



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

129B  
1985  
68

CURSO DE REGULACION METABOLICA

- Denominación: REGULACION METABOLICA
- Carácter del Curso: Para Doctorado - Ampliación de conocimientos
- Fecha de iniciación: 6 mayo 1985.
- Fecha de finalización: 26 julio 1985.
- Lugar: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA  
Obligado 2490 - 2º piso - (1428) Buenos Aires.
- Directora: DRA. MIRIHA MARIA FLAWIA.
- Cantidad de horas semanales: 35
- Condiciones de ingreso: Egresados de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la U.B.A.; Bioquímicos, Químicos y Médicos de la U.B.A. y Universidades Nacionales del Interior del país.
- Requisitos: enviar curriculum Vitae; una carta de recomendación de profesores de las distintas universidades.
- Fecha final de recepción de solicitudes: 15 abril 1985.
- Puntaje para el doctorado para alumnos de F.C.E. yN. = U.B.A.: 5 puntos.
- Forma de evaluación: Exámen parcial - Exámen final.

Aprobado por Resolución 000 300/85



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

## REGULACION METABOLICA.

### PROGRAMA

#### Curso teórico

Cinética enzimática: Orden de reacción. Teoría de los equilibrios rápidos. Teoría del estado estacionario. Inhibición enzimática: sus tipos. Activación enzimática. Teoría de los sistemas alostéricos: modelos. Catálisis enzimática. Modelos.

Regulación de la actividad enzimática: Niveles de regulación. Inducción y represión. Modificaciones covalentes de las enzimas. Proenzimas. Fosforilación enzimática. Interacción de las enzimas con macromoléculas y metabolitos. Circuitos de retroinhibición y/o modulación. Concepto de sistemas de amplificación en cascada. Concepto de isoenzimas.

Propiedades de las biomoléculas: Absorción y dispersión. Interacciones solvente cromóforo y cromóforo-cromóforo. Hipocromismo. Actividad óptica: ORD y CD. Determinación de la estructura secundaria en proteínas por medio del CD. Espectroscopía de fluorescencia: principios y aplicaciones. Propiedades de las biomoléculas en solución: Modelos hidrodinámicos. Viscosidad. Radio de Stokes. Velocidad de sedimentación. Electroforesis. Filtración por geles. Equilibrio de sedimentación.

Estructura y Función de las membranas biológicas : Componentes y modelos de estructura de las membranas. Modelo de Danielli y Dawson. Unidad de membrana. Modelo de Singer y Nicholson: concepto de fluidez. Métodos para el estudio de las membranas. Sistemas modelos: interfases agua-aire. Membranas negras. Liposomas.

#### Regulación de las funciones asociadas a membranas

Receptores: Receptores de membrana y acción hormonal. Relación entre actividad biológica y "binding". Identificación: consideraciones generales. Ensayos de "binding" a células y membranas. Cinética de la interacción hormona-receptor. Análisis del "steady state". Cooperatividad negativa versus heterogeneidad. Plot de Scatchard. Solubilización de receptores. Purificación.

Receptores localizados en las membranas. Insulina: Generalidades, ensayo y localización del receptor de insulina. Modificaciones enzimáticas. Cromatografía de afinidad. Purificación del receptor. Subunidades. Endocitosis. Función de los distintos polipéptidos. Proteína quinasa del receptor. Relación con los oncogenes y la transformación celular.

Aprobado per Resolución 2003/06



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Toxina del cólera: Receptores.  $G_{M1}$ . Estructura de la toxina. Binding de las subunidades. Activación de la adenilato ciclasa. Modelo del receptor móvil. Mecanismos de fusión celular. Transferencia de receptores. Coupling con la adenilato ciclasa.

Receptor del glucacón: Caracterización. Solubilización. Purificación. Receptores alfa y beta adrenérgicos. Agonistas y antagonistas. Activación de la  $G_s$  de la adenilato ciclasa. Interacción receptor-enzima. Receptores de narcóticos: Enkefalinas. Endorfinas. Mecanismos de analgesia. Inhibición de la ciclasa. Relación con hormonas hipofisarias.

Regulación de la acción hormonal. Nucleótidos cíclicos.  
Adenilato ciclasa: Localización. Relación con los fosfolípidos. Peso molecular de la holoenzima. Características termodinámicas de la reacción. Acción de los nucleótidos sobre la actividad enzimática. Efecto del GTP, Gpp-NH-p. Desensibilización. Activación por fluoruro, glucacón, toxina del cólera, etc. Solubilización. Parámetros hidrodinámicos y moleculares. Estimulación hormonal. Acoplamiento del receptor a la enzima. Papel del GTP,  $Ca^{++}$ , lípidos y movilidad de la membrana. Subunidades de la enzima: Componente catalítico y componentes regulatorios.

Regulación del componente catalítico: Acoplamiento con el componente regulatorio. Regulación hormonal de la  $G_s$  y  $G_i$ . Subunidades  $s$  y  $s_i$ ;  $i$  y  $i_i$ . Subunidad . Funciones. Toxina Pertussis. Estructura. Modo de acción. Mecanismos de inhibición de la adenilato ciclasa. Estructura del componente C. Forskolina. Regulación de la enzima en eucariontes inferiores.

Regulación de la subunidad  $G$ . Actividad de GTPasa. Relación con los genes 'ras' Oncogenes. Proteínas target. P21. Receptor del Factor de crecimiento epidérmico (EGF). GTPasa de los genes ras. Localización. Relación con la  $G_s$  Fosforilación. Actividad de proteína quinasa. Binding de GTP. Expresión de los genes ras en E. coli. Purificación de las P21.

Regulación de los niveles de AMP cíclico: Proteínas quinasas y fosfodiesterasas. Tipos de quinasa. Localización. Estructura. Regulación de las subunidades. Proteínas quinasa dependientes e independientes de AMP cíclico.  $Ca^{++}$  y Calmodulina. Fosfatasas. Proteína quinasa C. Rol como señal de superficie. Actividad promotora de tumores. Turnover de los fosfolípidos del inositol. Diacilglicerol. Movilización del  $Ca^{++}$ . Respuesta celular.

Regulación de la expresión genética en procariotes: Concepto de operón y de RNA mensajero policistrónico. RNA polimerasa y subunidades constitutivas. Los promotores y la iniciación de la transcripción. Terminación y antiterminación. El operón lactosa. Inducción y represión. El operón triptofano. El fenómeno de atenuación. Operones galactosa y arabinosa. Ciclos lítico y lisogénico de los fagos.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Organización y control de la expresión genética en eucariotes: Secuencias repetitivas y no repetitivas. Genes estructurales y su organización interna. "Clusters" genéticos. Genes múltiples y pseudogenes. Procesamiento de los RNAs. Mecanismos de splicing. hn RNA y mRNA. Nucleosomas y cromatina activa. Metilación y expresión genética.

Regulación de la replicación y dinámica del genoma : Concepto de replicación. Topología del proceso de replicación. Complejidad del sistema de replicación y reparación. Modelos de replicones: bacterias y fagos. Replicación y ciclo celular. Transposición en procariontes y eucariotes. Los retrovirus.

Bases moleculares de la variabilidad de las inmunoglobulinas: Síntesis de inmunoglobulinas. Anticuerpos. Recombinación. Reordenamiento..

Anticuerpos monoclonales: Fusión celular. Métodos de generación de anticuerpos monoclonales. Ensayo y detección. Aplicaciones: purificación por columnas de afinidad. Distintos usos.

Regulación de la fijación de nitrógeno: Nitrogenasas bacterianas, Purificación. Cinética de la fijación. Subunidades. Genes que codifican los distintos polipéptidos. Operón nif. Genes regulatorios y estructurales. Glutamina sintetasa. Utilización del  $\text{NH}_4$ . Inhibición por el oxígeno. Clonado y expresión de los genes nif.

#### Profesores participantes

Dr Héctor N Torres- Profesor Titular FCE y N UBA. Investigador Superior CONICET. Director del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular.

Dra Mirtha María Flawiá. Profesora Asociada. FCEy N UBA Investigadora Independiente-CONICET.

Dr Norberto D Judewicz- Profesor Adjunto FCE y N UBA- Investigador Adjunto-CONICET.

Dra Susana Passeron. Profesora Titular- Investigadora Principal CONICET.

Handwritten signature or initials.

Handwritten signature or initials.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Curso Práctico

1. Purificación de la adenilato ciclasa de Neurospora crassa.
2. Determinación de parámetros cinéticos y moleculares.
3. Regulación hormonal de la adenilato ciclasa de hígado.
4. Técnicas físicas para el estudio de macromoléculas: Ultracentrifugación en gradientes; gradientes isopícnicos y sedimentación en gradientes. Concepto de densidad, volumen parcial específico y constante de sedimentación. Filtración en geles; concepto de radio de Stokes. Cromatografía de intercambio iónico e hidrofóbica. Electroforesis en geles. Enfoque isoeléctrico. Espectrofotometría y espectrofluorometría de macromoléculas; sus distintos tipos.
5. Purificación de enzimas por columnas de anticuerpo monoclonal-sefarosa.
6. Electroblooming y precipitación "in situ".

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

73

BIBLIOGRAFIA:

1. Cellular Energy Metabolism and its Regulation, Daniel Atkinson, Academic Press, Inc.
2. Enzyme Kinetics, Irwin Segel.
3. Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein - Toshiaki Katada and Michio Ui - Proc.Natl.Acad.Sci. USA, vol 79, 3129-3133 (1982).
4. Control of insulin receptor level in 3T3 cells: Effect of insulin-induced down-regulation and dexamethasone-induced up-regulation on rate receptor inactivation, Victoria P.Knutson, Gabrielle V.Ronnett and M.Daniel Lane, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, vol 79, 2822-2826, (1982).
5. The  $\alpha$ -adrenergic receptor: Rapid purification and covalent labeling by photoaffinity crosslinking, Robert G.L.Shorr, Sarah L.Heald, Peter W.Jeffs, Thomas N.Lavin, Mark.W.Strohsacker, Robert J.Lefkowitz and Marc G.Caron, J.Biol.Chem., vol. 79, 2778-2783, (1982).
6. Purification and properties of the regulatory component (G/F) of Adenylate cyclase, Paul C.Sternweis, John K.Northup, Emanuel Hanski, Leonard S.Schleifer, Murray D.Smigel and Alfred G.Gilman, Adv. in Cyclic Nucl.Res., Vol. 14, (1981).
7. Reconstitution of the primary action of an hormone receptor using solubilized components, Michael Schramm, Yoav Citri, Gera Neufeld, Mira Korner and Sara Eimerl, Adv.in Cyclic Nucl.Res., vol. 14, (1981).
8. Genetic analysis of hormone-sensitive adenylate cyclase, Gary L.Johnson, Harvey R.Kaslow, Zvi Farfel and Henry R.Bourne, Adv. in Cyclic Nucl. Res.,vol. 13, (1980).
9. Biochemical Properties of hormone-sensitive adenylate cyclase, Elliott M.Ross, Ann.Rev.Biochem., vol 49, 533-564, (1980).
10. Gene Expression, vol 1,2,3, Benjamin Lewin, John Wiley & Sons.
11. Molecular mechanisms of protein biosynthesis, H.Weissbach and S.Pestka, Academic Press.
12. From DNA to Protein: the transfer of genetic information, M.Szekely, John Wiley and Sons.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

13. Physical Biochemistry, Kensal Eward Van Holde, Prentice-Hall.
14. Experimental Techniques in Biochemistry, J.M. Brewer, A.J. Pesce and R.B. Ashworth, Prentice-Hall.
15. Physical Chemistry of Macromolecules, Ch. Tanford.
16. G. Proteins and Dual Control of Adenylate Cyclase, Alfred G. Gilman (1984), Cell 36 (3), 577-579.
17. Message transmission: Receptor Controlled Adenylate Cyclase System Michael Schramm and Zvi Selinger (1984), Science 225, 1350-1356.
18. Effects of Guanine Nucleotides and Mg on Human Erythrocyte  $N_i$  and  $N_s$ , the regulatory components of Adenylate Cyclase, Juan Codina, John O. Mildebrandt, Lutz Birnbaumer and Ronald D. Sekma (1984), J. Biol. Chem. 259 (18), 11408-11418.
19. Purification and Properties of the Inhibitory Guanine nucleotide-binding regulatory component of Adenylate Cyclase, Gary M. Bokoch, Toshicki Katada, Shon K. Northup, Michio Ui and Alfred G. Gilman (1984), J. Biol. Chem. 259 (6), 3560-3567.
20. Reconstitution of a Hormone-sensitive Adenylate Cyclase System, the pure  $\beta$ -adrenergic receptor and guanine nucleotide regulatory protein confers hormone responsiveness on the resolved catalytic unit, Richard A. Cerione, David R. Sibley, Juan Codina, Jeffrey L. Benovic, John Winslow, Eva J. Neer, Lutz Birnbaumer, Marc G. Caron, and Robert J. Lefkowitz (1984), J. Biol. Chem. 259 (16), 9979-9982.
21. Mutant "ras" Proteins and cell transformation, Rob Newbold (1984), Nature 310, 628-629.
22. Comparative Biochemical Properties of Normal and Activated Human "ras" p21 protein, John P. Mc Grath, Daniel J. Capon, David V. Golddel and Arthur D. Levinson (1984), Nature 310, 644-649.
23. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion, Nishizuka, Y., Nature 308, 693, (1984).
24. Protein Phosphorylation, Cold Spring Harbor Conference on cell proliferation, Rosen and Krebs, eds., vol 8, Academic Press (1983) Book A, Book B.