



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

20QB 1989

CURSO DE BIOQUIMICA AVANZADA

REGULACION METABOLICA

1989

Programa teórico

Dr. Héctor N. Torres

MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Estructura-Biogénesis. Lípidos. Proteínas. Canales. Uniones. Componentes y modelos de estructura de membranas. Modelo de Danielli y Dawson. Unidades de membranas. Modelo de Singer y Nicholson: concepto de fluidez. Métodos para el estudio de membranas. Sistemas modelos: interfases agua-aire. Membranas negras. Liposomas.

Membranas. Dinámica

Interacción célula-célula. Matriz extracelular. Endocitosis. Exocitosis. Transporte. Dominios Clatrin. *Coated vesicles*. Receptosomas. Reciclaje.

Dra. Mirtha M. Flawiá

REGULACION DE LAS FUNCIONES ASOCIADAS A MEMBRANAS

Receptores

Receptores de membrana y acción hormonal. Relación entre *binding* y actividad biológica. 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. Parámetros moleculares e hidrodinámicos.

Receptor de Insulina

Generalidades. Ensayo y localización. Modificaciones enzimáticas. Cromatografía de afinidad. Purificación del receptor. Subunidades. Endocitosis. Función de los distintos polipéptidos. Proteínas quinasas de serina y tirosina. Mecanismos de autofosforilación del receptor. Relación con los oncogenes y la transformación celular. Clonado molecular del receptor. Análisis de los diferentes dominios de la secuencia. Homología con factores de crecimiento.

DR. M. SUSANA U. B. DE PASSERON
DIRECTORA
DTG. QUIMICA BIOLÓGICA

BR SUBCOMISIÓN
DOCTORADO

DR. MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Toxina del cólera

Receptores. GM1. Estructura de la toxina. *Binding* de las subunidades. Activación de la adenilato ciclasa. Modelo del receptor móvil. Toxina *pertussis*. Estructura. Modo de acción. Interacción con subunidades inhibitorias.

Receptor del glucagón

Caracterización. Solubilización. Purificación.

Receptores alfa y beta adrenérgicos

Farmacología. Agonistas y antagonistas. Activación de la Gs de adenilato ciclasa. Interacción receptor-enzima. Purificación. Topografía. Zonas transmembranas. Localización de los sitios de *binding*. Glicosilación. Fosforilación. *Coupling* con la adenilato ciclasa. Proteínas quinasas del receptor. Desensibilizaciones homólogas y heterólogas. Homología con receptores de rodopsina y muscarínicos. Clonado. Híbridos.

Receptores de narcóticos

Enkefalinas. Endorfinas. Tipos de receptores. Estructura. Segundos mensajeros. Inhibición de la adenilato ciclasa. Mecanismos de analgesia. Relación con hormonas hipofisiarias.

Receptores de acetil colina

Muscarínicos y nicotínicos. Estructura y localización. Interacción lípidos proteínas. Clonado. Zonas transmembranas. Fosforilación. Glicosilación. Unión al ligando. Cooperatividad entre los sitios. Formación del canal iónico. Interacción con Gi, etc.

REGULACION DE LA ACCION HORMONAL. NUCLEOTIDOS CICLICOS

Adenilato ciclasa

Localización. Peso molecular de la holoenzima. Características termodinámicas de la reacción. Acción de los nucleótidos sobre la actividad enzimática. Efecto del GTP. GTP análogos. F, Al, toxinas y hormonas. Parámetros hidrodinámicos y moleculares.

Componente catalítico

Interacción con el componente regulatorio. Regulación. Purificación. Forskolina y Mn⁺⁺.


DRA. M. SUSANA D. B. DE PASSERON
DIRECTORA
DTP. QUIMICA BIOLÓGICA

DRA. MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA

Por suscripción de

DOCTORADO



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Componentes regulatorios

Subunidades estimuladoras e inhibitorias (Gs-Gi). Subunidades $\beta\gamma$. Criterios para caracterizar una proteína G. Funciones reguladas por G. Estructuras moleculares. Interacciones ligando-proteína G; Receptores proteína G; Proteínas G y efectores; Proteínas G y membranas. Modificaciones covalentes. ADP ribosilación. Actividad de GTPasa.

Diferentes tipos de G (Gs, Gi, Go, Gp, etc). Clonado molecular; zonas de homología de secuencias. Modelo de Halliday. Fusión de membranas. Reconstitución de sistemas. Liposomas.

Regulación del mecanismo de visión

Receptor de rodopsina. Transducina. Fosfodiesterasa y guanilato ciclasa. Interacción entre las distintas subunidades. Retinitis pigmentosa. Mutante rd.

Receptores olfatorios y gustativos

Regulación. Caracterización y segundos mensajeros.

Adenilato ciclasa en eucariotes inferiores y procariotes


Control por el AMP cíclico del crecimiento y la diferenciación. Proto y Holociclasas. Adenilato ciclasa de *Neurospora crassa*, *Mucor rouxii*, *Trypanosoma cruzi*, etc. Reconstitución de sistemas: Receptor G-C. Subunidades homólogas y heterólogas. Anticuerpos monoclonales. Evolución de los distintos componentes proteicos. Adenilato ciclasas de cianobacterias y rizobium. Purificación y caracterización.

Adenilato ciclasa de plantas superiores

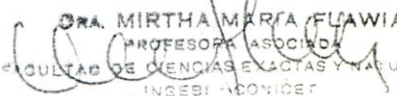
Localización. Purificación. Regulación por Ca y calmodulinas. Proteínas G. Localización. ADP ribosilación. Regulación por la luz. Guanilato ciclasas. Localización, caracterización y regulación por auxinas y citoquininas.

Genes ras

Proteínas target. p21. GTPasa de los genes ras. Localización. Relación con Gs. Fosforilación. Binding de GTP. Expresión de genes ras en *E. coli*. Mutantes. Relaciones con: adenilato ciclasa, crecimiento celular, utilización de fuentes de carbono, etc. Clonado y secuenciación. Genes ras humanos. Oncogen mas.


Por subcomisión de
DOCTORADO


DRA. M. SUSANA D. B. DE PASSERON
DIRECTORA
DTG. QUIMICA BIOLÓGICA


DRA. MIRTHA MARÍA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERÍA QUÍMICA



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Dra. María T. Téllez-Iñón

REGULACION DE LOS NIVELES DE AMP CICLICO

Proteínas quinasas y fosfodiesterasas

Tipos de quinasas. Localización. Estructura. Separación. Rotulación de las subunidades. Quinasas dependientes e independientes de AMP cíclico.

Regulación de las señales extracelulares

Mecanismos asociados a Ca y calmodulina. Calmodulina. Estructura y función. Activación de enzimas. Regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Hormonas que lo movilizan. Inhibidores del sistema.

Proteína quinasa C

Rol como señal de superficie. Actividad promotora de tumores. Turnover de los fosfolípidos del inositol. Diacilglicerol. Respuesta celular. Esteres de forbol.

Proteínas quinasas que fosforilan tirosina

Sustratos. Interrelación del sistema quinasas de serina, tirosina y treonina.

Ciclo celular

Regulación del crecimiento celular. Oncogenes. Relación con factores de crecimiento. Sistemas de fosfoinositidos.

Dra. Mirtha M. Flawiá

REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES

Animales transgénicos.

Introducción de genes heterólogos en animales. Construcción de genes por fusión. Secuencias reguladoras. Promotores. Metalotioneina. Integración de los genes heterólogos en el DNA cromosómico. Inducción de la expresión. Expresión en rayones transgénicos. Metilación de los nuevos genes. Transmisión hereditaria.


DRA. M. SUSANA D. B. DE PASSERON
DIRECTORA
Dpto. Químico

FOR SUBCOMISION DE
DOCTORADO

DRA. MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERO CONICET




UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Expresión del gen de la hormona del crecimiento

Promotores. Regulación. Integración. Análisis del DNA-RNA y proteínas de fusión. Inducción de la expresión. Corrección de enfermedades hereditarias.

Thyl; elastasa. Antígenos de SV 40; c myc; c fos; alfa fetoproteína, insulina, gamma y beta globina; protamina, beta lactoglobulina, etc. Regulación de promotores. Terapias génicas. Corrección y obtención de mutantes.

Regulación de la expresión de genes en plantas

Agrobacterium tumefaciens. Infección. Plásmido Ti; T-DNA; Genes vir. Regulación. Inducción. Siringonas y flavonoides. Proceso de transferencia. Octopinas y nopalinas. Genes marcadores. Genes quimeras. Expresión de genes bacterianos en plantas. Plantas resistentes a plaguicidas, antibióticos e insectos. Clonado de genes lux. Expresión. Genes regulados por fitocromos y luz.

Regulación de la fijación de nitrógeno

Simbiosis bacteria-leguminosa. Infección y nodulación. Propiedades y estructura del nódulo. Genes. Bacteroide. Nitrogenasas. Purificación. Cinética de la fijación. Subunidades. Genes que codifican los distintos polipéptidos. Operon nif. Genes regulatorios y estructurales. Glutamino sintetasa. Utilización del NH₄. Inhibición por el O₂. Regulación de la expresión de los genes nif. Mutantes.

En cada tema se desarrollarán clases de problemas y seminarios.

DR^A M[°] SUSANA D. B. DE PASSERON
DIRECTORA
D^{TO}. QUIMICA BIOLÓGICA

Por subcomisión de
DOCTORADO

DR^A MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGESI - CONICET



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Curso Práctico

Lic. Jorge Muschietti, Dra. Ana Pastini, Lic. Horacio Martinetto,
Lic. María Laura Gómez, Lic. Leonardo Erijman

- 1) Caracterización, purificación y regulación de adenilato ciclasas de eucariotes inferiores y superiores.
- 2) Proteínas G: Purificación y caracterización: actividad GTPasa, unión de GTP y ADP ribosilación.
- 3) Reconstitución de sistemas heterólogos R-G-C.
- 4) Transducción de señales en plantas.
- 5) Purificación parcial de quinasas de proteína C de cerebro. Dependencia de Ca^{2+} y fosfolípidos.

Por subcomisión de
DOCTORADO

DRA. M^{te} SUSANA D. B. DE PASSERON
DIRECTORA
DTO. QUIMICA BIOLÓGICA

DRA. MIRTHA MARIA FLAVIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERO CONICET



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIBLIOGRAFIA

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).

Protein kinase activities in *Neurospora crassa*. Judewicz, N.D., Glikin, G.C. y Torres, H.N. *Arch. Biochem. Biophys.* 206, 87 (1980).

Mn²⁺-dependent adenylate cyclase in rat testis: Purification and properties. Kornblihtt, A.R., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. *Biochemistry* 20, 1262 (1981).

Adenosine 3'5' phosphate in fungi. Pall, M. *Microbiological Reviews*, vol. 45, 462 (1981).

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).

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).

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).

DR. MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGEBI - CONICET

DR. M. SUSANA O. B. DE PASSERON
DIRECTORA
BIOQUIMICA BIOL.

En SUBCOMISIÓN
DE DOCTORADO



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

G Proteins and dual control of adenylate cyclase. Alfred G. Gilman. *Cell* 36 (3), 577-579 (1984).

Message transmission: Receptor controlled adenylate cyclase system. Michael Schram and Zvi Selinger. *Science* 225, 1350-1356 (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).

Effects of guanine nucleotides and Mg on Human erythrocyte N_s and N_i , the regulatory components of adenylyl cyclase. Juan Codina, John O. Mildegrandt, Lutz Birnbaumer and Ronald D. Sekma. *J. Biol. Chem.* 259, 11408-11418 (1984).

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. *J. Biol. Chem.* 259 (6), 3560-3567 (1984).

Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase system, the pure β -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. *J. Biol. Chem.* 259 (16), 9979-9982. (1984).

Mutant "ras" proteins and cell transformation. Rob Newbold. *Nature* 310, 628-629 (1984).

The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nishizuka, Y. *Nature* 308, 693 (1984).

Regulatory proteins. Miles D. Houslay. *Trends Biochem. Sci.*, vol 9, 39-40 (1984).

[Handwritten signature]
POR SUBCOMISION DE
DOCTORADO

[Handwritten signature]
DRA. M. SUSANA D. B. DE PASSERON
DIRECTORA
DTOR QUIMICA BIOLÓGICA

[Handwritten signature]
DRA. MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERIA QUÍMICA



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

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).

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.* 17, 143 (1985).

The G-protein of retinal rod outer segments (Transducin). Nelly Bennett and Yves Dupont. *J. Biol. Chem.* 260, 4156-4168 (1985).

Involvement of circular intermediates in the transfer of T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. Konkilikova, Z., Wang, K., Van Montagu, M. and Zembryski, P. *Nature* 313, 193 (1985).

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).

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 for the existence of an N_i type regulatory protein in *Trypanosoma cruzi* membranes. Eisenschlos, C., Paladini, A., Molina y Vedia, J., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. *Biochem. J.* 237, 913 (1986).

Studies and perspectives of protein kinase C. Nishizuka, Y. *Science* 233, 305-312 (1986).

Por submisión de
DOCTORADO

DRA. M^{te} SUSANA D. B. DE PASSERON
DIRECTORA
Dpto. QUIMICA BIOLÓGICA

DRA. MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERO - CONICET



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with maize gene. Meyer, P., Forkmann, G. y Saedler, H. *Nature* 330, 677 (1987).

Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. Koncz, C., Olsson, O., Landridge, W., Szdey, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 131 (1987).

Did vertebrate signal transduction mechanisms originate in eukaryotic microbes?. Janssens, P. *TIBS* 12, 457 (1987).

Regulation of ciliary adenylate cyclase by Ca^{2+} in *Paramecium*. Justin, M. and Nelson, D. *Biochem. J.* 246, 337 (1987).

Hormone genes and crown gall disease. *Tibs* 12, 271 (1987).

G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 615 (1987).

The multiple membrane spanning topography of the β_2 adrenergic receptor. Dohlman, H., Benovic, J., Caron, M. y Lefkowitz, R. *J. Biol. Chem.* 262, 14282 (1987)

Molecular basis of transmembrane signal transduction in *Dictyostelium discoideum*. Janssens, P., Van Haasterb, p. *Microbiological Reviews.* vol. 51, 396 (1987).

The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. *Science* 241, 42-52 (1988).

Cellular Regulators. *Methods in Enzymol.* 139. Eds. A.R. Means and Conn, P.M. (1987)

Por subcomisión de
DOCTORADO

DRA. M. SUSANA D. B. DE PASSERON
DIRECTORA
DTD. QUIMICA BIOLOGICA

DRA. MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERO EN QUIMICA



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Heart and bone tumors in transgenic mice. Behringer, R., Peschon, J., Messing, A., Gartside, C., Palmiter, R. and Brinster, R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2648 (1988).

Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. Smith, C.J., Watson, C., Ray, J., Bird, C., and Guerson, D. Nature 334, 724 (1988).

Adenylate cyclase in a higher plant. Carricarte, V., Bianchini, G., Muschietti, J., Téllez-Iñón, M.T., Peticari, A., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. Biochem. J. 249, 807 (1988).

A deletion truncating the gonadotrophin releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. Mason, A., Hayflick, J., Zoeller, T. and Seeburg, P. Science 234, 1366 (1988).

Transgenic Animals. Jaenisch, R. Science 240, 1462 (1988).

Over-expression of low density lipoprotein (LDL) receptor eliminates LDL from plasma in transgenic mice. Hofmann, S., Russell, D., Brown, M., Goldstein, J. and Hammer, R. Science 239, 1279 (1988).

An adenylate cyclase from *Saccharomyces cerevisiae* that is stimulated by RAS proteins with effector mutations. Marshall, M., Gibbs, J., Scolnick, G. and Sigal, I. Mol. and Cell. Biol., vol 8, 52 (1988).

G protein involvement in receptor-effector coupling. Casey, P., Gilman, G. J. Biol. Chem. 263, 2577 (1988).

Transmembrane signalling to adenylate cyclase in mammalian cells and in *Saccharomyces cerevisiae*. A. Levitzki. TIBS 13, 298 (1988).

Por subcomisión de
DOCTORADO

DRA. M. SUSANA D. B. DE PASSERON
DIRECTORA
Dpto. QUIMICA BIOLÓGICA

DRA. MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERO CONICET



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Carboxyl terminal domain of Gs α specifies coupling of receptors to stimulation of adenylyl cyclase. Masters, S., Sullivan, K., Muller, R., and Bourne, H. Science 241, 449 (1988).

Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. Neer, E. and Clapham, D. Nature 333, 129 (1988).

Por subcomisión de
DOCTORADO

DRA. M. SUSANA D. B. de PASSERON
DIRECTORA
Dpto. QUIMICA BIOLÓGICA

DRA. MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERO BIOMÉDICO