



Ministerio de Cultura y Educación  
 Universidad Nacional de San Luis  
 Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia  
 Departamento: Bioquímica y Cs Biológicas  
 Área: Biología Molecular

(Programa del año 2007)

### I - Oferta Académica

Materia	Carrera	Plan	Año	Período
BIOQUIMICA AVANZADA	LIC.BIOL.MOLEC.	1/99	4	1c

### II - Equipo Docente

Docente	Función	Cargo	Dedicación
CIUFFO, GLADYS MARIA	Prof. Responsable	P.TIT EXC	40 Hs
VILLARREAL, RODRIGO SEBASTIAN	Responsable de Práctico	JTP SEM	20 Hs
SEGUIN, LEONARDO ROQUE	Auxiliar de Práctico	A.2DA SIM	10 Hs
TORRES BASSO, MARIA BELEN	Auxiliar de Práctico	A.2DA SIM	10 Hs

### III - Características del Curso

Credito Horario Semanal				
Teórico/Práctico	Teóricas	Prácticas de Aula	Práct. de lab/ camp/ Resid/ PIP, etc.	Total
120 Hs	Hs	Hs	40 Hs	8 Hs

Tipificación	Periodo
B - Teoría con prácticas de aula y laboratorio	1 Cuatrimestre

Duración			
Desde	Hasta	Cantidad de Semanas	Cantidad de Horas
14/03/2007	19/06/2007	14	120

### IV - Fundamentación

La asignatura está destinada a alumnos de la carrera de Lic. en Biología Molecular. Está orientada al análisis de los procesos de reconocimiento molecular, procesos que juegan un rol importante para determinar la respuesta de las células a los diferentes estímulos provenientes del medio ambiente en que se desarrolla la misma. En el curso se estudiarán procesos tales como interacción hormona-receptor, droga-receptor, moléculas de adhesión celular y procesos relacionados, desde el punto de vista físico-químico, bioquímico y farmacológico. Recepción del mensaje y transducción del mismo al medio intracelular que desencadene la respuesta fisiológica. Se analizan las diferentes metodologías para el estudio de la interacción ligando-receptor y de sus mecanismos de transducción. Análisis del problema desde una metodología bioquímica y de biología molecular.

El curso tiene una modalidad teórico-práctica, con activa participación de los alumnos, a través de seminarios y discusión de problemas. Los Trabajos Prácticos de laboratorio, requieren de una modalidad en un módulo compacto de 40 hs, que se dictan en una semana dedicada exclusivamente a la práctica.

### V - Objetivos

Son objetivos del presente programa:

- La capacitación del alumno en la comprensión de los procesos de reconocimiento y su importante rol en el funcionamiento del organismo.
- Capacitación del alumno en el análisis y evaluación de trabajos publicados, promoviendo una actitud crítica en el

análisis de los mismos.

c. Capacitación experimental del alumno en técnicas de laboratorio de uso común en el estudio bioquímico de proteínas receptoras.

d. Capacitación del alumno para el procesamiento y evaluación de resultados experimentales con una actitud crítica y en el diseño experimental.

## **VI - Contenidos**

### **Programa Desarrollado**

**TEMA 1. El problema del reconocimiento molecular subyacente en procesos bioquímicos, tales como: hormona-receptor, droga-receptor, enzima-sustrato, DNA-binding protein, etc. Procesos físico-químicos que determinan el reconocimiento molecular. Tipos de energías de interacción que participan en los procesos mencionados.**

**TEMA 2. Técnicas bioquímicas: técnicas de uso común del laboratorio bioquímico. Métodos separativos: filtración por tamices moleculares. Cromatografía por intercambio iónico. Cromatografía de afinidad: aplicación a la purificación de proteínas, ARN, anticuerpos y otros. Ultrafiltración. Solubilización y concentración de proteínas. Principios de separación y aplicaciones. SDS-Page. Separación de proteínas. Western e inmunoblotting para la identificación de proteínas. Inmunoprecipitación como método de análisis, identificación y purificación de proteínas. Geles 2D y conceptos de proteómica. Ultracentrifugación: método de las velocidades y métodos del equilibrio de sedimentación. Aplicaciones a la purificación de plásmidos y DNA. Ventajas y desventajas de las diferentes metodologías. Aplicaciones.**

**TEMA 3. Receptores. Concepto de receptores. Propiedades que definen a un receptor biológico. El enfoque farmacológico vs. el enfoque bioquímico. Teoría de receptores. Curva de saturación. Gráfico de Scatchard. Interpretación de resultados experimentales. Estimación del  $K_d$  y  $N$ . Significado de los sitios de binding. Cinética del binding de receptores Curvas de asociación-disociación: equilibrio de la interacción ligando-receptor. Estimación del  $K_d$  a partir del estudio cinético. Estudios de competencia: curvas de desplazamiento. Estimación de  $IC_{50}$  y  $K_i$ . Métodos de estudio y análisis de resultados.**

**TEMA 4. Receptores de membrana: aspectos prácticos del estudio de receptores de membrana. Métodos de preparación. Ensayo de binding. Métodos de separación del ligando 'libre' del ligando 'unido'. Solubilización de receptores. Aspectos experimentales. Caracterización bioquímica y molecular de los receptores. Análisis de casos. Resolución de problemas. Clonado de receptores: diferentes metodologías.**

**TEMA 5. Clasificación de los receptores sobre la base de su estructura y mecanismos de transducción. Mecanismos de transducción. Estructura de los receptores y mecanismos de transducción. Diferentes tipos de señales según el tipo de receptor. Receptores acoplados a canales iónicos. Ejemplos. Receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Receptores con propiedades autocatalíticas: autofosforilación y fosforilación de proteínas.**

**TEMA 6. Modelos de receptor. Modelo de dos estados del receptor y modelo de tres estados. Mutantes CAM: mutantes constitutivamente activadas. Significado biológico de las mismas. Situaciones patológicas. Resolución de problemas. Regulación 'up' y 'down' del número de receptores. Reciclado de receptores vs. síntesis de novo y regulación de la síntesis. Desensibilización.**

**TEMA 7. Proteínas G. Diferentes tipos de proteína G y su acoplamiento. Estructura y rol de las diferentes**

subunidades. **Biología Molecular de proteínas G. Homología entre las diferentes proteínas G. Identificación inmunológica de las diferentes subunidades. Control dual de la adenilato ciclasa. Acoplamiento a la adenilato ciclasa vía la subunidad alfa s (estimuladora) o alfa i (inhibitoria). Activación de proteína quinasa A (PKA).**

**TEMA 8. Equilibrio del acoplamiento receptor-proteína G. Efecto del sustrato. Estudios de reconstitución. Sitios regulatorios mediante toxina del cólera y toxina pertusis. La familia de las proteínas G. Proteínas G menores, transducinas, protooncogenes. Métodos de estudio y caracterización de la asociación receptor-proteína. Alteraciones en la expresión de proteínas G durante el desarrollo, transformación, diferenciación y estados patológicos.**

**TEMA 9. Mensajeros intracelulares: formas de acoplamiento, señalización intracelular y sus métodos de estudio. Ensayos in vitro o in vivo para el estudio de la respuesta biológica. Metabolismo de inositol fosfato como respuesta a la activación de receptores. Recambio de fosfolípidos. Proteínas G involucradas. Diferentes niveles de regulación. Activación de proteínas quinasas por DAG (diacilglicerol). Mobilización de iones Ca y activación de proteína quinasa C. Interacción entre mobilización de Ca y PI turnover. Propiedades de las diferentes proteínas quinasas y formas de estudio de las mismas.**

**TEMA 10. Receptores autocatalíticos. Autofosforilación y proteínas tirosina quinasas. Mecanismos de fosforilación y defosforilación de proteínas, un delicado equilibrio. Activación de tirosina quinasas. Estructura del dominio catalítico. Proteínas tirosina fosfatasas. Cascadas de proteínas fosforiladas y activación de MAP quinasas. Activación de la vía JAK-STAT y activación de genes tempranos. Relación con procesos de desarrollo y regulación génica. Interacción en la activación de diferentes proteínas quinasas.**

**TEMA 11. El NO como intermediario en la transducción de señales. Interrelación entre distintas células mediada por la formación de NO. Rol neuroprotector y neurodegenerativo. NO sintetasa. Diferentes isoformas. Modelo estructural, comparación con citocromo P450. Inhibidores de NOS. Guanilato ciclasa soluble. Secuestradores de NO.**

## **VII - Plan de Trabajos Prácticos**

### **TRABAJOS PRACTICOS:**

1. Calibración de una columna de exclusión por tamaño molecular. Separación de proteínas del suero en una columna P-100.
2. Preparación de membranas a partir de tejido de rata.
3. Determinación de la concentración de proteínas mediante absorbancia a 280 nm y mediante la metodología de Bradford.
4. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE.
5. Transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF.
6. Fosforilación de proteínas mediada por la activación de receptores de membrana y reconocimiento de proteínas tirosin fosforiladas mediante Western blot.
7. Ensayos de binding. Realización de una curva de competición.
8. Activación de Proteína quinasa C (PKC) y detección por traslocación a membrana mediante Western blot.

SEMINARIOS: se propondrán seminarios de discusión de trabajos de reciente publicación sobre los temas desarrollados durante el curso de las revistas Cell, J.Biol. Chem., Nature u otros de interés para el desarrollo del curso.

### **VIII - Regimen de Aprobación**

EVALUACION: Se propone una evaluación continua del curso con posibilidad de Promoción sin examen, para lo cual se deben cumplir los siguientes requerimientos:

- a. Se requiere una asistencia del 80 % a las clases teórico-prácticas.
- b. Se realizará una evaluación continua del alumno a través de su participación en clase y mediante seminarios a presentar por los alumnos.
- c. Aprobación de tres evaluaciones parciales, con caracter teórico- práctico y metodología a desarrollar combinada con preguntas de opción múltiple.
- d. Para mantener la condición de alumno promocional, los parciales deben ser aprobados en primera instancia.
- e. Aprobación de los trabajos prácticos de laboratorio, los cuales tienen el carácter de irrecuperables por sus características y el costo de los mismos.
- f. Evaluación integradora que puede consistir en un seminario final, investigación bibliográfica o propuesta de un plan de trabajo y seminario, determinado por el profesor oportunamente.

Para alumnos regulares:

Se deben cumplir los requisitos anteriores, a excepción del f, con las siguientes modificaciones:

- a. Asistencia requerida 70%.
- b. Régimen de recuperaciones: de acuerdo a las ordenanzas vigentes.

### **IX - Bibliografía Básica**

[1] BIBLIOGRAFIA.

[2] 1. Biología Molecular de la Célula - 3ra. Edición. Autores: Albert y col.

[3] 2. Recombinant -DNA- 2nd. Edition. Autores: Watson, J.D, Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, L Editorial: Scientific American Books-.

[4] 3. Biología Celular y Molecular- Lodish et al- Ed. Panamericana-Ed. 2003

[5] 4. G-proteins as mediators of cellular signalling processes.

[6] M.D. Houslay and G. Milligan.

[7] 5. Receptor-effector coupling. Hulme E.C.(Ed.). IRL Press

[8] 6. Receptor-Ligand interactions. A practical approach. Hulme E.C. (Ed.)

[9] IRL Press

[10] 7. Protein purification. A practical approach. IRL Press

[11] 8. Affinity Chromatography. Pharmacia.

### **X - Bibliografía Complementaria**

[1] 1. Phosphatases in Cell metabolism and signal transduction. Vincent J.B.y Crowder, M.W. Springer-Verlag, Germany. 1995.

[2] 2. Cell, Nature, J. Biol. Cell. Publicaciones periódicas. de donde se elegirán los seminarios.

### **XI - Resumen de Objetivos**

Son objetivos del presente programa:

- a. La capacitación del alumno en la comprensión de los procesos de reconocimiento y su importante rol en el funcionamiento del organismo.
- b. Capacitación del alumno en el análisis y evaluación de trabajos publicados, promoviendo una actitud crítica en el análisis de los mismos.
- c. Capacitación experimental del alumno en técnicas de laboratorio de uso común en el estudio bioquímico de proteínas receptoras.
- d. Capacitación del alumno para el procesamiento y evaluación de resultados experimentales con una actitud crítica y en el diseño experimental.

## **XII - Resumen del Programa**

TEMA 1. El problema del reconocimiento molecular subyacente en procesos bioquímicos.

TEMA 2. Técnicas bioquímicas: técnicas de uso común del laboratorio bioquímico.

TEMA 3. Receptores. Concepto de receptores. Propiedades que definen a un receptor biológico. El enfoque farmacológico vs. el enfoque bioquímico. Teoría de receptores.

TEMA 4. Receptores de membrana: aspectos prácticos del estudio de receptores de membrana.

TEMA 5. Clasificación de los receptores sobre la base de su estructura y mecanismos de transducción.

TEMA 6. Modelos de receptor. Modelo de dos estados del receptor y modelo de tres estados.

TEMA 7. Proteínas G. Diferentes tipos de proteína G y su acoplamiento. Estructura y rol de las diferentes subunidades.

TEMA 8. Equilibrio del acoplamiento receptor-proteína G.

TEMA 9. Mensajeros intracelulares: formas de acoplamiento, señalización intracelular y sus métodos de estudio.

TEMA 10. Receptores autocatalíticos. Autofosforilación y proteínas tirosina quinasas. Mecanismos de fosforilación y defosforilación de proteínas, un delicado equilibrio.

TEMA 11. El NO como intermediario en la transducción de señales.

## **XIII - Imprevistos**

La programación podría verse afectada en caso de huelgas, o enfermedad de los docentes. La realización de los Trabajos Prácticos está condicionada a la disponibilidad de recursos.