



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

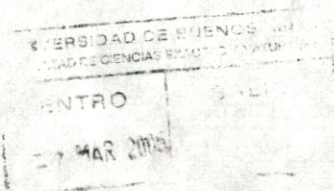
CURSO DE POSTGRADO O SEMINARIO

AÑO: 2005

- 1) **NOMBRE DEL CURSO/SEMINARIO:** Bioquímica Avanzada – Regulación Metabólica
- 2) **NOMBRE Y APELLIDO DEL RESPONSABLE:** Dra. Mirtha M. Flawiá.
- 3) **DOCENTES QUE COLABORAN EN EL DICTADO DEL CURSO:** Dr. Héctor N. Torres, Dra. M.T. Téllez-Iñón, Dr. Jorge Muschietti, Dra. Rita Ulloa, Dra. Daniela Capiati, Dr. Guillermo Alonso, Lic. Catalina Güida y Lic. Guillermo Lobo.
- 4) **FECHA DE INICIACIÓN:** Inicio 1er. Cuatrimestre 2005.
FECHA DE FINALIZACIÓN: Final 1er. Cuatrimestre 2005.
- 5) **CANTIDAD DE HORAS TOTALES DE DICTADO:** 240.
 - a) **TEÓRICAS:** 8.
 - b) **SEMINARIOS:** 2.
 - c) **PROBLEMAS:** 2.
 - d) **LABORATORIO:** 40 (posteriores a las teóricas).
- 6) **FORMA DE EVALUACIÓN:** Examen escrito.
- 7) **LUGAR DE DICTADO:** INGEBI.
- 8) **PUNTAJE QUE OTORGA PARA EL DOCTORADO:** 5 puntos.
- 9) **Nº DE ALUMNOS:** Mínimo: 10. Máximo: 50.
- 10) **ARANCEL PROPUESTO:** 20 módulos.
- 11) **PROGRAMA ANALÍTICO Y BIBLIOGRAFÍA DEL CURSO:** *En cambio Resol. 142/04*

PROGRAMA TEÓRICO

- 1 - **Membranas biológicas.** Estructura. Fosfolípidos. Modelos de membranas.
- 2 - **Receptores.** Cinética de la interacción ligando-receptor. Receptores de membranas y acción hormonal. Relación entre *binding* y actividad biológica. Ensayos de *binding* a



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Q-B
2005
E
A



células y membranas. Cinética de interacción hormona-receptor. Análisis del *steady state*. Identificación. Cooperatividad negativa versus heterogeneidad. Plot de Scatchard. Estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Disociación. Monómeros y polímeros. Purificación. Distintos tipos de resinas. Filtración por geles. Intercambio iónico. Ultracentrifugación. Solubilización de receptores. Purificación. Parámetros moleculares e hidrodinámicos. Cromatografía de afinidad. Secuenciación de péptidos.

3 - **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 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. Acción de insulina en la transducción de señales. Sustratos del receptor de insulina: IRS, Shc, PI3K, SH-PTP2, PKB, GSK3, etc. Receptores de PDGF, EGF, NGF interleukinas. IRS en *Drosophila*: CHICO.

4 - **Receptores α y β adrenérgicos.** Farmacología. Agonistas y antagonistas. Activación de la Gs de adenilil ciclasa. Interacción receptor-enzima. Purificación. Topografía. Zonas transmembranas. Localización de los sitios de *binding*. Glicosilación. Fosforilación. *Coupling* con la adenilil ciclasa. Homología con receptores de rodopsina y muscarínicos. Clonado. Receptores híbridos. Mecanismos de activación de las catecolaminas. Inducción del ligando. Selección conformacional. Unión secuencial y estabilización conformacional.

5 - **Receptor del glucagón.** Caracterización. Solubilización. Purificación. Secuenciación.

6 - **Receptores de narcóticos.** Enkefalinas. Endorfinas. Tipos de receptores. Estructura. Segundos mensajeros. Inhibición de la adenilil ciclasa. Mecanismos de analgesia. Relación con hormonas hipofisarias.

7 - **Receptores de canales.** 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 la proteína Gi, etc.

8 - **Regulación de la acción hormonal.** Nucleótidos cíclicos. Adenilil ciclasa. Localización. Características termodinámicas de la reacción. Acción de los nucleótidos sobre la actividad enzimática. Efecto del GTP. GTP análogos, toxinas y hormonas. Parámetros hidrodinámicos y moleculares.



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica



9 - Tipos de adenilil ciclasa. Clonado, secuenciación, homologías. Genes quiméricos. Dominios catalíticos y regulatorios. Filogenia. Interacción con las proteínas G. Activadores e inhibidores. Estructura molecular de la enzima. Proteínas truncadas. Regiones C1 y C2. Estructura de sitio activo. Estructura sandwich $\alpha\beta$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$. Mecanismos de acción de la forskolina. Unión molecular de la forskolina a los aminoácidos de sitio activo. Dominios regulatorios con proteína G. Dominios regulatorios y catalíticos. Cinética de la producción de cAMP. Clasificación topológica y funcional

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

11 - Proteínas G. Subunidades estimuladoras e inhibitorias (Gs-Gi). Subunidades. 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. Fusión de membranas. Reconstitución de sistemas. Liposomas. Proteínas G quiméricas. Interacciones con receptores, efectores y subunidades. Estructura de las subunidades $\beta\gamma$. Modelo propulsor W-D. "Tour-on" y "tour-off" del sistema. Mecanismos moleculares de liberación de la ADP e hidrólisis de la ATP.

12 - Regulación del mecanismo de la visión. Receptor de rodopsina. Transducina. Fosfodiesterasa y guanilato ciclasa. Interacción entre las distintas subunidades. Retinitis pigmentosa. Mutante rd. Proteínas quinasa de rodopsina. Mecanismos de desensibilización.

13 - Proteína G y canales iónicos. Apertura y cierre de canal K^+ y canal Ca^{++} . Patch clamps. Receptores olfatorios y gustativos. Regulación. Caracterización y segundos mensajeros. PDE de AMP cíclico. Canales iónicos. G gust.

14 - Transducción de señales a través de receptores unidos a PK de serina/treonina. Familia de receptores TGF β .

15 - Genes ras. Proteínas target. P21. GTPasa. Localización. Binding de GTP. Expresión de los genes ras en *Escherichia coli*. Mutantes. Relaciones con la adenilil ciclasa, crecimiento celular y fuentes de carbono. Clonado y secuenciación. Genes ras humanos. Proteínas small G. EPAC. Sistema ras/MAPK-GRb2-SOS-sistema ras/GAP-vía metabólica CSW. Factores de transcripción jun y fos (AP1)-Ink. AMP y activación del CREB. Mecanismo JAK-STAT.



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica



16 - Adenilil ciclasa en eucariotes inferiores y procariotes. Control por el AMP cíclico del crecimiento y la diferenciación. Proto y holociclasas. Adenilil 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. Adenilil ciclasa de cianobacterias. Purificación y caracterización. Hemiciclasas. Pasos transmembranas. Mecanismos moleculares de formación del cAMP. Caracterización molecular por el método del doble híbrido del adenilil ciclasa de *T. cruzi*. Isoformas-*T. brucei*-ESAG. Transducción de señales en *Saccharomyces*. GDF (globin derived factors). Novel sistema de activación de la adenilil ciclasa de *T. cruzi*. Efecto en la metacitogénesis.

17 - Señalización en plantas superiores. Sistemas fotomorfogénicos. Fitocromo y Criptocromos. Hormonas vegetales. Transducción de señales hormonales: Auxinas, Etileno, Giberelinas, Brasinosteroides. Inducción vs Desrepresión como forma de activación en plantas.

18 - Regulación de los niveles de AMP cíclico. Proteínas quinasas y fosfodiesterasas. Tipos de quinasas. Localización. Estructura. Separación. Titulación de las subunidades. Quinasas dependientes e independientes de AMP cíclico. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos. Fosfatasa de proteínas.

19 - Regulación de las señales extracelulares. Mecanismos asociados a Ca^{+2} y calmodulina. Calmodulina. Estructura y función. Activación de enzimas. Regulación de la concentración intracelular de Ca^{+2} . Hormonas que lo movilizan. Inhibidores del sistema. Ciclo de los inosítoles fosfato. Fosfolipasa C: tipos y función.

20 - Proteína quinasa C. Rol como señal de superficie. Actividad promotora de tumores. Diacilglicerol. Respuesta celular. Esteres de forbol. MAP quinasas. Relación con otros moduladores de la transducción de señales. Proteínas quinasas que fosforilan tirosina. Sustrato. Interrelación del sistema quinasas de serina, tirosina y treonina. Receptores de factores de crecimiento.

21 - Receptores del olfato. Localización. Epitelio y bulbo olfatorio. Neuronas sensoriales. Tipos de odorantes, aislamiento y caracterización. Puntos importantes de la modulación. Expresión de los receptores por cada neurona. Reconocimiento de un odorante a múltiples receptores y modelos. Proteína Golf y adenilil ciclasa. Combinatorial de la olfacción. Código de odorantes. Receptores de vainillín.

22 - Receptores de gusto. Tipo de receptores. Sensores para los distintos sabores: agrio, salado, dulce, amargo, umami. Gustducina. Estructura molecular de los receptores TR1 y TR2. Receptores de capsaicina. Receptores para el dulce. Estructura molecular.



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

23 - **Hetero-oligomerización de receptores.** Incremento de la actividad funcional. Receptores para somatostatina y dopamina.

24 - **GPCR.** Estructura molecular. Zonas TM. Región amino Rh2 y carboxilo terminal. Tipos de receptores: receptores para aminas biogénicas, nucleótidos, eicosanoides, lípidos y fosfolípidos. Receptores para hormonas peptídicas de alrededor de 40 aminoácidos; receptores para ligandos con actividad proteolítica; receptor para hormonas glicoproteicas y receptores para neurotransmisores.

25 - **Ciclo celular.** Regulación del crecimiento celular. Relación con factores de crecimiento. Sistemas de fosfoinosítidos. Regulación del ciclo en ovocitos de *Xenopus*, levaduras y células de mamíferos. Ciclinas. Caracterización y participación en las distintas etapas del ciclo. Ubiquitinación de ciclinas. Sustratos de p34. Regulación del ciclo por Rb.

Proteínas Rac, Rho, Cdc42. Oncogenes ras, Src, P53, fos, jun, myc, CREM-CREB. Mecanismos de transformación celular. Actividad transformante de insulina y factores de crecimiento.

PROGRAMA PRÁCTICO

- Purificación parcial de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKA) de corazón bovino.
- Caracterización bioquímica de la PKA (dependencia de AMPc, binding a AMPc, especificidad de sustratos y autofosforilación de la subunidad reguladora).
- Caracterización inmunológica utilizando anticuerpos específicos contra la subunidad catalítica (ensayos de Western Blot).
- Purificación parcial de la fosfodiesterasa de AMPc (PDE) de corazón bovino.
- Caracterización bioquímica de la PDE (dependencia de calcio-calmodulina y Km de AMPc)
- Purificación parcial de la calmodulina de corazón bovino y determinación de su actividad.
- Extracción de membranas de segmentos externos de bastones (ROS).
- Purificación parcial de transducina
- Ensayo de binding de GTP- γ -[35S].
- Obtención de la constante de afinidad (KA) de la transducina por el GTP utilizando el método de Scatchard.
- Ensayo de ADP ribosilación catalizada por toxinas.
- Medición de actividad de adenilato ciclasa. Activación por hormonas, forskolina, nucleótidos, etc.



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

BIBLIOGRAFÍA

- "Protein toxins and their use in Cell Biology". Ed. R. Rappuoli and C. Montecucco. Oxford University Press. 1997.
- "Methods in enzymology". Vol. 268-Part A. Ed. L. Packer. Academic Press. 1996.
- "Cell cycle control". Ed. C. Hutchison and D. Glover. Oxford University Press. 1995.
- "Signaling networks and cell cycle control". Ed. J. Gutkind. Human Press. 2000.
- "Biochemical pathways: an atlas of Biochemistry and Molecular Biology". Ed. G. Michal. Wiley. 1999.
- "Farmacología molecular". M. Kazanietz. Univ. de Quilmes. 2000.
- "Principles of development". L. Wolpert. Oxford University Press. 1998.
- "The central nervous system. Structure and function". 2nd. Ed. Per Brodal. Oxford University Press. 1998.
- "Molecular cell biology". Third Ed. Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira and Darnell. Sc. American Books. 1995.
- "Biochemistry & molecular biology of plants". Buchanan, Grissem and Jones. American Society of Plant Physiologists. 2000.
- "Biochemistry with clinical correlations". Ed. T. Devlin. Wiley-Liss. 1997.
- "A student companion and workbook for genes VI". B. Lewin, M. Klotz and P. Siliciano. Oxford University Press. 1998.
- "The yeast two-hybrid system". Ed. P. Bartel and S. Fields. Oxford University Press. 1997.
- "Biochemistry". Fourth Ed. L. Stryer. Freeman and Company. 1995.
- "Human molecular genetics". T. Strachan and A. Read. Wiley-Liss. 2nd. Ed. 1999.
- "Gene expression profiles of light-induced apoptosis in arrestin/rhodopsin kinase-deficient mouse retinas". S. Choi, W. Hao, C. Chen and M. Simon. PNAS 98, 13096-13101. 2001.
- "A trypanosome structure involved in transmitting cytoplasmic information during cell division". F. Moreira-Leite, T. Sherwin, L. Kohl, K. Gull. Science 294, 610-612. 2001.
- "Signaling Networks: The origins of cellular multitasking". J. Jordan, E. Landau and R. Iyengar. Cell 103, 193-200. 2000.
- "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor". K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. Behnke, H. Motoshima, B. Fox, I. Le Trong, D. Teller, T. Okada, R. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano. Science 289, p.739. 2000.
- "Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and α -aminobutyric acid A receptors". F. Llu, Q. Wan, Z. Pristupa, X. Yu, Y. Wang, & H. Niznik. Nature 403, p.274. 2000.
- "Receptors as kissing cousins". G. Milligan. Science 288, p. 65. 2000.