

14. PROGRAMA ANALITICO

1.- Dr. Manuel 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.

2.- Dr. Juan José Cazzulo

TECNICAS FUNDAMENTALES EN EL ESTUDIO DE PROTEINASAS.

Estructura, propiedades, inmunogenicidad y posible función de la cruzipaína, la cisteína proteinasa más importante en los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. La cruzipaína participaría en la digestión lisosomal de proteínas endocitadas, en procesos de diferenciación esenciales en el ciclo vital del parásito, y en la protección contra la respuesta inmune del huésped.

La enzima es un antígeno inmunodominante en la enfermedad de Chagas crónica.

Se aplicarán técnicas fundamentales en el estudio de las proteinasas:

1) Electroforesis en el gel de acrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) en geles que contienen sustrato (gelatina) incorporado. 2) SDS-PAGE con muestras reducidas y hervidas, seguidas de tinción por plata o electrotransferencia a membranas de nitrato de celulosa (Western blots), reveladas con anticuerpos específicos. 3) Determinación electrofotométrica de la actividad de cruzipaína sobre el sustrato sintético cromogénico Bz-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilida. 4) Efectos de inhibidores en 1) y 3).

3.-Dr. Ricardo Wolosiuk

ANALISIS ESPECTROFLUOROMETRICO DE LA REDUCCION DE PUENTES DISULFURO EN PROTEINAS.

La reducción de los puentes disulfuro en las proteínas será analizada por las variaciones en la fluorescencia de emisión de sondas intrínsecas (residuo triptofano) o extrínsecas (anilin naftalen sulfónico).

4. - Dr. Víctor Idoyaga

REGULACION DE LA EXPRESION DE PROTEINAS DURANTE EL DESARROLLO DEL SNC: EXPRESION DE MENSAJEROS Y ACTIVIDAD DE FOSFATASAS DURANTE LA SINAPOTOGENESIS EN EL CEREBELO.

Diferenciación del cerebelo. Sinaptogenesis entre axones de las células grano y las de Purkinje. Las fases de la sinaptogénesis: a) selección de la vía. b) selección del blanco. c) selección final y estabilización.

La fosforilación de proteínas durante la sinaptogénesis. Kinasas y fosfatasa.

Regulación génica y señales sinaptogénicas. Papel de los estímulos externos.

5. - Dr. Víctor Idoyaga

REGULACION DE LA EXPRESION DE PROTEINAS: VELOCIDAD DE TRADUCCION Y FOSFORILACION DE THY 1.2 y TAU DURANTE LA SINAPTOGENESIS.

Regulación de la velocidad de traducción de Thy 1.2 en el cerebelo de ratón mutante staggerer durante la formación de sinapsis grano/Purkinje. Regulación de la fosforilación de Tau y de su velocidad de recambio durante la sinaptogénesis. Tau y PP2A.

APROBADO POR RESOLUCION. CD895/99

6.- Dr. Luis Ielpi

SECUENCIACION DE UN FRAGMENTO DE ADN. ANALISIS DE LOS DATOS.

Secuenciación por el método de dideoxi un fragmento de ADN y análisis de los resultados, en cuanto a marcos de lectura abiertos, posibles proteínas, comparación con base de datos.

7.- 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 al mismo tiempo, habría que comparar unos 15.000 RNAm, lo cual es muy engorroso. Para poder observar diferencias en la expresión de una manera sencilla, Liang and 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 y posterior PCR (RT-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.). Luego pueden ser eluidos del gel, clonados y secuenciados.

8.- Dr. Gonzalo Prat Gay

ESTABILIDAD CONFORMACIONAL DE PROTEINAS

Utilizando dos proteínas de comportamiento diferente, se propone determinar su estabilidad conformacional. Se partirá de proteínas purificadas, y se efectuará una curva de desnaturalización con urea y cloruro de guanidinio. El grado de plegamiento de las proteínas será acompañado por medidas de fluorescencia intrínseca. Se analizará el efecto comparativo de ambos agentes y la estabilidad de las proteínas modelo. Se analizarán los datos utilizando ecuaciones matemáticas que describen el proceso, por análisis de progresión lineal.

9.- Dr. Roberto Staneloni

AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR

Amplificación de un fragmento de ADN por PCR. Este fragmento corresponde al promotor del gen Cab. Purificación del fragmento en gel de Agarosa y ligado a un vector de alto número de copias. Purificación de ADN y análisis de los clones por PCR.

10 y 11.- Dr. Armando Parodi

GLICOPROTEINAS

Biosíntesis y procesamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico.

Plegamiento de Glicoproteínas-Chaperonas-Control de calidad del plegamiento de glicoproteínas.

Respuesta celular a la presencia de glicoproteínas mal plegadas.

Degradación citosólica de glicoproteínas al aparato de Golgi.

Secreción de glicoproteínas al aparato de Golgi.

12.- Dr. Israel Algranati

PREPARACION POR PCR DE SONDAS ESPECIFICAS MARCADAS Y SU UTILIZACION EN EL ANALISIS POR HIBRIDIZACION DE DNA.

Se preparará DNA a partir de varios parásitos y se sintetizará una sonda marcada específica para el gen de ornitina decarboxilasa (ODC). Las muestras de DNA se someterán a digestión con varias enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos se separarán por electroforesis en gel de agarosa. Después de transferencia a membranas se detectará el gen de ODC por hibridización con la sonda específica.

13.- Dr. Marcelo Dankert

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.

14.- Dr. H. Carminatti

WESTERN BLOT E INMUNODETECCION DE TAU Y PP2A DURANTE EL DESARROLLO DEL CEREBELO DE RATON.

Cambios de localización y de expresión de protein fosfatasas durante el desarrollo del cerebelo de ratón. Se utilizan las técnicas de fraccionamiento celular e inmunodetección en membranas. Los antígenos reconocidos son PP2A, PP2B, CPD1 y TAU.

15.- BIBLIOGRAFIA

Trabajos novedosos, relevantes, recientemente publicados en revistas de nivel internacional (Nature, Science, Cell, J. Biological Chemistry, Embo J., J. Molecular Cell Biology, Plant Physiology, etc.)

FECHA

FIRMA PROFESOR:

Aclaración firma: Dr. Luis Quesada Allué

FIRMA DIRECTOR:

Sello Aclaratorio:

Dr. LUIS IELPI
DIRECTOR TITULAR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOQUIMICAS - FCEyN-UBA