

14. PROGRAMA ANALITICO

PARTE TEORICA:

Síntesis de proteínas y su regulación:

Mecanismo de la síntesis proteica. Traducción "in vivo" y en sistemas libres de células. Activación de aminoácidos. Estructura y función de los RNA de transferencia. Aminoacil tRNA sintetasas. RNA mensajero. Maquinaria ribosomal: estructura. Proceso de traducción. Iniciación, elongación y terminación de la síntesis proteica. Ciclo de ribosomas. Regulación y fidelidad de la traducción.

Introducción a la cristalografía de proteínas.

Analogía óptica. Propiedades de los cristales de proteínas, simetría y grupos de espacio.

Los rayos X : generadores y detectores. La radiación de sincrotrón.

Difracción de rayos X por los cristales.

El problema de las fases en cristalografía. Métodos utilizados para la determinación de estructuras cristalinas de macromoléculas. El método de reemplazo molecular. El método de reemplazo isomorfo (átomos pesados). El método de difracción anómala a diferentes longitudes de onda. Modelado de la estructura tridimensional.

Técnicas de refinamiento cristalográfico. Validez del modelo molecular.

Estructura-función aplicada al estudio de mecanismos enzimáticos. Ejemplos de aplicación de la cristalografía de proteínas en enzimología molecular y estructural.

Interacción proteína-ligando por RMN

Estudio por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de procesos de intercambio y determinación de la conformación de ligandos y contactos proteína-ligando. Técnicas de RMN para la caracterización de la interacción en términos de constantes de equilibrio y cinéticas. Determinación de la superficie de contacto. Técnicas de Transferencia de NOE: utilidad y limitaciones. Uso de marcación selectiva con isótopos magnéticamente activos para la determinación de la estructura de complejos estables. Ejemplo de aplicación: estudio de la interacción de péptidos inhibidores con la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C.

Modelos de Evolución Molecular

- 1) Evolución molecular e inferencia filogenética. [1,2]
- 2) Modelos de sustitución de nucleótidos.
- 3) Modelos de sustitución de codones[3,4].
- 4) Modelos de sustitución de aminoácidos.[5,6]
- 5) Modelos de sustitución que tienen en cuenta la estructura protéica[7-9]
- 6) Modelos de divergencia secuencial con restricciones funcionales y estructurales [10]

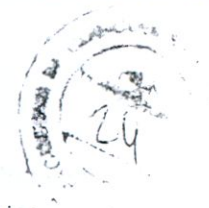
Cristalización de proteínas:

Aspectos básicos teóricos sobre la cristalización de proteínas. Solubilidad, soluciones saturadas y sobresaturadas. Parámetros que modifican la solubilidad.

Parámetros relacionados con la solubilidad de las proteínas en el equilibrio (aspectos termodinámicos) y fuera del equilibrio (cinéticos).

Métodos convencionales de crecimiento de cristales. Enfoques racionales para estimar las condiciones de cristalización.

Parámetros que influyen las condiciones de cristalización de nuevas proteínas.



Anticuerpos: estructura-función y reconocimiento

Bases genéticas de la diversidad de los anticuerpos. Relación entre genética, estructura y función: dominios constantes y variables. Zonas hipervariables. Sitio de combinación.

Bases estructurales del reconocimiento específico: reconocimiento de haptenos, carbohidratos, péptidos y proteínas. Termodinámica de la interacción antígeno-anticuerpo.

Ingeniería de anticuerpos. Clonado y expresión recombinante de fragmentos de anticuerpos. Phage display, ratones humanizados, anticuerpos de camélidos.

El control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico.

Esta clase trata de los diferentes pasos involucrados en la síntesis y procesamiento de oligosacáridos unidos a asparagina que ocurren en el lumen del retículo endoplásmico y de su relación con la adquisición por parte de las glicoproteínas de su estructura espacial correcta. Se pone un énfasis en la glucosilación transitoria de las glicoproteínas catalizada por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (GT) y la glucosidasa II (GII). La primera enzima tiene la propiedad especial de poner una señal, unida covalentemente, a las glicoproteínas que aún no se han plegado correctamente ya que cataliza la formación de Glc1Man7GlcNAc2, Glc1Man8GlcNAc2 y Glc1Man9GlcNAc2 unidos a proteínas, a partir de los oligosacáridos no glucosilados. La GT es una proteína soluble del retículo endoplásmico que reconoce dominios expuestos en conformaciones desnaturalizadas pero no en conformaciones nativas y el residuo GlcNAc mas interno de los oligosacáridos, que no es accesible a sondas macromoleculares en la mayoría de las conformaciones nativas. *In vivo*, los residuos Glc adicionados por la GT son removidos por la GII. Se hace también mención de la influencia de oligosacáridos en el plegamiento de glicoproteínas así como también sobre la participación de chaperonas-lectinas del retículo endoplásmico (calnexina y calreticulina), que reconocen oligosacáridos monoglucosilados, en el mismo proceso. Se discute un modelo sobre el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico, es decir, sobre el mecanismo por el cual las células reconocen la estructura espacial de las glicoproteínas y permiten únicamente el tránsito al aparato de Golgi de las moléculas bien plegadas. Los principales elementos de este control son calnexina y calreticulina, que retienen estructuras mal plegadas, la GT, que actúa como sensor de las estructuras espaciales y la GII que es el agente liberador de las glicoproteínas con la estructura espacial correcta.

Secreción de Proteínas en Bacterias

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para translocar proteínas cuyo destino final es la superficie celular o el medio extracelular. Dentro de estos sistemas se encuentran los sistemas de "autotransportadores" utilizados para transportar al medio extracelular factores como proteasas, invasinas y toxinas. Otros sistemas utilizan solo dos componentes (una chaperona y un acomodador) para secretar estructuras de adherencia como los pili. Otros secretan sus substratos solo a través de 3 componentes y en único paso desde el citoplasma hasta el medio extracelular. Al menos otros 3 sistemas mucho mas complejos formados por desde 11 a 20 componentes son responsables de la secreción de una gran diversidad de proteínas, que usualmente constituyen factores de virulencia. En esta sección del curso se describirán los últimos avances en el conocimiento de los sistemas de secreción de proteínas en bacterias, especialmente en detalle se describirán los sistemas de autotransportadores, el sistema chaperona-acomodador, el sistema tipo I y el sistema tipo IV.

Plegamiento de proteínas *in vivo*.

Reacciones de glucosilación en el ER y Golgi. Secreción de proteínas. Control de calidad de plegamiento más allá del ER. Degradación de glicoproteínas mal plegadas en proteasomas y/o Golgi. Enfermedades asociadas a mal plegamiento de glicoproteínas.

Metaloproteínas.

Iones metálicos como cofactores en proteínas. Esencialidad y toxicidad. Relación estructura-función. Geometría y preferencias de coordinación. Proteínas de zinc. Zinc en sitios estructurales. Enzimas de zinc: liasas e hidrolasas. Mecanismo de acción.

Modulación de la actividad enzimática. Diseño racional y evolución dirigida.

Diseño racional de proteínas vs. diseño por mutagénesis al azar. Técnicas de mutagénesis al azar. Mutagénesis química. Mutagénesis en una cepa "mutadora" de *E. coli*. Mutagénesis por PCR ("PCR error-prone"). Técnicas de recombinación *in vitro*. "DNA shuffling". Staggered extension process (StEP). Sequence homology-independent protein recombination (SHIPREC). Aplicación de la evolución dirigida de proteínas en la industria y en la investigación básica.

Análisis funcional de proteínas de membrana por mutagénesis dirigida.

Identificación de proteínas blanco. Mapeo de la interfase lípido-proteína. Análisis de interacciones lípido-lípido y lípido-proteína. Estudio de fenómenos dinámicos. Penetración de proteínas en bicapas. Translocación de proteínas a través de membranas. Fusión de membranas mediada por péptidos y proteínas

Métodos para el estudio de plegamiento de proteínas. Mecanismos de plegamiento de proteínas.

Introducción de métodos de estudio: fluorescencia y dicroísmo circular. Métodos al equilibrio, modelo de dos estados y criterios para definirlo. Métodos cinéticos, desplegamiento y replegamiento. Modelos de plegamiento: difusión-colisión, embudos y paisajes conformacionales

Expresión y actividad de proteínas de la matriz extracelular

Estructura de la matriz extracelular. Componentes estructurales de la membrana basal: laminina, colágeno y entactina. Rol de proteoglicanos. Integrinas: estructura y función como moléculas de señalización. Relación con Jnk y Mapk. Efecto sobre migración y proliferación celular. Rol de caveolinas. Anoikis.

Factores de transcripción bHLH-PAS, desarrollo y respuesta a hipoxia.

Las proteínas de la familia bHLH-PAS son factores de transcripción que desempeñan diversas funciones en el desarrollo y en la fisiología celular. En esta clase se discutirán los mecanismos que determinan la especificidad transcripcional de cada una de estas proteínas, como así también la manera en que están reguladas. A modo de ejemplo, se analizarán en detalle las proteínas Tracheless y Single minded de *Drosophila melanogaster* y el Factor Inducible por Hipoxia-1 (HIF-1). Se hará énfasis sobre los mecanismos post-traduccionales de regulación, en particular sobre el control de la estabilidad proteica.

Parte Práctica:

Trabajo de iniciación a la investigación en alguno de los laboratorios del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, bajo la supervisión de los encargados de la materia y del profesor correspondiente.

15.- BIBLIOGRAFIA

Bibliografía 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, PNAS, J. Mol. Biol. Biochemistry, etc.)
- Reviews sobre el tema publicados en revistas de nivel internacional (Current Opinion, Immunology Today, Current Biology, etc.).



Bibliografía específica

Síntesis de proteínas y su regulación:

Libros:

- Ribosome structure and protein biosynthesis. A. Spirin (1986).
- The ribosome: structure, function and evolution. W.E. Hill y col. (1990)
- Genes VII. B. Lewin (2000)
- The molecular biology of the cell. B. Alberts y col (1994)
- Molecular cell biology. Darnell, Lodishi y Baltimore (1990)
- Essential cell biology. B. Alberts y col. (1998)

Reviews

- Merrick, W.C. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. Microbiol. Rev., 56, 291-315 (1992).
- Kozak, Marilyn. Regulation of translation eukaryotic systems. Ann.Rev.Cell.Biol., 8, 197-225 (1992).
- Jacobson, A. and Pelz, S.W. Interrelationship of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. Ann.Rev.Biochem., 65, 693-740 (1996).
- Green, R. And Noller, H.F. Ribosomes and Translation. Ann. Rev. Biochem., 66, 679-716 (1997).
- A.C. Gingras, B. Raught and N. Sonenberg. eIF4 Initiation Factors. Ann. Rev. Biochem., 68, 913-963 (1999).

Artículos

- Noller, H.F., Hoffarth, V. and Zimniak, L. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. Science 256, 1416-1419 (1992).
- Nissen, P. et al. Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu and GTP analog. Science, 270, 1464-1472 (1995).
- Wilson, K.S. and Noller, H.F. Molecular movement inside the translational engine. Cell, 92, 337-349 (1998).
- Dever, T.E. Translation initiation: adept at adapting TIBS, 24, 398-403 (1999).

Interacción proteína-ligando por RMN

- L.Y. Yian y G.C.K. Roberts, en "NMR of Biological Macromolecules", Practical Approach Series, (G.C.K. Roberts, ed.), p. 153 Oxford Univ. Press, Oxford, 1993.
- Methods in Enzymology, vol. 239 Part C, (T.L. James and N.J. Oppenheimer, eds), pp 657-768, Academic Press, New York, 1994.
- D. Neuhaus y M. Williamson: "The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis", VCH Publishers, Inc., New York, 1984.

Modelos de evolución molecular

- S. Whelan, P. Lio and N. Goldman, *Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past*, Trends Genet 17 (2001) 262.
- P. Lio and N. Goldman, Genome Research 8 (1998) 1233.
- N. Goldman and Z.H. Yang, *Codon-Based Model of Nucleotide Substitution for Protein-Coding Dna-Sequences*, Molecular Biology and Evolution 11 (1994) 725.
- Z.H. Yang, R. Nielsen, N. Goldman and A.M.K. Pedersen, *Codon-Substitution Models for Heterogeneous Selection Pressure at Amino Acid Sites*, Genetics 155 (2000) 431.
- Z.H. Yang, R. Nielsen and M. Hasegawa, *Models of Amino Acid Substitution and Applications to Mitochondrial Protein Evolution*, Molecular Biology and Evolution 15 (1998) 1600.



- J.L. Thorne, *Models of protein sequence evolution and their applications*, Curr Opin Genet Dev 10 (2000) 602.
- J.L. Thorne, N. Goldman and D.T. Jones, *Molecular Biology and Evolution* 13 (1996) 666.
- J.M. Koshi, D.P. Mindell and R.A. Goldstein, *Using Physical-Chemistry-Based Substitution Models in Phylogenetic Analyses of Hiv-1 Subtypes*, Molecular Biology and Evolution 16 (1999) 173.
- A.L. Halpern and W.J. Bruno, *Evolutionary Distances for Protein-Coding Sequences: Modeling Site-Specific Residue Frequencies*, Molecular Biology and Evolution 15 (1998) 910.
- G. Parisi and J. Echave, *Structural constraints and emergence of sequence patterns in protein evolution*, Mol Biol Evol 18 (2001) 750.

Cristalización de proteínas:

- Crystallization of Biological Macromolecules Edited by Alexander McPherson. CSHL Press, New York 1999 (USA).
- Introduction to Protein Structure. Edited by Karl Branden and John Tooze. Garland Publishing INC. New York and London 1991.

Anticuerpos: estructura-función y reconocimiento

- Introduction to Protein Structure. Edited by Karl Branden and John Tooze. Garland Publishing INC. New York and London 1991.
- Fundamental Immunology. Edited by William Paul. Lippincott-Raven, New York, 1999.

El control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico.

- Protein Glucosylation and its Role in Protein Folding. Armando J. Parodi. Annual Review of Biochemistry, 69, 69-93 (2000)
- The Role of Oligosaccharide ER Processing Reactions in Glycoprotein Folding and Degradation. Armando J. Parodi. Biochemical Journal, 348, 1-13 (2000)

Secreción de proteínas en bacterias

- Thanassi DG, Hultgren SJ, Curr. Op. en Cell Biology 2000, 12:420-430
- Christie PJ Mol. Microbiol. 2001 40:294-305
- Andersen C, Hugues C, Koronakis V EMBO reports 2000, 1:313-318
- Henderson R, Navarro-Garcia, Nataro JP Trends in Microbiol. 1998 6:370-377
- Maurer J, Jose J, Meyer TF. J. Bacteriol. 1999 181:7014-7020
- Thanassi DG, Saulino ET, Lombardo MJ, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ Proc. Natl. Acad. Sci USA 1998 95:3146-3151
- Thanassi DG, Saulino ET, Hultgren SJ. Curr. Op. in Microbiology 1998 1:223-231
- Soto GE, Dodson KW, Ogg D, Liu C, Heuser J, Knight S, Kihlberg J, Jones CH, Hultgren SJ.
- Thanabalu T, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. EMBO J. 1998 17:6487-6496
- Letoffe S, Delepelaire P, Wanderman C. EMBO J. 1996 15:5804-5811
- Zorreguieta A, Finnie C, Downie A, J. Bacteriol. 2000 182:1304-1312
- Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Wolfgang F, Haas R. Science. 2000 287:1497-1500

FECHA

FIRMA PROFESOR:

Aclaración firma: Dr. Gonzalo Prat Gay – Dr. Fernando Goldbaum

FIRMA DIRECTOR:

Sello Aclaratorio:

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