



## 14. PROGRAMA ANALITICO

### 1. Dr. Luis Quesada Allué

#### **TALLER GENERAL DE ELECTROFORESIS EN GELES. TRANSFERENCIA DE PROTEINAS**

*Geles de poliacrilamida mono y bi-dimensionales nativos y desnaturalizados. Geles de agarosa. Geles de actividad enzimática. "Western blot".*

### 2. Dr. Héctor Carminatti

#### **WESTERN BLOT E INMUNOCITOQUIMICA DE FOSFOPROTEINAS DEL SNC.**

*Western blot – Inmunohistoquímica*

*Inmunodetección de proteínas en cultivo de células, cortes de tejido y en membranas (western) durante el desarrollo del cerebelo o del cultivo.*

### 3. Dr. Víctor Idoyaga

#### **CLONADO E IDENTIFICACION DE UN FRAGMENTO DE cDNA DE TOPOISOMERASA II EN CORTEZA EMBRIONARIA DE RATA**

*Clonado en bacterias. Mapeo de restricción.*

*Clonado de un fragmento de cDNA correspondiente a la topoisomerasa II de rata en E. coli. Identificación del fragmento purificado mediante miniprep y un mapeo de restricción.*

### 4. Dr. Víctor Idoyaga

#### **DETERMINACION DE LOS EFECTOS DE CITOSTÁTICOS SOBRE LA PROLIFERACION TUMORAL.**

*Cultivo de tejido. Medición de síntesis de DNA*

*Determinación del índice de proliferación de las células tumorales en presencia de un citostático que actúa sobre la fase S del ciclo celular.*

### 5. Dr. Roberto Staneloni

#### **AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR**

*Mutaciones. Sustituciones, 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.*

### 6. Dr. Marcelo Dankert

#### **CÉLULAS ELECTROPORADAS COMO SISTEMA ENZIMÁTICO.**

*Electroporación. Cromatografía en columna. Cultivo.*

*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.*

**7. Dr. Tomás Santa Coloma**  
**DISPLAY DIFERENCIAL**

*Display diferencial. Geles de secuenciación. Clonado. Secuenciación. Northern.*  
*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- $\beta$ , interleukina, interferón, etc.). Luego pueden ser eluidos del gel, clonados y secuenciados.*

**8. Dr. Armando Parodi**  
**CONTROL DE CALIDAD Y PLEGAMIENTO DE GLICOPROTEINAS**

*SDS – Page – Western blot – Northern blot – PCR – Determinación de actividad de glucosil transferasa.*

*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.*

**9. Dr. Gonzalo Prat Gay**  
**PRINCIPIOS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA y DE CRISTALIZACION DE PROTEINAS.**

*Espectroscopía de fluorescencia y cristalización de proteínas.*

*Clase teórica:*

*1) Introducción a la espectroscopía de fluorescencia. Fluorescencia de triptofano; influencia del entorno químico. Plegamiento de proteínas en condiciones de equilibrio. Fundamentos de la acción de desnaturalizantes químicos. Técnicas básicas para el estudio del equilibrio conformacional de las proteínas. Modelos matemáticos que describen la reacción: ecuación de dos estados.*

*2) Cristalización de proteínas: conceptos teóricos y prácticos.*

*Clase práctica:*

*Uso de espectrofotómetros de fluorescencia y de absorción. Obtención y análisis de espectros.*

*Preparación de soluciones de proteínas. Cálculo del coeficiente de extinción y medición de su concentración por espectroscopía.*

*Preparación de una curva de desnaturalización química por cloruro de guanidinio y urea.*

*Medición de diferentes parámetros del espectro de fluorescencia para dicha curva.*

*Análisis de las curvas por método gráfico y utilizando análisis por regresión.*

*Interacción proteína ligando utilizando el cambio de fluorescencia producido por un colorante al interactuar con un sitio hidrofóbico.*

*Cristalización de una proteína.*

**10. Dr. Luis Quesada Allué**

**LIPIDOS: ANALISIS ELEMENTAL**

*Métodos de extracción o eliminación de lípidos. Cromatografía columnas y TLC: Separación y análisis de lípidos neutros y polares. Cromatografía de adsorción en Ac. sílico. Cromatografía de intercambio aniónico. Saponificación e hidrólisis ácida. Análisis en capa fina.*

**11. Dr. Luis Ielpi**

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

*Determinación de la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN por el método de Sanger, también conocido como el método de terminación de la cadena. Secuencia de un fragmento empleando el kit de Sequenasa II y <sup>35</sup>S-ATP, preparación y corrida de un gel de poliacrilamida con doble descarga de muestra, transferencia del gel a papel Whatman 3MM, autorradiografía, y revelado. Enseñanza práctica de lectura de la secuencia de nucleótidos. Análisis de la secuencia obtenida (porcentaje de G+C, zonas promotoras, análisis de RNA-mensajero, en base de datos (blastn, blastp, blastx), marcos de lectura abiertos, traducción, posible función bioquímica, estructura secundaria, hidrofobicidad, segmentos de aminoácidos.*

**12. Dr. Israel Algranati**

**DETERMINACION DE AMPLIFICACION GENICA POR ANALISIS DE HIBRIDIZACION.**

*Preparación de DNA – Digestión con enzimas de restricción – hibridización - Southern – Preparación de sonda específica por PCR. Después de preparar DNA genómico de un parásito (Crithidia fasciculata) se lo digiere con varias enzimas de restricción y se prepara los fragmentos por electroforesis en agarosa. Se realiza la transferencia a una membrana de Nylon que se hibridiza con una sonda específica radiactiva preparada por PCR.*

**13. Dr. Pablo Wappner**

**TECNICAS DE INMUNOHISTOQUIMICA EN DROSOPHILA MELANOGASTER. UTILIZACION DE LINEAS TRANSGENICAS.**

*Microscopía óptica, contraste de interferencia, contraste de fase, fluorescencia, Uso de GFP, inmuno-detección in situ. Manejo básico de líneas normales, mutantes y transgénicas de Drosophila melanogaster. Cruzamientos basados en el sistema binario de Gal4/UAS. Análisis de los resultados por inmunotinción de embriones revelando tanto con reacción de peroxidasa como por técnicas fluorescentes. Se observarán también líneas expresando la proteína verde fluorescente.*

**14. Dr. Ricardo Wolosiuk**

**ANALISIS ESPECTROFLUOROMETRICO DE LA REDUCCION DE PUENTES DISULFURO EN PROTEINAS.**

*Fluorescencia intrínseca y extrínseca en proteínas. Actividad protein disulfuro reductasa. 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).*

## 15.- BIBLIOGRAFIA GENERAL

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.)

Bibliografía específica:

TP N° 8. Dr. Parodi

- Fernández F, Jannatipour M., Hellman U., Rokeach L. and Parodi A.J. 1996. A new stress preotein: synthesis of Schizosaccharomyces pombe UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced under stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability. EMBO J. 15:705-713.
- Hebert D.N., Foellmer B. And Helenius, A. 1996. Calnexin and calreticulum promete folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. EMBO J. 15:2961-2968.
- Helenius, A. 1994. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. Mol. Biol. Cell 5:253-265.
- Helenius A., Hebert D.N. and Simons J.F., Trends in Cell Biology 7, 193-200 (97) Calenxin, cabreticulin and the folding of glycoproteins.

TP N° 9 Dr. Prat Gay

- Protein Structure, A Practical Approach (1990). Editor Thomas Creighton, IRL Press, Capítulos 11 y 13.
- Protein Function, A Practical Approach (1990). Editor Thomas Creighton, IRL Press.
- Mecanismos of Protein Folding (1994). Editor, R.H. Paine, IRL Press.
- Proteins, Structure and Molecular Properties (1984), Thomas Creighton, Freeman.
- Preparation and analysis of protein cristals (1982), Alexander McPherson, Wiley.
- Macromolecular crystallography partA (1997) Methods in Enzymology, Vol 276.

TP N° 13 Dr. Wappner

- Asburner, 1989. Drosophila, a laboratory handbook. Ed by Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Brand A. and Perrimon N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 118: 401-415.
- Campos-Ortega J.A. and Hartenstein V., 1985. The embryonic Development of Drosophila melanogaster. Ed. by Springer Verlag.
- Cubbit A., Heim R., Adams S., Boy A., Gross L. and Tsien R., 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. TIBS 20: 448-455.
- Welsh and Key, 1997. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. Curr. Opin. Biotech. 8: 617-622.

FECHA 25/8/99

FIRMA PROFESOR:

Aclaración firma: Dr. Luis Quesada Allué

FIRMA DIRECTOR:

Sello Aclaratorio:

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