PROGRAMA TEORICO-PRACTICO

Teoría y metodología general de la modificación química y mutagénesis sitio-dirigida de proteínas. Reactivos de grupos y marcadores de afinidad. Complementación del uso de mutagénesis dirigida y modificación química. Uso de la modificación química y de la mutagénesis sitio-dirigida como herramienta para dilucidar la relación entre estructura y función de proteínas. Ejemplos: proteína quinasa A de mamíferos y ADP-glucose pirofosforilasa de bacterias, algas y plantas superiores. Uso industrial de enzimas modificadas.

Identificación de los sitios regulatorios alostéricos de la ADP-glucosa pirofosforilasa de *E. coli* a través de modificación química.

Caracterización cinética de la activación de la ADP-glucosa pirofosforilasa (purificada a partir de *E. coli*) por medio de fructosa-1,6-P₂ y PLP. Empleo de fosfato de pirodoxal como marcador de afinidad de la ADP-glucosa pirofosforilasa. Interacción de estos activadores con el inhibidor fisiológico AMP. Modificación química covalente de la enzima por medio de PLP a través de la piridoxilación reductiva. Caracterización de la enzima modificada y comparación de sus propiedades con las de la enzima nativa. Efectos de los sustratos, activadores e inhibidores en la modificación de la proteína. Marcación con [³H]PLP, digestión triptica y fraccionamiento de los péptidos por HPLC (high pressure liquid chromatography).

Determinación espectrofotométrica de actividades enzimáticas y concentración de metabolitos involucrados en síntesis de sacarosa.

Medición de actividad enzimática y contenido de metabolitos en hojas de tabaco como modelo. Comparación de la actividad enzimática en hojas mantenidas en oscuridad.

Mutagénesis sitio-dirigida (método de Eckstein) de la enzima ramificante de maíz.

Selección de sitios para la mutagénesis en base a la información disponible en la literatura y bancos de datos. Expresión de las enzimas ramificantes de maíz en la bacteria *E. coli*, selección de vectores adecuados, uso de la reacción en cadena catalizada por la Taq polimerasa para la síntesis del fragmento de cDNA a integrar en el vector. Comparación de la secuencia de aminoácidos de las enzimas ramificantes de varias especies vegetales, bacterias y de otras enzimas involucradas en la hidrólisis de α -glucosa (amilasas, isoamilasas, pululanases, enzima derramificante de glucógeno) en diversos organismos. Uso de computación y modelos moleculares en la comparación de estructuras enzimáticas. Estudio detallado de la estructura de los glucanos producidos por el cultivo bacteriano como resultado de la acción de la proteína recombinante, comparación con el glucógeno bacteriano y la amilopectina presente en el endosperma de maíz.

15.-BIBLIOGRAFIA

- Glazer, A.N.;Delange, R.J.;Sigman, D.S.(1975) Chemical Modification of Proteins (TS Work and E Work,eds.) 205 pp. Amer. Elsevier Publishing Co. New York
- Gentner,N.;Greenberg,E.; Preiss,J. (1969) Biochem.Biophys. Res. Commun. 36, 373-380.
- Govons, S.;Gentner,N.;Greenberg,E.;Preiss,J.(1976) J.Biol.Chem. 248, 1731-1740.
- Haugen,T.;Ishaque,A.;Preiss,J.(1976) Biochem.Biophys. Res. Commun.69, 346-353.
- Parsons,T.F.;Preiss,J.(1978) -Parsons,T.F.;Preiss,J.(1978) J.Biol.Chem. 253,J.Biol.Chem. 253, 6197-6202.
- Parsons,T.F.;Preiss,J.(1978) J.Biol.Chem. 253, 7639-7645.
- Carlson, C.A.;Preiss,J. (1982) Biochemistry 21, 1929-1934.
- Morell,M.;Bloom,M.;Preiss,J.(1988) J.Biol.Chem. 263, 633-637
- Iglesias,A.A.;Kakefuda,G.;Preiss,J.(1992) J.Protein Chem.11, 119-127.
- Hugli,T.E., ed.(1989) Techniques in Protein Chemistry, 612 pp. Academic Press.
- Villafranca,J.F., ed.(1991) Techniques in Protein Chemistry II. 579 pp.Academic Press.

FIRMA PROFESOR:

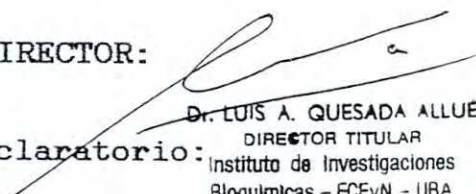


Aclaración firma: Juana Tandecarz

FECHA:

15/10/84

FIRMA DIRECTOR:



Sello Aclaratorio:

Dr. LUIS A. QUESADA ALLUE
DIRECTOR TITULAR
Instituto de Investigaciones
Bioquímicas - FCEyN - UBA