



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

6QB88

Post-Grado

DEPARTAMENTO: QUIMICA BIOLOGICA

ASIGNATURA: REGULACION METABOLICA - AÑO 1987

CARRERA: CURSO DE GRADO Y POST-GRADO

ORIENTACION: QUIMICA BIOLOGICA

CARACTER: optativa

DURACION DE LA MATERIA: cuatrimestral

HORAS DE CLASE: a) Teóricas	90 hs.	b) Problemas	30 hs.
c) Seminarios	30 hs.	d) Laboratorio	330 hs.
		e) Totales	480 hs.

PROGRAMA

Curso Teórico

Dr. Norberto Judewicz

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.

Dra. Cella E. Coto
Directora Interina
Departamento de Química Biológica

Aprobado por Resolución CD 627/86

Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIÁ
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Dra. María Teresa Téllez-Iñón

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.

Dr. Alejandro A. Paladini

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.

Dr. Héctor N. Torres

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.

Dra. Mirtha M. Flawiá

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.

Dra. Cella E. Coto
Directora interina
Departamento de Química Biológica

Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIÁ
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Función de los distintos polipéptidos. Proteína quinasa del receptor. Relación con los oncogenes y la transformación celular.

Toxina del cólera: Receptores. GM_1 . 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 de glucagón: Caracterización. Solubilización. Purificación.

Receptores alfa y beta adrenérgicos: Farmacología. 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.

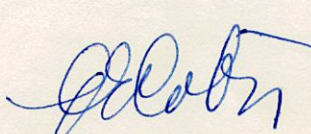
Receptores de acetilcolina: Muscarínicos y nicotínicos. Estructura y localización. Actividad ionófora del canal de acetilcolina. Interacción lípido-proteína. Farmacología.

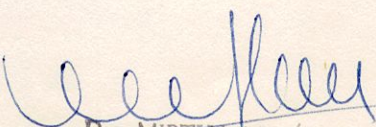
Endocitosis: Desensibilización hormonal. Internalización de receptores. "Clathrin coated vesicles" y Receptosomas. Reciclaje.

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, glucagón, 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. Anticuerpos monoclonales.

Regulación del componente catalítico: Acoplamiento con el componente regulatorio. Regulación hormonal de la G_s y G_i . Subunidades α_s y β_s ; α_i y β_i . Subunidad γ . Funciones. Toxina Pertussis. Estructura. Modo de acción. Mecanismos de inhibición de la adenilato ciclasa. Estructura del componente C.


Dra. Celia E. Coto
Directora Interina
Departamento de Química Biológica


Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIA
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Forskolina. Regulación de la enzima en eucariontes inferiores.

Regulación de la Subunidad G: Actividad de GTPasa. ADP ribosilación. Toxinas del cólera y Pertussis. Hormonas inhibitorias de la adenilato ciclasa. Gi y Subunidad B. Mecanismos de acción.

Reconstitución de sistemas: Interacción entre las distintas subunidades. Vesículas fosfolípicas. Actividad de GTPasa y de b de GTP. Sistemas homólogos purificados. Sistemas heterólogos. Coupling R-G-C. RGS de membranas de eucariotes superiores y componente C de eucariotes inferiores. Evolución de las distintas subunidades.

Sistema G de membranas: Rhodopsina, transducina. 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 Gs. Fosforilación. Actividad de proteína quinasa. Binding de GTP. Expresión de los genes ras en E.coli. Purificación de las P21. Genes ras humanos y de levaduras.

Dra. María Teresa Téllez-Iñón

Regulación de los niveles de AMP cíclico: Proteínas quinasas y fosfodiesterasas. Tipos de quinasa. Localización. Estructura. Regulación de las subunidades. Proteínas quinasas dependientes e independientes de AMP cíclico. Ca^{++} y Calmodulina.

Proteína quinasa C: Rol como señal de superficie. Actividad promotora de tumores. Turnover de los fosfolípidos del inositol. Diacilglicerol. Movilización del Ca^{++} . Respuesta celular. Esteres de forbol.

Proteínas quinasas y fosfodiesterasas de Eucariotes inferiores: Tipos de quinasas. Regulación de las distintas subunidades.

Dra. Celia E. Coto
Directora Interina
Departamento de Química Biológica

Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIA
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Dra. Mirtha M. Flawiá

Receptores de hormonas vegetales: Auxinas y citoquininas. Localización intracelular. Propiedades y Purificación. Funciones. Segundos mensajeros. Nucleótidos cíclicos. Adenilato ciclase de leguminosas. Caracterización y Purificación. Localización en los distintos tejidos vegetales.

Regulación de la expresión de genes que codifican para hormonas en animales transgénicos: Introducción de genes heterólogos en animales. Construcción de genes por fusión. Secuencias reguladoras. Promotor de la metalotioneína. Integración de los genes heterólogos al DNA cromosómico. Inducción de la expresión. Expresión en ratones transgénicos. Metilación de los nuevos genes. Transmisión hereditaria. Expresión de la hormona de crecimiento. Fusión: metalotioneína-hormona de crecimiento humana. Corrección parcial de enfermedades hereditarias.

Mecanismos de regulación del proceso de contracción muscular: Placa neuromuscular. Componentes proteicos del músculo: Actomiosina. Sistema Troponina. Troponina B. Rol de la Ca^{++} intracelular. ATPasas. Proceso de contracción y relajación muscular. Regulación nerviosa y hormonal. Fosforilación.

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 del nitrógeno: Simbiosis bacteria leguminosa. Infección y nodulación. Propiedades y estructura del nódulo. Bacteroides. Nitrogenasas bacterianas. Purificación. Cinética de la fijación. Subunidades. Genes que codifican los distintos polipéptidos. Operón nif . Genes regulatorios y estructurales. Glutamino sintetasa. Utilización del NH_4 . Inhibición por el oxígeno. Regulación de la expresión de los genes nif .

Dra. Celia E. Coto
Directora Interina
Departamento de Química Biológica

Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIÁ
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIBLIOGRAFIA:

- Enzyme Kinetics, Irwin Segel
- The β -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).
- 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).
- Genetic Analysis of hormone-sensitive adenylate cyclase. Gary L. Johnson, Harvey R. Kaslow, Zvi Farfel and Henry Bourne. *Adv. in Cyclic Nucl. Res.*, vol. 13 (1980).
- Biochemical Properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. Elliot M. Ross. *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 49, 533-564 (1980).
- Physical Biochemistry. Kensal Eward Van Holde, Prentice Hall.
- Experimental Techniques in Biochemistry. J.M. Brewer, A.J. Pesce and R.B. Ashworth, Prentice Hall.
- G Proteins and Dual Control of Adenylate Cyclase. Alfred G. Gilman (1984). *Cell* 36 (3), 577-579.
- Message transmission: Receptor Controlled Adenylate Cyclase System. Michael Schram and Zvi Selinger (1984), *Science* 225, 1350-1356.

Dra. Cella E. Coto
Directora Interina
Departamento de Química Biológica

Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIA
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

- Effects of Guanine Nucleotides and Mg on Human Erythrocyte N_i and N_s , the regulatory components of Adenyl Cyclase. Juan Codina, John O. Mildebrandt, Lutz Birnbaumer and Ronald D. Sekma (1984), J.Biol.Chem. 259 (18), 11408-11418.
- 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.
- Reconstitution of a Hormone-sensitive Adenylate Cyclase System, the pure α -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.
- Mutant "ras" Proteins and cell transformation. Rob Newbold (1984), Nature 310, 628-629.
- Comparative Biochemical Properties of Normal and Activated Human "ras" p21 protein. John P. McGrath, Daniel J. Capon, David V. Golddel and Arthur D. Levinson (1984), Nature 310, 644-649.
- The Role of Protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nishizuka, Y., Nature 308, 693, (1984).
- Stimulatory GTP Regulatory Unit N_s and the Catalytic Unit of Adenylate Cyclase are Tightly Associated: Mechanistic Consequences Hadas Arad, Jurg P. Rosenbusch and Alexander Levitzki. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, 6579-6583 (1984).

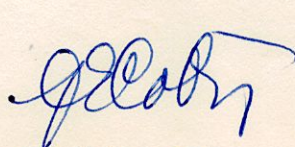
Dra. Celia E. Coto
Directora Interina
Departamento de Química Biológica

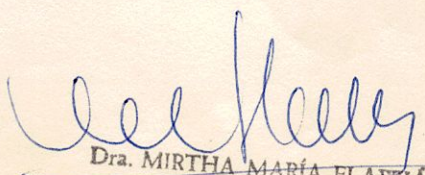
Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIA
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

- Message Transmission: Receptor Controlled Adenylate Cyclase System - Michael Schramm and Zvi Selinger - Science vol. 225, 1350-1356 (1984).
- Protein Kinase Activities in Neurospora crassa. Judewicz, N.D., Glikin, G.C. y Torres, H.N. Arch. Biochem. Biophys. 206; 87, 1980.
- Mn^{2+} Dependent Adenylate Cyclase in Rat Testis: Purification and Properties. Kornblihtt, A.R., Flawiá, M.M. y Torres, H.N., Biochemistry 20; 1262, 1981.
- Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activities in Neurospora crassa. Téllez-Iñón, M.T., Glikin, G.C. y Torres, H.N. Biochem. J. 203, 611, 1982.
- Soluble Adenylate Cyclase Activity in Neurospora crassa. Reig, J.A., Kornblihtt, A.R., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. Biochem. J. 207, 43, 1982.
- Reconstitution of a Hormone-Sensitive Adenylate Cyclase with Membrane Extracts from Neurospora and Avian Erythrocytes. Flawiá, M.M. Kornblihtt, A.R., Reig, J.A. and Torres, H.N. J. Biol. Chem. 258, 8255, 1983.
- Monoclonal Antibodies to Neurospora Adenylate Cyclase. Molina y Vedia, L., Torruella, M., Attar, R., Podestá, E., Reig, J.A., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. Biochem. Biophys. Res. Commun. 113, 778, 1983.
- Activation of Neurospora crassa Soluble Adenylate Cyclase by calmodulin. Reig, J.A., Téllez-Iñón, M.T., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. Biochem. J., 221, 541, 1984.


Dra. Celia E. Coto
Directora Interina
Departamento de Química Biológica


Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIÁ
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

- Characterization of N.crassa cAMP Phosphodiesterase Activated by calmodulin. Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R., Glikin, G.C. y Torres, H.N. Biochem.J. 232, 425-430, 1985.
- Calmodulin and Ca^{2+} Dependent Cyclic AMP phosphodiesterase Activity in T.cruzi. Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R., Torruella, M. y Torres, H.N. Mol.Biochem.Parasitol., in press, 1985.
- Chemical Probing of the Light-induced Interaction between Rhodopsin and G-protein. Klaus P. Hofmann and Johannes Reichert. J.Biol.Chem., 260, 7990-7995, 1985.
- The G-protein of Retinal Rod Outer Segments (Transducin). Nelly Bennett and Yves Dupont. J.Biol.Chem. 260, 4156-4168, 1985.
- Pertussis toxin inhibitor of chemotaxis and the ADP-ribosylation of a membrane protein in a human-mouse hybrid cell line. Peter S. Backlund Jr., Bruce D. Meade, Charles R. Manclark, Giulio L. Cantoni and Robert R. Aksamit. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 82, 2637-2641, 1985.
- Tyrosine phosphorylation within the amino-terminal domain of pp60^{c-src} molecules associated with polyoma virus middle-sized tumor antigen. W. Yonemoto, M. Jarvis-Morar, J.S. Brugge, J.B. Bolen and M.A. Israel. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 82, 4568-4572, 1985.
- Mutations of the ras genes product p21 that abolish guanine nucleotide binding. Clanton, D. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 83, 5076-5080, 1986.
- T.cruzi Adenylate Cyclase Activity. Purification, Characterization and Preparation of Monoclonal Antibodies. Torruella, M., Flawiá, M.M., Eisenschlos, C., Molina y Vedia, L., Rubinstein, C. y Torres, H.N. Biochem.J. 234, 145, 1986.

Dra. Celia E. Coto
Directora Interina
Departamento de Química Biológica

Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIÁ
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

- Reconstitution of a Hormone-Sensitive Adenylate Cyclase with Membranes from Rat Liver and Trypanosoma cruzi. Flawiá, M.M., Torruella, M., Eisenschlos, C. y Torres, H.N. Biochem.J. 236, 185, 1986.
- Evidence on the Existence of a Gs Regulatory Protein in Trypanosoma cruzi membranes. Eisenschlos, C., Paladini, A.A., Molina y Vedia, L. Flawiá, M.M. y Torres, H.N. Biochem.J. 237, 913, 1986.

Dra. Celia E. Coto
Directora Interina
Departamento de Química Biológica

Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIÁ
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires



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: Ultra-centrifugación 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 afinidad de anti-cuerpo monoclonal-sefarosa.
6. Electroblotting y precipitación "in situ"
7. Adenilato ciclasa de Trypanosoma cruzi
8. Reconstitución de sistemas heterólogos R-G-C
9. ADP³² ribosilación en Gs de T.cruzi y N.crassa
10. Nucleótidos cíclicos en sistemas vegetales.

Dra. Cella E. Coto
Directora Interina
Departamento de Química Biológica

23-12-86

Dra. MIRTHA MARÍA FLAWIA
Profesora Asociada
Facultad de Ciencias Exactas y N-
Univ. de Buenos Aires