

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

U.B.A.

1.- DEPARTAMENTO/INSTITUTO de INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS

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

ORIENTACION: --.....

b) Doctorado y/o Post-Grado en Ccias. Químicas y Biológicas.....

c) Profesorado en...--.....

d) Cursos Técnicos en Meteorología.--.....

e) Cursos de Idiomas...--.....

3.- 2º CUATRIMESTRE Año:1995.....

4.- Nº DE CODIGO DE CARRERA. 51 y 55.....

5.- MATERIA **Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular**

"B".....

Nº DE CODIGO No tiene aún.....

6.- PUNTAJE PROPUESTO 5 puntos.....

7.- PLAN DE ESTUDIO Año ----.....

8.- CARACTER DE LA MATERIA Post-grado y Doctorado.....

9.- DURACION Cuatrimestral.(16 semanas).....

10.- HORAS DE CLASE SEMANAL:

a) Teóricas 3 hs (Prom.) d) Seminarios 1 1/2 hs (Prom.)

b) Problemas -- hs e) Teórico-problemas -- hs

c) Laboratorio 5 1/2 hs (Prom.) f) Teórico-prácticas -- hs

g)Totales Horas 10 hs

11.CARGA HORARIA TOTAL 160 hs.....

12.- ASIGNATURAS CORRELATIVAS Egresado o 18 materias y trabajos prácticos aprobados de las restantes.....

13.- FORMA DE EVALUACION Informes, concepto y 2 exposiciones orales en seminario

14. PROGRAMA ANALITICO:

1- Dr. Algranati - Dra. González

BIOSINTESIS DE PROTEINAS EN SISTEMA LIBRE DE CELULAS. AISLAMIENTO Y PURIFICACION. Componentes del sistema: ribosomas, polisomas, m-RNA, t-RNA. Factores solubles. Iniciación, elongación y terminación en procariotes y eucariotes.

Aislamiento y parcial purificación del sistema:

- a) Enzimas activantes y factores solubles
- b) Polisomas libres y unidos a membrana.

Caracterización del sistema:

- a) Análisis de los polisomas por gradiente de sacarosa
- b) Condiciones óptimas de actividad con los distintos polisomas.

2- Dr. Algranati - Dra. González

BIOSINTESIS DE PROTEINAS: CARACTERIZACION DEL SISTEMA.

Ultracentrifugación. Métodos de análisis de ribosomas. Gradientes de densidad. Inmunoprotección. Especificidad antígeno-anticuerpo.

Caracterización del producto de la reacción utilizando precursores radiactivos

- a) Inmunoprecipitación con anticuerpo específico.
- b) Especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo
- c) Identificación del producto por PAGE-SDS
- d) Autorradiografía

3- Dr. H. Carminatti

TÉCNICAS DE NEUROQUÍMICA BÁSICA. Obtención de proteínas de membrana de mielina y de citoesqueleto. Identificación por Western blot.

1.-Diseción de cerebros de ratón de 24 días. 2.- Fraccionamiento del cerebro. 3.-Obtención de membranas de mielina por gradiente de sacarosa.Ultracentrifugación. 4.-Identificación de polipéptidos marcados por Western blot. Utilización de anticuerpos policlonales específicos. Geles de poliacrilamida. 5.- Obtención del citoesqueleto de la fracción mielina. Extracción diferencial. 6.- Identificación de polipéptidos marcados por Western blot.

4- Dr. J.J. Cazzulo

TECNICAS FUNDAMENTALES EN EL ESTUDIO DE PROTEINASAS.

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* contienen actividades de proteinasas y peptidasas; una de ellas, cuantitativamente la más importante, es la cruzipaina. Esta enzima, que es en realidad una familia de proteínas muy semejantes, codificadas por 50 a 130 genes (dependiendo de la cepa del parásito), ubicados en tandems, en dos a cuatro cromosomas, es una glicoproteína de alta manosa, ubicada esencialmente en los lisosomas. La cruzipaina es presumiblemente la principal proteinasa digestiva de los epimastigotes, pero estudios recientes con inhibidores sugieren que la enzima tendría además un papel importante en los procesos de diferenciación (epimastigotes a trypomastigotes metacíclicos; trypomastigotes a amastigotes; amastigotes a trypomastigotes) esenciales en el ciclo vital del parásito. La cruzipaina es un antígeno inmunodominante en la enfermedad de Chagas, siendo reconocida por la gran mayoría de los sueros de pacientes crónicos; la enzima madura presenta una estructura atípica entre las cisteína proteinasas, pues consiste de un dominio catalítico, con alta homología con las catepsinas L y S de mamífero y un dominio C-terminal, responsable de alta inmunogenicidad.

Se aplicarán tres técnicas fundamentales en el estudio de las proteinasas:

- 1) electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) en geles que contienen sustrato (gelatina) incorporado, para detectar las isoformas de cruzipaina predominantes en distintas cepas del parásito, y demostrar el efecto de inhibidores. Después de la electroforesis (que se lleva a cabo con muestras no reducidas ni hervidas), se elimina el SDS por dos lavados con agua destilada, y se desarrolla la actividad por incubación de 2 hs. a temperatura ambiente a pH 6 en presencia de DTT, seguida por tinción de la gelatina remanente con Coomassie Blue R-250 y destinción. Las bandas de actividad proteolítica se observan como zonas incoloras sobre el fondo azul uniforme de la gelatina teñida.
- 2) SDS-PAGE con muestras reducidas y hervidas, seguida de tinción por plata o electrotransferencia a membranas de nitrato de celulosa (Western blots), las cuales se procesan usando antisueros desarrollados en conejo contra la cruzipaina nativa (que reconocen sólo al dominio C-terminal) o desnaturalizada (que reconocen ambos dominios). El revelado se hará por una reacción de fosfatasa, para evitar el uso de radioisótopos por los alumnos. Los antígenos a utilizar serán la cruzipaina purificada, proteínas recombinantes conteniendo fragmentos del dominio catalítico y el dominio C-terminal, y extractos crudos de epimastigotes.
- 3) determinación de la actividad de cruzipaina sobre el sustrato sintético Bz-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilida, siguiendo la reacción continuamente en un espectrofotómetro con registrador, a temperatura ambiente y 410 nm. Se determinará la actividad de la enzima purificada y de los extractos crudos, con o sin inhibidores, empleados en 1), para correlacionar la actividad determinada en el espectrofotómetro con la intensidad relativa de las bandas en los geles con sustrato.

5- Dra. Zorreguieta

AISLAMIENTO DE COMPONENTES CELULARES DE BACTERIAS GRAM.

Bacterias gram negativas, gram positivas y archaeobacteria. Ruptura celular. Lisis química. Detergentes iónicos y no iónicos. Protoplastos y esferoplastos. Centrifugación diferencial. Centrifugación zonal. Centrifugación isopícnica. Separación del flagelo y del pilus. Separación de membrana interna y externa, y citosol (citoplasma y periplasma). Obtención de la mureína, del lipopolisacárido y del exopolisacárido.

Separación de membranas y análisis de la composición proteica de los compartimientos celulares de bacterias Gram negativas. Cultivo de *A. tumefaciens*. Centrifugación diferencial. Ruptura por French Press. Separación del citosol por centrifugación diferencial.

Separación de la membrana interna y externa por ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa.

Separación de las proteínas de las distintas fracciones subcelulares en geles de poliacrilamida con SDS.

6- Dr. García Patrone

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Generalidades de electroforesis. El gel de poliacrilamida. Electroforesis disociante y no disociante. Estudio de pesos moleculares: Gráfico de Ferguson. Electroforesis con SDS.

Efecto de la difusión. Stacking. Isoelectroenfoque.

7- Dr. Daniel Sánchez

DETECCION POR PCR DE LA TRANS-SIALIDASA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*. Aplicaciones de la PCR en el laboratorio y en el diagnóstico de enfermedades, tipificación de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad.

Análisis del resultado de las PCR por electroforesis en geles y transferencia a filtros de nitrocelulosa (Southern blots). Revelado de los distintos fragmentos amplificados por hibridación utilizando sondas específicas.

8- Dr. Luis Quesada**SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LÍPIDOS.**

Deslipidificación, extracción y separación de lípidos por categorías. Técnicas de partición en solventes, cromatografía de adsorción y cromatografía de intercambio aniónico en Cromatografía en columna y en capa fina (TLC). Como técnicas auxiliares se verán: revelado semi-específico y específico en TLC, autoradiografía y fluorografía, uso de contador para centelleo líquido, centrifugación y otras técnicas elementales de la bioquímica.

9- Dr. Rodolfo Ugalde**BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE LA BIOSÍNTESIS DE HOMOPOLÍMEROS EN BACTERIAS**

En la interacción de algunas bacterias con las plantas se ha demostrado la importancia de ciertos polisacáridos. Se ha postulado que los mismos actuarían como moléculas señales necesarias para la inducción y/o la invasión de los nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas por *Rhizobium* y en la capacidad para formar el tumor de agalla en dicotiledóneas por *Agrobacterium*. En la biosíntesis de estos polisacáridos participan enzimas unidas a la membrana interna de las bacterias. En general su síntesis ocurre con la participación de intermediarios entre los nucleótidos azúcares dadores y el producto final.

Se realizarán experimentos de biosíntesis *in vitro* de polisacáridos con sistemas enzimáticos unidos a la membrana interna de bacterias. Se utilizarán técnicas de purificación de membranas por centrifugación en gradientes de sacarosa. Se utilizarán técnicas para el estudio de la formación y caracterización de los intermediarios formados durante la síntesis. Se obtendrán mutantes en la síntesis de estos polisacáridos por técnicas de mutagénesis de proteínas de membrana. Se caracterizarán bioquímicamente las mutantes obtenidas.

10.- Dr. Santa Coloma**TÉCNICA DE "DIFFERENTIAL DISPLAY"**

Los organismos superiores contienen cerca de 100.000 genes diferentes, de los cuales en una sola célula se expresan aproximadamente un 15%. Para estudiar los genes que se están expresando en una célula en diferentes condiciones, habría que comparar unos 15.000 RNAm, lo cual es muy engorroso. Para poder observar diferencias en la expresión de una manera más sencilla, Liang y Pardee desarrollaron la técnica de "Differential Display" que se basa en amplificar secuencias parciales de DNA copia (cDNA) de subpoblaciones de RNAm mediante transcripción reversa (RT) y posterior reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos de cDNA obtenidos (300-800 bp) se evidencian en un gel de secuenciación, donde se comparan los fragmentos correspondientes a los controles con los correspondientes a los tratados con algún factor de interés (TGF- β , interleukina, interferón, etc.).

11.- Dra. Angeles Zorreguieta

TECNICAS PARA LA UTILIZACION DEL BACTERIOFAGO M13 COMO VECTOR. Ventajas. Región intergénica. Ciclo del M13. Replicación. Fásmidos. Fago helper. Bacteria huésped. Sus usos en la mutagénesis *in vitro* y en la secuenciación del DNA.

Clonado de fragmentos de ADN en fago M13 de doble cadena y preparación de M13 simple cadena. Purificación de plásmidos doble cadena por el método alcalino. Infección de la célula huésped. Purificación de M13 simple cadena. Selección de fagos recombinantes en medio sólido. Electroforesis en agarosa. Cortes con enzimas de restricción. Ligación de un fragmento de ADN al M13 doble cadena lineal.

12.- Dr. Luis Ielpi

SECUENCIACION DE ADN. Deleciones con exonucleasa Bal 31 y Exoll. Secuenciación simple y doble cadena. Elección de iniciadores.

Análisis de la secuencia buscada de analogías en base de datos.

Secuenciación de un fragmento de ADN por el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Análisis de la secuencia obtenida. Identificación de marcos de lectura abiertos. Comparación con base de datos de secuencia de ADN y de proteínas.

13.-Dr. Roberto Staneloni

PCR Y SUS APLICACIONES

Obtención de deleciones en el promotor de un gen mediante la utilización de DNA polimerasa, primers y la técnica de PCR.

Deleciones en el promotor del gen Cab de plantas de tabaco. Amplificación del DNA con la enzima Taq polimerasa. Subclonado en el plásmido pUC19.

14.-Dr. Ricardo Wolisiuk

DETERMINACIÓN DE OXIDO-REDUCTASAS

Interacción proteína-proteína en las protein-disulfuro oxidoreductasas.

Las protein-disulfuro oxidorreductasas (PDOR) participan en la modificación de los residuos cisteína de las proteínas: oxidación de los grupos sulfhidrilo, reducción e isomerización de las uniones disulfuro. Este proceso requiere previamente la interacción no-covalente previa con la proteína "target".

En el trabajo propuesto se buscará caracterizar la interacción de la tiorredoxina de *E. coli* con las proteínas foliares. Para ello se unirá a una columna de GSH-Agarosa la proteína quimérica constituida por la glutation-S-transferasa de *Schistosoma japonicum* fusionada al N-terminus de la tiorredoxina de *E.coli*. En esta columna se sembrarán las proteínas inducidas en una "cDNA library" de hojas de colza. Luego de la elución específica, las proteínas liberadas se caracterizarán por SDS-PAGE.

15.- Dra. Silvia Moreno

ISOENZIMAS EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Un alto porcentaje de los loci que codifican para proteínas enzimáticas en las plantas superiores son polimórficos (31-54%). Dichas formas génicas múltiples, ya que son productos génicos directos, posibilitan el análisis de la expresión génica o de su regulación en un amplio rango de tejidos vegetales. La utilidad de la determinación del perfil de isoenzimas en el campo de los cultivos de tejidos vegetales incluyen: el monitoreo de la estabilidad génica de las células en cultivo, muy necesario en la técnica de micropropagación; el análisis de la variación somaclonal en cultivos de callos o en técnicas de regeneración de plantas que pasan por etapas intermedias de callo; la caracterización de distintos estadios de desarrollo de un tejido en particular; estudios de regulación génica, etc. Las formas múltiples se resolverán por técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida y en geles mucho más resolutivos que estos como son los geles de afinidad. El sistema biológico de estudio serán cultivos de callos desdiferenciados, plantas micropropagadas y en un sistema de inducción de la tuberización *in vitro* de *Solanum tuberosum*.

16.- Dr. Víctor Idoyaga**FOSFORILACION DE PROTEINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

La interacción del ligandos con proteínas de la superficie celular (neurotransmisores, factores de crecimiento, hormonas canales iónicos y proteínas receptoras respectivamente) se transducen intracelularmente a través de cascadas de fosforilación durante el funcionamiento y el desarrollo del sistema nervioso central.

En la parte práctica se desarrolla una metodología que define los sustratos proteicos de kinasas y fosfatasas que integran y coordinan estas cascadas de fosforilación. Esto se realiza por medio de la incubación con ^{32}P con miniunidades de tejido proveniente del cerebelo en desarrollo. El análisis ulterior se efectúa por medio de geles bidimensionales de alta resolución en donde se utiliza un detergente en una primera dimensión 16-BAC seguido de una preparacuíón estandar con SDS en una segunda dimensión. Las proteínas fosforiladas se detectan por medio de radioautografía.

17.- Dr. Víctor Idoyaga**INMUNOCITOQUIMICA. MARCACION DE GLICOPROTEINAS SINAPTICAS.**

La regulación de la expresión de proteínas durante el desarrollo del sistema nervioso es central para comprender el mecanismo por el cual una neurona se conecta con otra. Una metodología importante para develar la expresión de los marcadores de diferenciación es la detección por medio de anticuerpos monoclonales asociados a anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa en tejido cerebelar, in situ. Se realiza además en este práctico, y en forma complementaria la detección de los mismos marcadores utilizando la técnica de western blot partiendo de homogenatos de cerebelo.

18.- Dr. Marcelo Dankert**UTILIZACIÓN DE CÉLULAS ELECTROPORADAS COMO SISTEMA ENZIMÁTICO. Síntesis de prenil-fosfo-azúcares y de polisacáridos en bacterias.**

La técnica de electroporación permite obtener actividades enzimáticas no detectables por las técnicas usuales: sonicación, celda de French, EDTA, etc.

Se estudiará la síntesis de prenil-fosfo-azúcares y de polisacáridos en la bacteria gram negativa *Acetobacter xylinum*. Esta bacteria produce celulosa, glucanos y algunas cepas, acetano (un exopolisacárido descrito en el laboratorio).

Para este estudio se utilizarán células electroporadas y, como referencia, también células tratadas con EDTA (otra manera de obtener algunas de estas actividades enzimáticas).

El trabajo implica cultivar células (una parte será ayunada), hacer los respectivos preparados enzimáticos, incubar estos últimos en presencia de precursores radioactivos y el fraccionamiento y caracterización de los productos obtenidos.

19.- Dr. Armando Parodi**SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DE DE N-GLICOPROTEINAS.**

Etapas iniciales en la síntesis y procesamiento de N-glicoproteínas en células de tripanosomátidos.

Usando como modelo el tripanosomátido no patógeno *Crithidia fasciculata* se determinará:

- a) Tamaño de la parte poliprenoidede dolichol-P derivadas.
- b) Estructura de oligosacárido unido a dolichol-P-P.
- c) Determinación de defectos enzimáticos responsables de la estructura de oligosacáridos estudiada en b.
- d) Estructura de oligosacáridos unidos a proteínas en las primeras etapas de síntesis.
- e) Medición de la glucosiltransferasa que sintetiza a uno de los oligosacáridos cuya estructura fue estudiada en el punto d.

Técnicas a utilizar: filtración en gel, marcación celular in vivo, fraccionamiento subcelular, cromatografía en papel y en capa delgada, autoradiografía, medición de actividades de enzimas con sustratos y productos lipídicos, acetólisis y permetilación de oligosacáridos, estudio de la estructura de estos últimos por degradación enzimática y química.

20.- Dr. Armando Parodi

PLEGAMIENTO DE GLICOPROTEINAS.

Plegamiento de proteínas y glicoproteínas en el lumen del retículo endoplásmico rugoso. Participación de chaperonas y mecanismos de retención de estructuras mal plegadas.

Se trabajará con la UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata y/o de *Schizosaccharomyces pombe*:

- a) Se la purificará parcialmente usando técnicas tradicionales y FPLC.
- b) Con dicha preparación se determinará su actividad sobre glicoproteínas nativas y desnaturalizadas y sobre glicopéptidos.
- c) Se determinará la estructura de los productos de reacción obtenidos.

Técnicas a utilizar: fraccionamiento subcelular, purificación de enzimas por resinas de intercambio iónico y por afinidad usando FPLC, obtención y purificación de glicopéptidos por degradación proteolítica y cromatografía de afinidad, cromatografía y electroforesis en papel, filtración en gel, determinación de la estructura terciaria de proteínas por mediación de la fluorescencia del triptofano, mediación de actividad enzimática y estudio de la estructura del producto de reacción obtenido (oligosacárido unido a proteína) por degradación enzimática.

21.-Dr. Armando Parodi

SINTESIS DE GLICOPROTEINAS Y GLICOLIPIDOS.

Síntesis de glicoproteínas y glicolípidos en tripanosomátidos. Adición de ácido siálico por un mecanismo privativo de estos microorganismos. Su efecto en la virulencia del parásito.

Utilizando trans-sialidasa recombinante de *T. cruzi* se determinará:

- a) Ensayo de la enzima y determinación de parámetros cinéticos.
- b) Acción sobre glicolípidos con oligosacáridos de diferente estructura.
- c) Acción sobre N- y O-oligosacáridos.

Técnicas a utilizar: Medición de parámetros cinéticos de enzimas, cromatografía y electroforesis en papel, cromatografía en capa delgada, obtención diferencial de oligosacáridos unidos a asparagina o a seina/treonina, estudio de la estructura de oligosacáridos por degradación enzimática o química.

22.- Dra. Viviana Lepek / Dra. Diana Tolmasky

TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS APLICADAS A EXPERIMENTOS DE PULSO Y CHASE

En nuestro laboratorio se ha demostrado que en distintos tejidos el glucógeno se sintetiza *de novo* sobre una proteína. En experimentos realizados en músculo cardíaco de rata hemos demostrado la asociación covalente entre glucanos $\alpha 1,4$ y una proteína. En estas condiciones se obtenían bandas marcadas con (^{14}C)glucosa de peso molecular variable.

Se realizarán experimentos de pulso y chase para visualizar todas las etapas que están involucradas en la biosíntesis del glucógeno desde la unión de la primera glucosa a una proteína aceptora hasta la formación de un polímero de glucosas de alto peso molecular. Se utilizarán técnicas electroforéticas y de autoradiografía para seguir el curso de la reacción.

A partir de una banda radioglucosilada de bajo peso molecular se obtendrá un polisacárido marcado con (^{14}C)glucosa que queda retenido en el lugar de siembra cuando se analiza por SDS/PAGE. Este polisacárido posee todas las características típicas del glucógeno nativo.

23.- Dr. Osvaldo Podhajcer**TRANSFERENCIA GENICA: UTILIZACION DE PLASMIDOS Y VECTORES RETROVIRALES. CULTIVOS CELULARES.**

Conceptos de terapia génica. Sistemas de transferencia de genes: vectores retrovirales, adenovirus, virus asociado a adeno, herpes. "Células empaquetadoras". Vectores no virales. Concepto de "ex vivo" e "in vivo". Uso de promotores específicos de tejido para expresión de genes. Utilidad de la transferencia génica en enfermedades hereditarias, neurológicas, cardiovasculares, sida y cáncer: modelos murinos y ensayos iniciales en seres humanos.

Preparación de vectores retrovirales. Transfección de células "empaquetadoras" por el método de precipitación con fosfato de calcio. Clonado celular en presencia de antibiótico de selección. Transducción con retrovirus recombinante anfotrópico y ecotrópico. Aislamiento de clones estables en presencia del marcador de selección. "ring cloning" y "clonado por dilución". Expresión del transgen.

24.- Dr. Leo Satz**TIPIFICACION MOLECULAR DEL SISTEMA HLA**Contenidos teóricos:

Estructura y función del sistema mayor de histocompatibilidad. Moléculas de clase I y clase II. Organización genética del sistema HLA. Polimorfismo de los genes de clase I y clase II. Concepto de tipificación serológica y molecular. Importancia de la tipificación molecular en la selección de donantes para trasplantes de órganos.

Trabajos prácticos:

Estrategias de tipificación molecular de alelos de clase II, de los loci HLA-DRB1, DRB3, DQA1, DQB1, DPB1. Técnicas de "baja y alta" resolución. Técnicas de PCR-SSP y PCR-SSO. Técnicas radiactivas y no radiactivas. Tipificación molecular de alelos HLA de clase I: HLA-A, -B y -C.

25.- Dr. L.R. Marechal/Dr. J.M. Olavarría**EVALUACIÓN COMPARADA DE PROBABLES CAMINOS METABÓLICOS ALTERNATIVOS, UTILIZANDO ISÓTOPOS RADIOACTIVOS.**

Se tratará de valorar los flujos relativos que corresponden in vivo a dos sustratos diferentes a través de posibles caminos metabólicos interconectados. Para ello se utilizarán dos sustratos con diferente marcación (H^3 y C^{14}).

26.- Dr. L.R. Marechal/Dr. J.M. Olavarría**ESTUDIO DE MUTANTES CRÍPTICAS EN ENTEROBACTERIAS.**

Cryptic genes are phenotypically silent DNA sequences, not normally expressed during the life cycle of an individual. They may, however, be activated in a few individuals of a large population by mutation, recombination, insertion elements, or other genetic mechanisms (Hall, B.G. et al., Mol. Biol. Evol. 1, 109-124 (1983).

Los experimentos estarán diseñados para detectar, fenotípicamente, la activación de secuencias silenciosas de DNA tales como las descritas en el párrafo anterior. Se utilizará como modelo el metabolismo de la trehalosa en *S. Typh.* LT2.

27.- Dra. Mercedes Goin/ Dr. Marcelo Rodríguez

ACCION DE UN MITÓGENO: CULTIVO DE CELULAS Y SINTESIS DE ADN.

Técnicas de cultivo de células de animales: Trabajo en esterilidad. Propagación y preservación de líneas celulares continuas.

Determinación de la acción de diferentes mitógenos y el efecto potenciador de hormonas no mitogénicas: Incorporación de ³H-Timidina al DNA, conteo de núcleos marcados en microscopio óptico y determinación del aumento de número celular.

28.- Dra. Juana Tandecarz/ Dr. Luis Quesada Allué

TECNICAS INICIALES DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

1) Estrategia y práctica elemental de iniciación de líneas de cultivo

a) preparación del material de cultivo: semillas u explantos

c) preparación de medios de cultivo

d) cultivo semi-sólido; análisis de callos

e) cultivo líquido

2) Elementos técnicos de micropropagación: batata y violeta africana



- **BILIOGRAFIA GENERAL:**

- Artículos recientes en revistas de Bioquímica, Biología Molecular y Biología Celular.
- Molecular Cloning; Sambrook et al (Cold Spring Harbor), 1989
- Biochemical Calculations; Segel I (Wiley), 1976

- **BIBLIOGRAFIA ESPECIAL:**

- **Dr. Algranati - Dra. González**

- G. Blabel and U.R. Potter, J. Mol. Biol. 28, 539, (1967).
- R.B. Arlinghaus and R. Ascione, Protein Biosynthesis in nonbacterial Septems (Craat, J. A. and Craskin A. J., Ed.), 52, (1972).
- J. C. Ramsey and W.J. Steele, Anal. Bioch. 92, 305, (1979).
- H. Noll, Techniques in Protein Biosynthesis (Campbell and Sargent, ED.) Vol 2, 101, (1969).
- B.M. Goldman and G. Blobel, PNAS 75, 5066, (1978).
- D. Shields and G. Blobel, J. Biol. Chem. 253, 3753, (1978).
- Methodos in Enzymology. Vol. 96, Secc. 1, 3 - 24, (1993).
- Methodos in Enzymology. Vol. 96 Secc. 8, 111 - 120 , (1983).

- **Dr. Cazzulo - Dr. Sánchez**

- J.J. Cazzulo and A.C.A. Frasch: SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from Trypanosoma cruzi contain immomodominant but enzymatically inactive domains. FASEB J. 6, 3259 - 3264, (1992).
- B.M. Franke de Cazzulo, L. Sferco, M.J. North, G.H. Coombs and J.J. Cazzulo: Effect of proteinase inhibitors on growth and differentiation of Trypanosoma cruzi. IX International Congress of Protozoology, Berlín, Abstract Nr. 155, (1993).
- J. Martínez, O. Campetella, A.C.C. Frasch and J.J. Cazzulo: The major cysteine proteinase (Cruzipain) from Trypanosoma cruzi is antigenic in human infections. Infect. Immun. 59, 4275 - 4277, (1991).
- J. Martínez, O. Campetella, A.C.C. Frasch and J.J. Cazzulo: The reactivity of sera from chagasic patients against different fragments of cruzipai, the major cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi, suggests the presence of defined antigenic and catalytic domains. Immunol. Lett. 35, 191 - 196, (1993).

- **Dr. Santa Coloma**

- Science vol. 257 August 1992 pg. 967-971
- Nucleic Acids Research Vol. 21 N° 14 1993 pg. 3269-3275
- Nucleic Acids Research Vol. 22 N° 9 1994 pg. 1764-1765
- BioTechniques Vol. 18 N° 5 1995 pg. 832-850

- Dr. Ielpi

- K.G. Hardy. Ed., Plasmids, a practical approach, IRL Press, Oxford. Washington, D.C., (1987).
- P. Gerhardt, Ed., Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D.C., (1994).
- Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning. A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989).
- Adams, Knowler, Leader, The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall Ltd (1992).
- J.H. Miller, Ed., Methods in Enzymology, Vol 204, Bacterial Genetic Systems, Academic Press, Inc. (1991).
- Sequenase, version 2.0, Instruction Manual, USB (1992)
- M13 Cloning/Dideoxy Sequencing, Instruction Manual, BRL (1990)
- P. Gerhardt, Ed., Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D.C., (1994).
- Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning. A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989).
- Adams, Knowler, Leader, The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall Ltd (1992).

- Dr. Staneloni

- D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover and T.J. White, Diagnostic Molecular Microbiology "principles and Applications", American Society for Microbiology, (1993)
- M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Snisky and T.J. White, PCR Protocols: A guide to methods and applications, Academic Press Inc. (1990)
- Trends in Genetics, Vol 5, (6) 185 (1989)

- Dr. Parodi

- A.J. Parodi, N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. Glycobiology 3, 193 - 199 (1993) .
- A.J. Parodi, Biosynthesis of protein-linked oligosaccharides in trypanosomatid flagellates. Parasitology Today, 9, 373 - 377, (1993).
- A. Helenius, How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. Molecular Biology of the Cell, 5, (1994), 253 - 265
- A.C. Frasch and J.J. Cazzulo, SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from Trypanosoma cruzi contain immunodominant but enzymatically inactive domains, The FASEB Journal, 6, (1992), 3259 - 3264
- W. Colli, Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan. Trypanosoma cruzi. The FASEB Journal, 7, 1257-1264 (1993)

- A.J. Parodi, L.A. Quesada Allué and J.J. Cazzulo, Pathway of Protein Glycosylation in the Trypanosomatid Crithidia fasciculata, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 78, 6201 - 6205 (1981).
- A.J. Parodi and L.A. Quesada Allué, Novel Mannose Carrier in the Trypanosomatid Crithidia fasciculata Behaving as a Short Δ -Saturated Polyprenyl Phosphate, Biochemical Journal, 212, 123 - 128 (1983).
- G.Z. Lederkremer and A.J. Parodi, Separation of Dolichol Monophosphate Mannose and Dolichol Monophosphate Glucose by Thin Layer Chromatography, Journal of Chromatography, 262, 299 - 304 (1983).
- L. de la Canal and A.J. Parodi, Synthesis of Dolichol Derivatives in Trypanosomatids. Characterization of Enzymatic Patterns, The Journal of Biological Chemistry, 262, 11128 - 11133 (1987).
- D.H. Mendelzon and A.J. Parodi, N-linked, HighMannose-type Oligosaccharides in the Protozoa Crithidia hamosa Contain Galactofuranose Residues, The Journal of Biological Chemistry, 261, 2129 - 2133 (1986).
- S. Trombetta, M. Bosch and A.J. Parodi, Glucosylation of Glycoproteins by Mammalian, Plant, Fungal and Trypanosomatid Protozoa Microsomal Membranes, Biochemistry, 28, 8108 - 8116 (1989).
- S. Trombetta, M. Bosch and A.J. Parodi, Glucosylation of Glycoproteins by Mammalian, Plant, Fungal and Trypanosomatid Protozoa Microsomal Membranes, Biochemistry, 28, 8108 - 8116 (1989).
- S.E. Trombetta and A.J. Parodi, Purification to Apparent Homogeneity and Partial Characterization of Rat Liver UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase, The Journal of Biological Chemistry, 267, 9236 - 9240 (1992).
- M. Sousa, M.A. Ferrero García and A.J. Parodi, Recognition of the Oligosaccharide and Protein Moieties of Glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase, Biochemistry, 31, 97 - 105 (1992).
- A.J. Parodi, G. Pollevick, M. Mautner, A. Buschiazzi and A. C. Frasch, Identification of the Gene(s) Coding for the Trans-sialidase of Trypanosoma cruzi, The EMBO Journal, 11, 1705 - 1710 (1992).
- M.A. Ferrero García, S. Trombetta, D.O. Sánchez, A. Reglero, A.C. Frasch and A.J. Parodi, The Action of Trypanosoma cruzi Trans-sialidase on Glycolipids and Glycoproteins, European Journal of Biochemistry, 213, 765 - 771 (1993).
- O.E. Campetella, A.D. Uttaro, A.J. Parodi and A.C. Frasch, A Recombinant Trypanosoma cruzi Trans-sialidase Lacking the Amino Acid Repeats Retains the Enzymatic Activity, Molecular and Biochemical Parasitology, 64, 337 - 340 (1994).



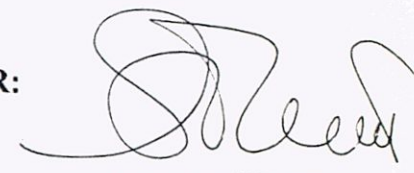
FIRMA PROFESOR:

Aclaración firma: Dr. Quesada Allué

FECHA: 14 de Agosto de 1995

FIRMA DIRECTOR:

Sello Aclaratorio:



Dra. JUANA S. TANDECARZ
DIRECTORA ADJUNTA
Instituto de Investigaciones
Bioquímicas - FCEyN - UBA