UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Denominación de la actividad académica (completa): **TEMAS SELECTOS – CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS VINCULADAS CON EL PROCESO SALUD-ENFERMEDAD**

Clave:	**Semestre:**	**Campo de conocimiento:**	**Número de Créditos:**
(no llenar)	*2024-2*	*Biología Experimental* *Biomedicina*	*8*

Carácter	**Horas**		**Horas por semana**	**Horas por semestre**
	Teóricas	**Prácticas**		
Optativa	**64**	**0**	**4**	***64***

Modalidad	**Duración del curso**
Curso	*semestral*

Seriación indicativa u obligatoria antecedente, si es el caso:
Sin seriación

Seriación indicativa u obligatoria subsecuente, si es el caso:
Sin seriación

Objetivo general: Conocer las estrategias metodológicas empleadas en la caracterización de proteínas vinculadas con el proceso salud-enfermedad para elaborar propuestas terapéuticas.

Objetivos específicos: (en si caso)

Temario	**Horas**	
	Teóricas	**Prácticas**
Unidad 1 **1. Los ácidos nucleicos como una herramienta fundamental en la biomedicina.** 1.1. Extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN) a partir de muestras biológicas. 1.2. Métodos de cuantificación de ácidos nucleicos. 1.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de ADN y ARN. Fundamentos de PCR punto final y tiempo real. 1.4. Clonación de genes en plásmidos multicopia y de sobreexpresión. 1.5. Mutagénesis sitio-específica, generación *de novo* de sitios de restricción, inclusión de regiones “tag” y construcciones para secuencias reporteras (His-Tag, HA, GFP, etc.). 1.6 Secuenciación de ácidos nucleicos. 1.7 Bioinformática. Fundamentos y aplicaciones. 1.8. Discusión de trabajos que hayan empleado este tipo de estrategias en el estudio del proceso salud-enfermedad.	*10*	*0*
Unidad 2	**10**	**0**

2. Las proteínas como blancos moleculares en la biomedicina 2.1. Sobreexpresión de proteínas recombinantes: optimización de procesos para la obtención de productos solubles. 2.2. Purificación de proteínas a homogeneidad: precipitaciones con sales, cromatografía de exclusión molecular, de intercambio iónico y por afinidad. 2.3. Métodos de cuantificación de proteínas a partir de extractos totales de bacterias, así como de proteínas purificadas (Bradford, ácido bicinconínico); empleo del coeficiente de extinción molar; espectrofotómetro *vs* nanodrop. 2.4. Caracterización inicial de la integridad, pureza, solubilidad, constantes de dilución, efecto del pH, efecto de fuerza iónica, etc. en las proteínas recombinantes purificadas. 2.5. Discusión de trabajos que hayan empleado este tipo de estrategias en el estudio del proceso salud-enfermedad.		
Unidad 3 **3. La función de las proteínas como un observable en la biomedicina** 3.1. Caracterización de proteínas no catalíticas. 3. 2. Caracterización de enzimas. 3.2. Inactivación enzimática como una herramienta hacia el desarrollo de fármacos. 3.3. Discusión de trabajos que hayan empleado este tipo de estrategias en el estudio del proceso salud-enfermedad.	**10**	**0**
Unidad 4 **4. Métodos de estudio de la estructura de las proteínas I** 4.1. Fundamentos de la espectrofluorometría, fluoróforos, “quenching”. Fluorescencia intrínseca de las proteínas; 4.2. Fluorescencia extrínseca de las proteínas; uso del ANS. 4.3. Dicroísmo circular, sus fundamentos y aplicaciones. 4.4. Ensayos de proteólisis limitada. 4.5. Análisis de la oligomerización de proteínas en condiciones reductoras y no reductoras. 4.6. Discusión de trabajos que hayan empleado este tipo de estrategias en el estudio del proceso salud-enfermedad.	**10**	**0**
Unidad 5 **5. Métodos empleados para el estudio de la estructura tridimensional (3D) de las proteínas** 5.1. Utilidad del estudio de la estructura 3D de las proteínas y otras biomoléculas. 5.2. Métodos biofísicos para determinar la estructura 3D de las proteínas: difracción de los rayos X, crio-microscopía electrónica de transmisión y resonancia magnética nuclear. 5.3. Métodos bioinformáticos para la determinación de la estructura 3D de las proteínas: Modelado molecular por homología, “threading”, *ab initio* y redes neuronales (machine learning).	**10**	**0**

5.4 Análisis de la calidad de la estructura 3D de las proteínas. Parámetros que definen a un buen modelo 3D. 5.5. Análisis de los modelos tridimensionales de las proteínas y otras biomoléculas mediante su visualización con modeladores gráficos: PyMOL, VMD, Chimera. 5.6 Ejercicios y discusión de trabajos que hayan empleado estrategias para el estudio 3D de las biomoléculas en diferentes patologías.		
Unidad 6 **6. Métodos de detección y análisis de biomoléculas.** 6.1. Generación de anticuerpos policlonales y monoclonales. 6.2. Análisis mediante técnicas de Western blot y ELISA 6.3. Análisis por inmunocitoquímica. Microscopía de luz y electrónica. 6.4. Métodos de transfección celular. 6.5. Construcción y análisis de proteínas unidas a moléculas reporteras (GFP, Luciferasa, mCherry, HA, HisTag, etc.) 6.6. Discusión de trabajos que hayan empleado este tipo de estrategias en el estudio del proceso salud-enfermedad.	**10**	**0**
Unidad 7 **7.1.** Integración y aplicación del conocimiento adquirido	**4**	**0**
Total de horas teóricas	**64**	
Total de horas prácticas	**0**	
Suma total de horas	**64**	

Bibliografía básica

1. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Green MR and Sanbrook J (eds.) 4th edition. 2012. CSHL Press. Tomos 1, 2 y 3. New York, USA.
2. **The Protein Protocols Handbook.** John M. Walker (Ed.) 2nd edition. 2002. Humana Press Inc.
3. **Hibridación *in situ* ultraestructural** Segura-Valdez M. de L., López-Velázquez G. y Jiménez-García L.F. (1997). Ed. Plaza y Valdés.
4. Structural Genomics Consortium, *et al*., Protein production and purification. Nat Methods. 2008 Feb;5(2):135-46.
5. Introduction to macromolecular crystallography. Alexander McPherson. 2ª ed. 2009. John Wiley & sons, Inc. 2009. pp 251.
6. Crystal structure analysis. Principles and practice. William Clegg. 2ª ed. 2009. Oxford University press. pp 406.
7. Crystallography made cristal clear. A guide for users of macromolecular models. Gale Rhodes. 3ª ed. 2006. Elsevier. pp 333.
8. Principles of fluorescence spectroscopy. Lakowics J.R. 3ª ed. 2006. Springer XXVI, pp 954.
9. Lehninger Principles of Biochemistry. Nelson David L., Cox. Michael M. 6ta Edición Worth Publ Inc. 2012. 1340 p.
10. Lewin's Genes XI. Lewin, Benjamin., Kilpatrick, Stephen T., Goldstein, Elliott S. McGraw Hill. ISBN 978-1-4496-5905-9
11. Principles of Gene Manipulation. An Introduction to Genetic Engineering. R.W. Old and S.B. Primrose. University of California Press. ISBN 978-0520046269
12. Directed Mutagenesis. A Practical Approach. M. J. McPherson. Series editors: D. Rickwood and B. D. Hames. ISBN 0199631409
13. Bhattacharyya B, Kapoor S, and Panda D. Chapter 17. Fluorescence Spectroscopic Methods to Analyze Drug–Tubulin Interactions. Pp. 301-327. METHODS IN CELL BIOLOGY, VOL. 95 978-0-12-374815-7. Copyright 2010. Elsevier Inc. All rights reserved. 301 http://dx.DOI:10.1016/S0091-679X(10)95017-6
14. Deshayes S, Divita G. Chapter Four: Fluorescence Technologies for Monitoring Interactions Between Biological Molecules *In Vitro*. Pp. 110-141. Progress in Molecular Biology and Translational Science. Volume 113 # 2013 Elsevier Inc. ISSN 1877-1173 All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386932-6.00004-1Greenfield NJ. 1999. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. Trends in Analytical Chemistry. 18(4):236-244.

Bibliografía complementaria

1. Enríquez-Flores S, et al. Human Triosephosphate Isomerase Is a Potential Target in Cancer Due to Commonly Occurring Post-Translational Modifications. *Molecules*. 2023 Aug 21;28(16):6163. doi: 10.3390/molecules28166163.
2. Fernández-Lainez, Cynthia et al. "The Giardial Arginine Deiminase Participates in *Giardia*-Host Immunomodulation in a Structure-Dependent Fashion via Toll-like Receptors." *International journal of molecular sciences* vol. 23,19 11552. 30 Sep. 2022, doi:10.3390/ijms231911552.

3. Enríquez-Flores S, Flores-López LA, De la Mora-De la Mora I, García-Torres I, Gracia-Mora I, Gutiérrez-Castrellón P, Fernández-Lainez C, Martínez-Pérez Y, Olaya-Vargas A, de Vos P, López-Velázquez G. Naturally occurring deamidated triosephosphate isomerase is a promising target for cell-selective therapy in cancer. Sci Rep. 2022 Mar 7;12(1):4028. doi: 10.1038/s41598-022-08051-0.
4. Enríquez-Flores S, De la Mora-De la Mora JI, Flores-López LA, Cabrera N, Fernández-Lainez C, Hernández-Alcántara G, Guerrero-Beltrán CE, López-Velázquez G, García-Torres I. Improved yield, stability, and cleavage reaction of a novel tobacco etch virus protease mutant. A ppl Microbiol Biotechnol. 2022 Feb;106(4):1475-1492. doi: 10.1007/s00253-022-11786-5. Epub 2022 Jan 29
5. Fernández-Lainez C, de la Mora-de la Mora I, García-Torres I, Enríquez-Flores S, Flores-López LA, Gutiérrez-Castrellón P, Yépez-Mulia L, Matadamas-Martínez F, de Vos P, López-Velázquez G. Multilevel Approach for the Treatment of Giardiasis by Targeting Arginine Deiminase. Int J Mol Sci. 2021 Aug 31;22(17):9491. doi: 10.3390/ijms22179491. PMID: 34502400; PMCID: PMC8431557.
6. Enríquez-Flores S, Flores-López LA, García-Torres I, de la Mora-de la Mora I, Cabrera N, Gutiérrez-Castrellón P, Martínez-Pérez Y, López-Velázquez G. Deamidated Human Triosephosphate Isomerase is a Promising Druggable Target. Biomolecules. 2020 Jul 15;10(7):1050. doi: 10.3390/biom10071050. PMID: 32679775; PMCID: PMC7407242.
7. López-Velázquez G, Fernández-Lainez C, de la Mora-de la Mora JI, Caudillo de la Portilla D, Reynoso-Robles R, González-Maciel A, Ridaura C, García-Torres I, Gutiérrez-Castrellón P, Olivos-García A, Flores-López LA, Enríquez-Flores S. On the molecular and cellular effects of omeprazole to further support its effectiveness as an antigiardial drug. Sci Rep. 2019 Jun 20;9(1):8922. doi: 10.1038/s41598-019-45529-w. PMID: 31222100; PMCID: PMC6586891.
8. Proton pump inhibitors drastically modify triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* at functional and structural levels, providing molecular leads in the design of new antigiardiasic drugs. García-Torres I, de la Mora-de la Mora I, Marcial-Quino J, Gómez-Manzo S, Vanoye-Carlo A, Navarrete-Vázquez G, Colín-Lozano B, Gutiérrez-Castrellón P, Sierra-Palacios E, López-Velázquez G, Enríquez-Flores S. Biochim Biophys Acta. 2016 Jan;1860(1 Pt A):97-107.
9. Structural effects of protein aging: terminal marking by deamidation in human triosephosphate isomerase. de la Mora-de la Mora I, Torres-Larios A, Enríquez-Flores S, Méndez ST, Castillo-Villanueva A, Gómez-Manzo S, López-Velázquez G, Marcial-Quino J, Torres-Arroyo A, García-Torres I, Reyes-Vivas H, Oria-Hernández J. PLoS One. 2015 Apr 17;10(4):e0123379.
10. The stability of G6PD is affected by mutations with different clinical phenotypes. Gómez-Manzo S, Terrón-Hernández J, De la Mora-De la Mora I, González-Valdez A, Marcial-Quino J, García-Torres I, Vanoye-Carlo A, López-Velázquez G, Hernández-Alcántara G, Oria-Hernández J, Reyes-Vivas H, Enríquez-Flores S. Int J Mol Sci. 2014 Nov 17;15(11):21179-201.
11. Giardial triosephosphate isomerase as possible target of the cytotoxic effect of omeprazole in *Giardia lamblia*. Reyes-Vivas H, de la Mora-de la Mora I, Castillo-Villanueva A, Yépez-Mulia L, Hernández-Alcántara G, Figueroa-Salazar R, García-Torres I, Gómez-Manzo S, Méndez ST, Vanoye-Carlo A, Marcial-Quino J, Torres-Arroyo A, Oria-Hernández J, Gutiérrez-Castrellón P, Enríquez-Flores S, López-Velázquez G. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Dec;58(12):7072-82.
12. López-Velázquez G, Reyes-Vivas H, Hernández-Alcántara G, de la Mora-de la Mora I, *et al*. Las Crónicas de *Giardia*. El parásito, la molécula y el fármaco. Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVII, (2013), 196-212.
13. Cloning, expression, purification and characterization of his-tagged human glucose-6-phosphate dehydrogenase: a simplified method for protein yield. Gómez-Manzo S, Terrón-Hernández J, de la Mora-de la Mora I, García-Torres I, López-Velázquez G, Reyes-Vivas H, Oria-Hernández J. Protein J. 2013 Oct;32(7):585-92.
14. The E104D mutation increases the susceptibility of human triosephosphate isomerase to proteolysis. Asymmetric cleavage of the two monomers of the homodimeric enzyme. De La Mora-De La Mora I, Torres-Larios A, Mendoza-Hernández G, Enriquez-Flores S, Castillo-Villanueva A, Mendez ST, Garcia-Torres I, Torres-Arroyo A, Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Oria-Hernández J, López-Velázquez G, Reyes-Vivas H. Biochim Biophys Acta. 2013 Dec;1834(12):2702-11.
15. Structural and functional perturbation of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by modification of a non-catalytic, non-conserved region. Hernández-Alcántara G, Torres-Larios A, Enríquez-Flores S, García-Torres I, Castillo-Villanueva A, Méndez ST, de la Mora-de la Mora I, Gómez-Manzo S, Torres-Arroyo A, López-Velázquez G, Reyes-Vivas H, Oria-Hernández J. PLoS One. 2013 Jul 22;8(7):e69031.
16. Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: a study for antiparasitic drug design. Enríquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernández-Alcántara G, Oria-Hernández J, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Hernández G, de la Mora-de la Mora I, Castillo-Villanueva A, García-Torres I, Méndez ST, Gómez-Manzo S, Torres-Arroyo A, López-Velázquez G, Reyes-Vivas H. Proteins. 2011 Sep;79(9):2711-24.
17. Unraveling the mechanisms of tryptophan fluorescence quenching in the triosephosphate isomerase from Giardia lamblia. Hernández-Alcántara G, Rodríguez-Romero A, Reyes-Vivas H, Peon J, Cabrera N, Ortiz C, Enríquez-Flores S, De la Mora-De la Mora I, López-Velázquez G. Biochim Biophys Acta. 2008 Nov;1784(11):1493-500.
18. Species-specific inhibition of Giardia lamblia triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. Enriquez-Flores S, Rodriguez-Romero A, Hernandez-Alcantara G, De la Mora-De la Mora I, Gutierrez-Castrellon P, Carvajal K, Lopez-Velazquez G, Reyes-Vivas H. Mol Biochem Parasitol. 2008 Feb;157(2):179-86.
19. Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. Reyes-Vivas H, Diaz A, Peon J, Mendoza-Hernandez G, Hernández-Alcántara G, De la Mora-De la Mora I, Enriquez-Flores S, Dominguez-Ramirez L, Lopez-Velazquez G. J Mol Biol. 2007 Jan 19;365(3):752-63.
20. An unusual triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. López-Velázquez G, Molina-Ortiz D, Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Peon-Peralta J, Yépez-Mulia L, Pérez-Montfort R, Reyes-Vivas H. Proteins. 2004 Jun 1;55(4):824-34.

21. Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Mendoza-Hernández G, López-Velázquez G, Pérez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. Proteins. 2002 Aug 15;48(3):580-90.
22. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI. Mol Cancer Ther. 2004 Mar;3(3):363-371.
23. Cytochrome P450 1 family and cancers. Go RE, Hwang KA, Choi KC. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015 Mar;147:24-30.
24. Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment. Mittal B, Tulsyan S, Kumar S, Mittal RD, Agarwal G. Adv Clin Chem. 2015;71:77-139.
25. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Livak KJ1, Schmittgen TD. Methods. 2001 Dec;25(4):402-408.
26. Valetti C, Sitia R. The differential effects of dithiothreitol and 2-mercaptoethanol on the secretion of partially and completely assembled immunoglobulins suggest that thiol-mediated retention does not take place in or beyond the Golgi. Mol Biol Cell 1994;5(12):1311-24.
27. Poole LB. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. Free Radic Biol Med 2015;80:148-57.
28. Kelly SM., Price NC. 1997. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. Biochimica et Biophysica Acta. 1338:161–185.
29. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. 2005. How to study proteins by circular dichroism. Biochimica et Biophysica Acta. 1751: 119–139.
30. Tedesco D, Bertucci C. 2015. Induced circular dichroism as a tool to investigate the binding of drugs to carrier proteins: Classic approaches and new trends Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 113 34–42.

Sugerencias didácticas:	**Mecanismos de evaluación del aprendizaje de los alumnos:**
_X___ Exposición oral __X__ Exposición audiovisual __X__ Ejercicios dentro de clase __X__ Ejercicios fuera del aula __X__ Seminarios __X__ Lecturas obligatorias __X__ Trabajos de investigación ____ Prácticas de taller o laboratorio ____ Prácticas de campo ____ Otros *(indicar cuáles)*____ Trabajos de investigación ____ Prácticas de taller o laboratorio ____ Prácticas de campo ____ Otros *(indicar cuáles)*	__X__ Exámenes parciales ____ Examen final escrito __X__ Tareas y trabajos fuera del aula __X__ Exposición de seminarios por los alumnos __X__ Participación en clase __X__ Asistencia ____ Seminario ____ Otros *(indicar cuáles)*

Línea de investigación: Desarrollo racional de fármacos.

Perfil profesiográfico: Tener conocimiento de estrategias metodológicas para la obtención y caracterización de proteínas vinculadas con el proceso salud-enfermedad. Tener capacidad docente. Capacidad de manejo de grupo.

Repartición de horas

Curso. **CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS VINCULADAS CON EL PROCESO SALUD-ENFERMEDAD**. Semestre 2024-2

Posgrado en Ciencias Biológicas.

Clases martes y jueves de 9:00 a 11:00 hrs.

PRIMERA CLASE (Introducción al curso)
Exámen diagnóstico (sin valor para la calificación del curso), presentación del curso, discusión acerca de las perspectivas de los alumnos, explicación de las características del trabajo final, acuerdos para calificar. Todos los profesores. 1 sesión. 2 horas.

UNIDAD 1.
Dra. Cynthia Fernández Lainez
Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz, piso 9, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría. 5 sesiones. 10 horas.

UNIDAD 2.
Dra. Itzhel García Torres
Laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil, piso 5, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría. 5 sesiones. 10 horas.

UNIDAD 3.
Dra. María Dora Molina Ortiz
Laboratorio de Toxicología Genética, piso 8, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría. 5 sesiones. 10 horas.

UNIDAD 4.
Dr. José Ignacio de la Mora de la Mora
Laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil, piso 5, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría. 5 sesiones. 10 horas.

UNIDAD 5.
Dr. Sergio Enríquez Flores
Laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil, piso 5, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría. 5 sesiones. 10 horas.

UNIDAD 6.
Dr. Luis Antonio Flores López
Laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil, piso 5, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría. 5 sesiones. 10 horas.

UNIDAD 7.
Integración y aplicación del conocimiento adquirido
Todos los profesores 2 sesiones. 4 horas.