

DEPARTAMENTOS DE FISIOLÓGÍA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR y DE QUÍMICA BIOLÓGICA

1. Departamentos: Fisiología, Biología Molecular y Celular y Química Biológica.
2. Carrera de
 - a) Licenciatura en Ciencias Químicas y Ciencias Biológicas
 - b) Doctorado y/o Posgrado en Cs. Químicas y Cs. Biológicas
3. Cuatrimestre: 1er. Cuatrimestre.
4. N° de código de carrera: 01 y 05.
5. Materia: **BIOQUÍMICA AVANZADA-REGULACION METABOLICA**
N° de código: **6076**
6. Puntaje propuesto para el doctorado: 5 puntos.
7. Plan de estudio del año: 1984 (01) y 1987 (05).
8. Carácter de la materia: Optativa.
9. Duración: 16 semanas.
10. Horas de clase semanales:
 - a) Teóricas:
 - b) Problemas:
 - c) Laboratorio: 50 (posteriores a las teóricas)
 - d) Seminarios:
 - e) Teórico-problemas: 9
 - f) Teórico-prácticas
 - g) Total: 9.
11. Carga horaria total: 180.
12. Asignaturas correlativas: Química Biológica.
13. Forma de evaluación: Examen escrito.
14. Programa analítico y bibliografía:

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 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. El papel de el IRS la PI3K y la PKB en la regulación del glucógeno. Quinasas múltiples y sitios múltiples de fosforilación. PDK1 como integradora.

Receptor del glucagón. Caracterización. Solubilización. Purificación. Secuenciación.

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

6 - 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.

Isoformas 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 egulatorios y catalíticos. Cinética de la producción de cAMP. Clasificación topológica y funcional. Fosfodiesterasas. Tipos. Estructura y funciones de los diferentes dominios. Inhibidores y activadores. Localización intracelular.

7 - 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. Toxina anthraci. Receptor. Internalización, formación de poro y translocación.

8 - Proteínas G. Subunidades estimuladoras e inhibidoras (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. “Tourn-on” y “tourn-off” del sistema. Mecanismos moleculares de liberación de la ADP e hidrólisis de la ATP.

9 - Regulación del mecanismo de la visión. Sensibilidad de los fotorreceptores. Receptor de rodopsina. Mecanismo de activación de los fotorreceptores. Transducina. Fosfodiesterasa y guanilato ciclasa. Interacción entre las distintas subunidades. Adaptación y el Ca^{2+} como regulador negativo. Retinitis pigmentosa. Mutante rd. Proteínas quinasa de rodopsina. Mecanismos de desensibilización.

10- 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 G_i , etc.

Proteína G y canales iónicos. Apertura y cierre de canal K^+ y canal Ca^{++} . Patch clamps. Canales TRP.

11 - 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. Funciones en la internalización de receptores. 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.

12 - Regulación de los niveles de AMP cíclico. Proteínas quinasas. Tipos de quinasas. Localización. Estructura. Separación. Titulación de las subunidades. Quinasas dependientes e independientes de AMP cíclico. PKA y regulación de la transcripción. PKA y ERK. Funciones de cAMP independientes de PKA. AKAPs. Fosfatasa de proteínas. Tipos.

13 - Regulación de las señales extracelulares. Calcio. Localizaciones del nuevo segundo mensajero. Diferencias con Mg^{2+} . Detección de la concentración citosólica de calcio. Mecanismos asociados a Ca^{+2} y calmodulina. Calmodulina. Estructura y función. Activación de enzimas. Regulación de la concentración intracelular de Ca^{+2} . Receptores de IP3. Hormonas que lo movilizan. Inhibidores del sistema. Ciclo de los inositoles fosfato. Fosfolipasa C: tipos y función. Receptor de Ryanodina .

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. Familia de RPK. Sustrato. Interrelación del sistema quinasas de serina, tirosina y treonina. Fosfotirosina fosfatasa.

14 - Receptor de hormona de crecimiento. Estructura. Dimerización. GHBP. Funciones. Animales transgénicos. KO de receptores. Sobreexpresión. JAKs quinasas, proteínas STATs. Funciones. Proteínas SOCs y CIS. Papel en la regulación del crecimiento.

15 - 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.

16 - 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 para el dulce, vainillina y mentol. Estructura molecular.

Receptores del dolor. Capsaicina. Mecanismo de acción.

17 - GPCR. Estructura molecular. Zonas TM. Regiones amino 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.

Hetero-oligomerización de receptores. Incremento de la actividad funcional. Receptores para somatostatina y dopamina. Cross talk de receptores. Familia de receptores Toll like.

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

18 - 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 Saccharomices.

GDF (globin derived factors). Novel sistema de activación de la adenilil ciclasa de *T. cruzi*. Efecto en la metaciclologénesis.

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

20 - 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.

15. BIBLIOGRAFÍA

- "Annual Review of Biochemistry" Vol 76, 2007.
- "Annual Review of Biochemistry" Vol 75, 2006.
- "Signal transduction" Gomperts. Ed Academic Press, 2002.
- "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.
- "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.
- "Receptors as kissing cousins". G. Milligan. *Science* 288, p. 65. 2000.

- “Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity”. M. Rockeville, D. Lange, U. Kumar, S. Patel, R. Patel, Y. Patel. *Science* 288, p. 154. 2000.
- “The versatility and universality of calcium signalling”. M. Berridge, P. Lipp and M. Bootman. *Nature reviews* 1, p. 11. 2000.
- “Visual transduction in *Drosophila*”. R. Hardie & P. Raghu. *Nature* 413, p. 186. 2001.
- “Molecular basis of mechanosensory transduction”. P. Gillespie & R. Walker. *Nature* 413, p. 194. 2001.
- “Molecular mechanisms of nociception”. D. Julius & A. Basbaum. *Nature* 413, p. 203. 2001.
- “How the olfactory system makes sense of scents”. *Nature* 413. 2001.
- “Receptors and transduction in taste”. B. Lindemann. *Nature* 413, p. 219. 2001.
- “A novel calcium-stimulated adenylyl cyclase from *Trypanosoma cruzi*, which interacts with the structural flagellar protein paraflagellar Rod”. D’Angelo, M., Montagna, A. Sanguineti, S., Torres, H.N. y Flawia, M.M. *J. Biol. Chem.* 277, 35025-35034. 2002.
- “ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures”. Story, G.M., Peier, A.M., reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A. *Cell* 12, 819-829. 2003.
- “Adenylyl cyclase localization regulates streaming during chemotaxis”. Kriebel, P.W., Barr, V.A., Parent, C.A. *Cell* 112, 549-560. 2003.
- “Biochemistry of signal transduction and regulation”. Krauss, G., Wiley Ed. 2008.
- “Signal transduction and human disease”. Toren. Fenkel Ed. 2004.
- “Cell signalling”. Hancock, J. Oxford. 2005.

Fecha

Firma Profesor

Aclaración

Firma Director

Aclaración

Firma Subcomisión de Doctorado