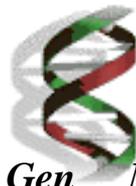


Genética Molecular

*Universidad Nacional de
Quilmes*



Gen Mol

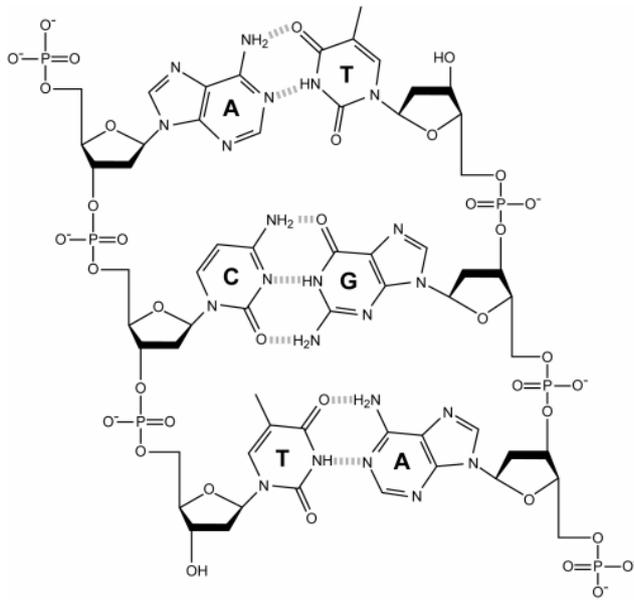
Guía de seminarios

PARTE I: ÁCIDOS NUCLEICOS**ESTRUCTURA, FUNCIÓN y REPLICACION****A) GUÍA DE ESTUDIO**

- 1) ¿Qué hicieron Miescher, Chargaff y Watson y Crick con respecto al DNA?
- 2) ¿Cuáles fueron las conclusiones de los experimentos de Griffith; Avery, MacLeod y McCarthy; Hershey y Chase?
- 3) Dibuje la estructura química y el respectivo nombre de las bases nitrogenadas, desoxinucleósidos, ribonucleósidos, desoxinucleótidos y ribonucleótidos que constituyen los ácidos nucleicos.
- 4) ¿Qué grupos químicos se encuentran en los extremos de una molécula de DNA de cadena simple? ¿Y en los extremos de una de cadena doble?
- 5) Sugiera un método para diferenciar DNA de cadena simple de RNA.
- 6) Explique por qué a mayor concentración salina en el medio, la hibridación entre dos hebras de DNA es menos rigurosa, y viceversa.
- 7) ¿Cómo influye la temperatura y la concentración de sales en el grado de hibridación entre dos cadenas complementarias? ¿Cómo se puede lograr la hibridación entre dos cadenas con complementariedad parcial?
- 8) ¿En la molécula de DNA, qué uniones relacionan: a) dos desoxirribosas entre sí; b) dos bases enfrentadas; c) dos bases apiladas?
- 9) ¿Qué secuencias del DNA son propicias para la formación de estructura Z? ¿Existe dicho Z DNA *in vivo*?
- 10) ¿Podría ocurrir la polimerización en la dirección 3'→5'. En tal caso, ¿qué función se vería afectada?
- 11) Describa en detalle el proceso de replicación del DNA.
 - a. Explique por qué al producirse la estructura en Y (horquilla de replicación) una de las cadenas hijas se sintetiza en fragmentos.
 - b. Describa la acción de todas las enzimas involucradas en el proceso de replicación del DNA.
- 12) Describa en detalle el experimento desarrollado por Okazaki (1968) que permitió evidenciar que la replicación es semi-discontinua.
- 13) Describa en detalle el experimento de Meselson y Stahl.
 - a. ¿Qué resultados experimentales (dibuje la posición de las bandas en los gradientes de cloruro de cesio) habrían obtenido Meselson y Stahl si la replicación del DNA fuera conservativa? ¿Y si fuera dispersiva?
 - b. ¿Qué resultados habrían obtenido si hubieran alimentado a las bacterias primero con ¹⁴N (liviano), pasándolas luego a ¹⁵N (pesado), y analizando entonces el DNA al cabo de la primera, segunda y tercera generaciones?
- 14) ¿La tautomería de bases da lugar a la aparición de emparejamientos erróneos durante la replicación del ADN. ¿Cómo se llama el proceso de corregir estos errores, incluso durante la replicación y qué características tiene?

B) PROBLEMAS**PROBLEMA 1**

- a) En la figura señale, englobando con un trazo continuo, lo siguiente:



- 1- un nucleótido
- 2- un nucleósido
- 3- una base púrica
- 4- una base pirimídica
- 5- un puente de hidrógeno
- 6- una unión fosfodiéster
- 7- un extremo 3'
- 8- un extremo 5'
- 9- una desoxirribosa
- 10- un par de bases

b) ¿Qué peso molecular promedio tiene un DNA de cadena doble de 150 pares de bases de longitud?
 Dato: PM de un par de bases (en realidad, un par de nucleótidos) = 650 Da

PROBLEMA 2

A diferencia de los bacteriófagos de la familia T (T2 o T4), el fago M13 no infecta a *E. coli* mediante la inyección de su DNA al protoplasma, sino que penetra entero con su cápside proteica de la cual es desnudado dentro de la bacteria. ¿Le parece a Ud. que Hershey y Chase (experimento del fago T2 marcando proteínas con ³⁵S y DNA con ³²P, licuadora, etc.) habrían llegado a las mismas conclusiones que llegaron si hubieran usado el fago M13 en lugar del T2? ¿Por qué?

PROBLEMA 3

Un segmento de DNA de cadena simple tiene la siguiente composición de bases: A 31,5% C, 23,7% T 17,1% G 27,7%. ¿Cuál sería la composición de bases de la cadena complementaria? ¿Cuál sería la composición de bases de la forma de doble cadena de dicho segmento?

PROBLEMA 4

Dadas las siguientes moléculas de ácidos nucleicos de cadena doble:

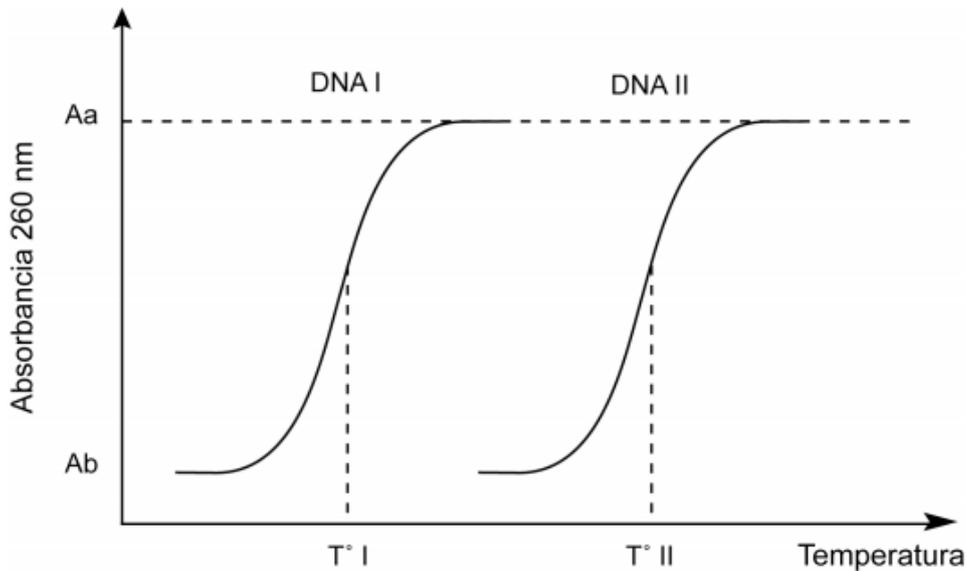
- a) AAGTTCTCTGAA
TTCAAGAGACTT
- b) GTCGTCAATGCA
CAGCAGTTACGT
- c) GGACCTCTCAGG
CCTGGAGAGTCC

Señale verdadero o falso y justifique:

- a) Ninguna de las tres moléculas puede ser degradada por una RNasa.
- b) Las tres moléculas tienen igual temperatura de fusión (Tm) porque tienen la misma longitud.
- c) Las 3 tienen igual Tm porque $[T]/[A] = 1$ y $[G]/[C] = 1$ (Reglas de Chargaff)
- d) Las dos hebras de cada una de ellas son antiparalelas.
- e) $Tm\ a > Tm\ b > Tm\ c$
- f) $Tm\ b > Tm\ a > Tm\ c$
- g) $Tm\ c > Tm\ b > Tm\ a$
- h) $Tm\ a > Tm\ c > Tm\ b$

PROBLEMA 5

Explique el siguiente gráfico, obtenido midiendo la absorbancia (A) de luz UV de dos muestras de DNA sometidas cada una a calentamiento gradual:



- a) ¿A qué corresponden T° I y T° II?
- b) ¿A qué corresponden Aa y Ab?
- c) ¿Qué diferencia existe entre el DNA de la curva I y el de la curva II?
- d) ¿Cómo haría el experimento para determinar la T° I y la T° II?
- e) Grafique la curva correspondiente a una muestra de DNA II al doble de la concentración original manteniendo proporcionalmente la concentración de sales.

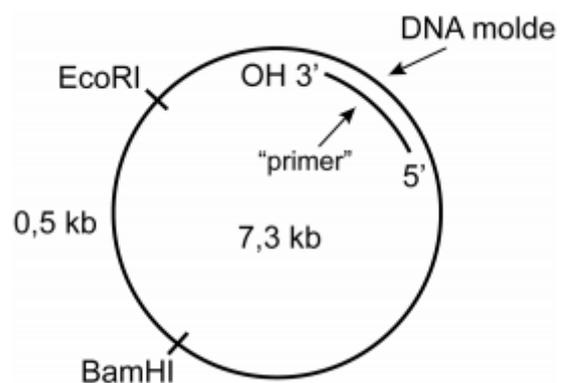
PROBLEMA 6

¿Qué consecuencias tendría para una bacteria la pérdida, por mutación, de la actividad nucleasa de 3' a 5' de la DNA polimerasa III? Justifique.

PROBLEMA 7

En un tubo de ensayo se agregan los siguientes componentes para la síntesis de DNA *in vitro*:

- DNA molde: DNA circular de cadena simple (7,3 kb) (ver figura)
- cebador o "primer" (ver figura)
- dATP (desoxiadenosina trifosfato)
- dGTP (desoxiguanosina trifosfato)
- dCTP (desoxicitidina trifosfato)
- dTTP (desoxitimidina trifosfato)
- buffer conteniendo Mg^{2+}
- DNA polimerasa I purificada



- a) ¿Qué producto de reacción se obtiene?
- b) ¿Qué productos se obtendrán si al final de la reacción de la DNA polimerasa I se agrega la enzima de restricción* EcoRI?
- c) ¿Y si se agregan EcoRI y BamHI juntas?

2) Apareamiento: 60 seg a 42°C

3) Extensión: 30 seg a 72°C

Preguntas:

a) ¿Cuál es la longitud (en pares de bases) del producto de la PCR?

b) ¿Cuál es el peso molecular del producto de la PCR?

c) ¿Cuál es la masa aproximada de producto obtenida al cabo de 30 ciclos, si se partió de un material conteniendo 10 moléculas de molde (genoma viral)? Considere que el n° de moléculas de producto puede calcularse aproximadamente como $x \cdot 2^n$, donde $x = n^{\circ}$ de moléculas de molde y $n = n^{\circ}$ de ciclos.

d) ¿Cuál sería el producto de PCR si se omitiera...

i) uno de los "primers"?

ii) los dos "primers"?

iii) el DNA molde?

e) ¿Cuál sería el producto de PCR si se reemplazara...

i) el DNA molde por DNA obtenido a partir de células de raíz capilar del mismo individuo?

ii) el DNA molde por ácido nucleico del virus HIV purificado?

iii) el "primer" a por otro de 20 nucleótidos, pero de secuencia complementaria a la hebra de arriba de la región a?

iv) la Taq polimerasa por la DNA polimerasa I de *E. coli* ?

f) Dado que la PCR es extremadamente sensible, que controles realizaría para descartar una eventual contaminación.

Dato: PM de un par de nucleótidos apareados = 650 Da

PROBLEMA 10

Se desea amplificar por PCR un determinado segmento de DNA genómico como el señalado en la parte de arriba de la Figura 1. La mezcla de reacción contiene la muestra de DNA genómico, desoxirribonucleósidos trifosfato, buffer de pH 7 conteniendo magnesio, los dos oligodesoxirribonucleótidos "primers" (I y II) y la Taq polimerasa. Al cabo de 30 ciclos de PCR, se obtiene una gran cantidad de producto de PCR.

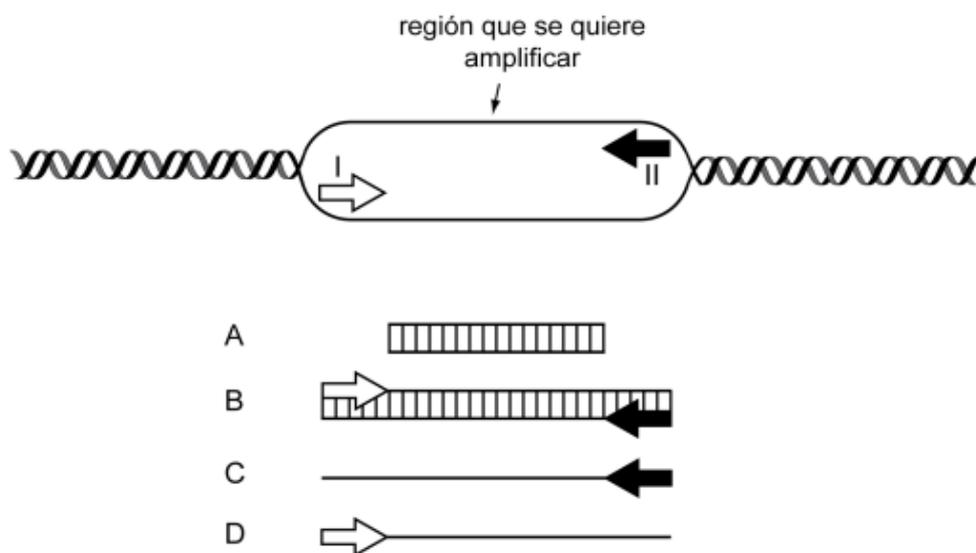


Figura 1

Preguntas:

- a) ¿Cuál de los esquemas de la Figura 1 (A, B, C o D) corresponde al producto de PCR? Justifique.
- b) ¿Qué paso de la PCR evita la necesidad de agregar helicasa a la mezcla de reacción? Justifique.
- c) La Taq polimerasa no tiene actividad 3'-5' exonucleasa. ¿Qué consecuencias tiene este hecho para el producto de PCR?
- d) Si los "primers" fueran **parcialmente** complementarios a las secuencias del DNA molde, ¿en cuáles de las siguientes condiciones experimentales sería conveniente trabajar para que se apareen a las mismas y la reacción de PCR pueda ocurrir?
- ¿alta o baja concentración salina?
 - ¿alta o baja temperatura en la etapa del apareamiento?
 - ¿alta o baja concentración de un agente desnaturante (por ej., dimetilsulfóxido) en la mezcla de reacción?

Elija una opción en cada caso y justifique.

- e) La secuencia a amplificar tiene un 50% de T y A. Con el objeto de obtener un producto de PCR radiactivo, un investigador agregó a la mezcla de reacción, al comienzo del primer ciclo, exceso de desoxiATP marcado con fósforo 32 (radiactivo) en su fosfato gamma (γ) (ver Figura 2). Para su sorpresa, el producto de PCR no resultó radiactivo. ¿Por qué? ¿Qué error cometió el investigador? Justifique.

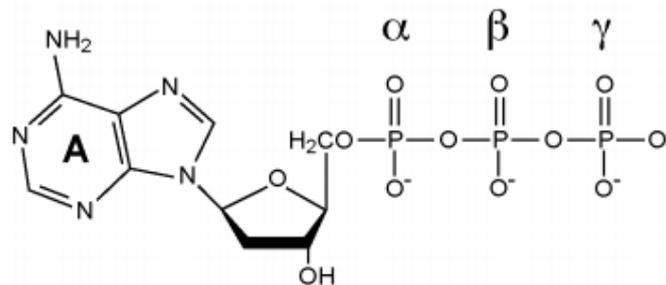


Figura 2

PROBLEMA 11

Muchos fármacos son metabolizados por un grupo de enzimas, pertenecientes a la superfamilia citocromo p450 (también llamadas CYP). De esta superfamilia, la enzima CYP2B6 metaboliza al Efavirenz, un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa que se emplea como parte de la terapia antirretroviral altamente activa (TARAA, equivalente al inglés HAART) en el tratamiento de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV).

Cuando el gen que codifica para esta enzima presenta un cambio de una guanina por una timina en la posición 516 de la secuencia nucleotídica (c.516G>T), se produce un cambio del aminoácido glutamina por histidina en la posición 172 de la proteína (p.Gln172His).

Esta modificación produce que la enzima CYP2B6 tenga menor actividad y en consecuencia el fármaco se mantenga por más tiempo en el plasma. Por lo tanto los pacientes que presentan el gen mutado necesitan dosis menores de Efavirenz para su tratamiento.

Ud. Necesita realizar el estudio de farmacogenética y para ello debe amplificar la región del exón 4 del gen CYP2B6, para ello ud. Cuenta con un par de *primers* que le prestó un amigo que trabaja en otro laboratorio:

Primer forward (CYP2B6-4F): 5' - GGTCTGCCCATCTATAAAC - 3'

Primer reverse (CYP2B6-4R): 5' - CTGATTCTTCACATGTCTGCG - 3'

- a) Ubíquelos en la secuencia que se presenta a continuación:

GCTGGGTTTAGAGGTATGGGCCCTGTGCCACCCAGGGCTTTTTAATTTATATAAGCAATT
 GATTGAACACCTACTCTGCCCAGCCCCTATCCCTGGGATTTAACTGTACTCACTCCCAGAGT
 CAGAGGTGGGGCCTGAGAGGAGGTGCAGAGTGAGAACCGGCTGCATGGACTCTATAGCTGTG
 TTGCCTGGGTCTAAATCCTGGCCTCAGTAATGAGTAGCTGTGCAACTTTGGTCAAATTACTC
 AGCCTCTCGGTCTGCCCATCTATAAACTGGAGCTAATAATCAAATTGCATCTGCCTCACATT
 GTTGTAGTGAGAGTTCAATGGAATTACGCGTGACGTGCTGGTACATAATTAGCTGTTACGGT
 TATTCTCATGTTTACCATTACTGAGTGATGGCAGACAATCACACAGAGATAGGTGACAGCCT
 GATGTTCCCAGGCACTTCAGTCTGTGTCCTTGACCTGCTGCTTCTTCCTAG**GGGCCCTCAT**
GGACCCACCTTCCTCTTCCAGTCCATTACCGCCAACATCATCTGCTCCATCGTCTTTGGAA
AACGATTCCACTACCAAGATCAAGAGTTCTGAAGATGCTGAACCTTGTTCTACCAGACTTTT
TCACTCATCAGCTCTGTATTTCGGCCAGGTCAGGGAGACGGAGAGGGACAGGGGGTGTGGGGG
TGAGGTGAACACCCAGAACACACGAGAAAAGGATGACCTGTCTTGGGGCTCAGAAATGCAG
CTTATCCTTGAAGAAACGCAGACATGTGAAGAATCAGGGACATGGAGACCTGGAGGGAGGA
 GAGACGGTGAGACAGGGATAGAGACTGAGAGAGAGAATGAGGCGTGATGGGGAGGCAGAA
 ATAGAGTCAGAGAGAGACTGAGAGAAGGAAGATGAGCAAAAACAAGACAAAGAAGAGCAGAA
 ATCAAGAGATTCTGAGAGACAGAGTTGATGAGAATGAGTGTGAAAGAGAGGGAGAGAGAGAG
 AACGAATAAGGCTTTGGGCTTCATGTCT

b) Para que no se enteren los jefes de su amigo, ud. Decide diseñar otros primers que amplifiquen el exón 4 (resaltado). No olvide que debe escribirlos en la orientación adecuada según la convención.

PROBLEMA 12

Al ser lineales, los cromosomas de las células eucariotas sufren un acortamiento progresivo cada vez que duplican su DNA. Este acortamiento es contrarrestado por la actividad de una enzima llamada **telomerasa**. La **proteína de la telomerasa** está formada por 5 tipos de subunidades distintas (a, b, c, d y e), cada uno de ellos codificado por un gen distinto. Cada molécula de telomerasa tiene $1a + 1b + 2c + 2d + 2e$, es decir, ocho polipéptidos en total. La figura 1 muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de la telomerasa pura, teñida con azul de Coomassie, un colorante **que sólo tiñe polipéptidos**. El patrón de bandas observado es el mismo con o sin tratamiento previo con betamercaptoetanol.

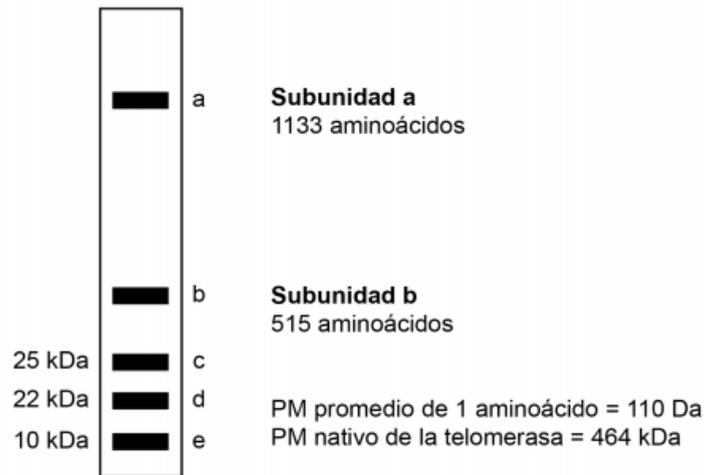


Figura 1

Preguntas

a) ¿A qué se debe el acortamiento progresivo de los cromosomas lineales como consecuencia de la duplicación del DNA?.

b) Teniendo en cuenta la composición polipeptídica de la telomerasa (1a + 1b + 2c + 2d + 2e) después de hacer sus cálculos (**muéstrellos**) usted encontrará una gran diferencia numérica con el PM nativo estimado para la enzima completa (464 kDa). ¿A qué se debe esta diferencia? ¿Qué tiene que ver esta diferencia con el mecanismo de acción de la telomerasa?

c) La Figura 2 muestra las dos hebras del DNA de un telómero. ¿Cuál de las dos, la de arriba o la de abajo, es alargada por la telomerasa? ¿Cómo se completa el DNA de la hebra complementaria a la alargada por la telomerasa? Justifique.

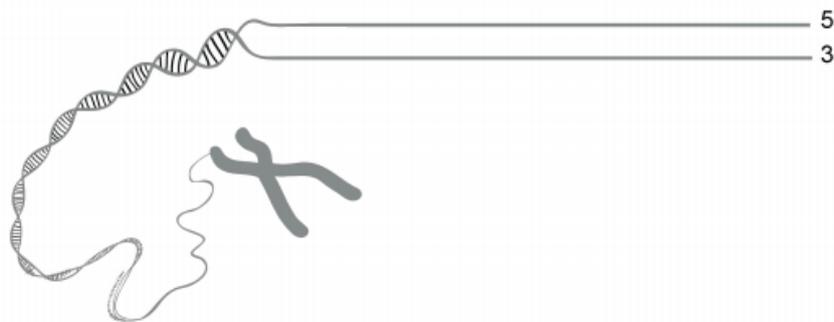
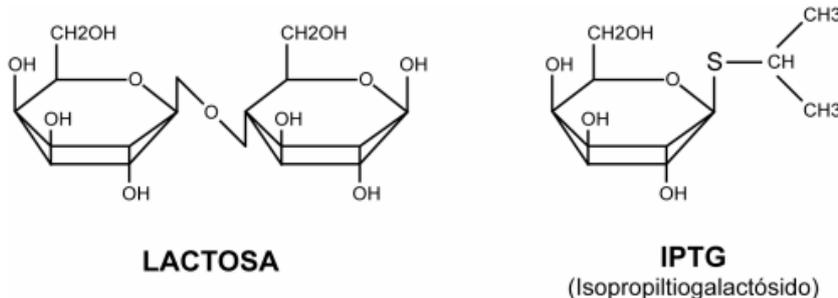


Figura 2

PROBLEMA 13

a) En base a las fórmulas mostradas, ¿por qué el represor del operón *lac*, proteína que normalmente se une a la lactosa, puede también unirse al IPTG?



b) ¿Qué significa que el IPTG tiene mayor afinidad por el represor que la lactosa?

Walter Gilbert, premio Nobel de Química 1980, en 1966 hizo el siguiente experimento que lo hizo famoso:

Incubó bacterias *E. coli*, *wild-type* o mutantes, junto con IPTG marcado radiactivamente (¹⁴C). Luego rompió las células y puso los extractos resultantes en bolsitas de diálisis (cuyos poros dejan pasar moléculas pequeñas como el IPTG pero no proteínas) sumergidas en buffer salino. Luego de 5 horas, midió la radiactividad adentro y afuera de las bolsitas. Los resultados que obtuvo fueron (en unidades arbitrarias de concentración):

	Cepa <i>wild-type</i>	Cepa mutante
Adentro	125	841
Afuera	100	475
Adentro, después de seguir dializando poniendo afuera gran volumen de buffer nuevo	2	78

c) Se sabe que la mutante fabrica cantidades normales de proteína represora. Entonces, ¿qué características genéticas tiene la bacteria mutante?

d) ¿Es reversible la unión del represor al IPTG?

e) Walter Gilbert se propuso purificar la proteína represora. ¿Cree Ud. que estos experimentos lo ayudaron en su propósito?

PROBLEMA 14

Ud. tiene que eliminar de la muestra de DNA de un paciente una gran cantidad de RNA que la contamina. Para ello, debe tratar a la solución que contiene a ambos con una enzima RNasa (ribonucleasa). Como las RNasas altamente purificadas son muy caras y Ud. no dispone de muchos fondos, decide comprar una RNasa que viene contaminada con trazas de DNasa (desoxirribonucleasa). Basándose en el conocimiento de que las RNasas son consideradas “termorresistentes” mientras que las DNasas no, decide pre-tratar la solución de RNasa comprada, calentándola por 10 minutos a 90°C y transfiriéndola inmediatamente a un balde con hielo. Desafortunadamente cuando prueba su preparación así pre-tratada sobre su muestra, Ud. comprueba que ni el DNA, ni el RNA fueron degradados. ¿Qué error cometió Ud.?

PROBLEMA 15

Basado en los pioneros trabajos de Arthur Kornberg (1918-2007; premio Nobel 1959) y sus continuadores. La **replicación del DNA** es un proceso clave en todos los organismos porque garantiza la continuidad de la información genética a través de las generaciones de manera fiel y rápida, antes de cada división celular. Por ejemplo, en *E. coli*, la replicación es realizada por la **DNA Polimerasa III**, que es una proteína con estructura cuaternaria compuesta por **15 subunidades de 10 tipos diferentes**, llamada “**holoenzima**”, que realiza la mayoría (pero no todas) de las actividades enzimáticas necesarias para el proceso *in vivo*.

En el laboratorio de Arthur Kornberg se ha logrado purificar la holoenzima completa, así como cada una de las subunidades que pudieron separarse entre sí mediante tratamiento con urea **solamente**. La Tabla 1 indica los pesos moleculares (PM) de los diferentes tipos de subunidades, separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS:

Subunidad	PM (kDa)	Subunidad	PM (kDa)
α	132	ε	27
β	37	θ	10
γ	52	τ	71
δ	35	ψ	12
δ'	33	χ	15

Tabla 1

La subunidad α contiene el sitio activo de la actividad **polimerasa** propiamente dicha; a la β se la conoce como “agarradera deslizante”, o *clamp* en inglés, porque a manera de anillo, enhebra a la hebra molde y asegura “procesividad” (elongación); la ε aporta la actividad de 3’-5’ exonucleasa; y las demás subunidades aportan roles estructurales, asociando a otras entre sí.

El PM de la holoenzima completa purificada, estimado por tamiz molecular (Sephadex), es **701 kDa**. Si se reconstituye la holoenzima a partir de sus subunidades, **pero omitiendo** τ, la subunidad

α queda incluida en un oligómero de apenas **206 kDa**, manteniéndose la actividad de polimerasa *in vitro* y su fidelidad.

Preguntas

a) ¿Cuál de los dos modelos de estructura cuaternaria de la holoenzima representados en la Figura 1 es consistente con **todos** los datos, el A o el B? **Fundamente su respuesta.**

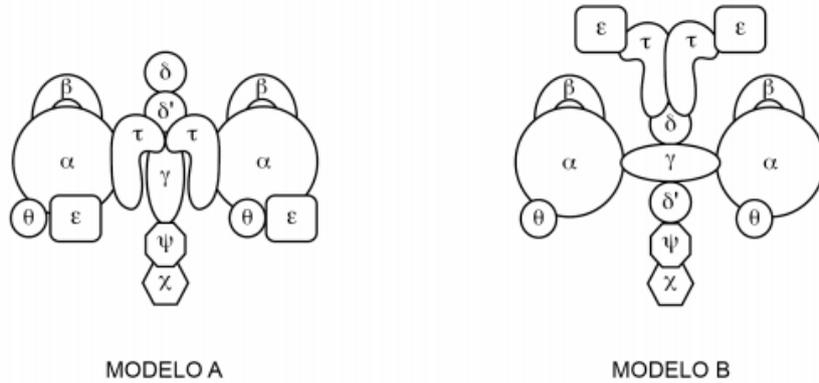


Figura 1

b) En base al enunciado, ¿qué tipos de uniones químicas mantienen asociadas a las subunidades de la holoenzima de *E. coli* descritas por Kornberg? ¿Hay uniones disulfuro entre ellas?

Por otra parte, los procariontes termófilos *Thermus aquaticus* (*Taq*) y *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), contienen una DNA polimerasa similar a la DNA pol III de *E. coli*, pero con ciertas diferencias estructurales y funcionales, cuya subunidad catalítica también se llama α . Con la intención de entender algunas de esas diferencias, se hicieron 2 tipos de experimentos:

1. Replicación de DNA *in vitro* a 37 °C usando un molde de DNA de cadena simple, un “primer” complementario al mismo, desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) y Mg²⁺.
2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un molde de DNA de cadena doble, “primers” adecuados, dNTPs y Mg²⁺, con 30 ciclos de 95°C, 72°C y 65°C cada uno.

En cada uno de los dos tipos de experimento se usaron distintas fuentes de DNA polimerasa purificada, según se indica en la Tabla 2:

Exp.	Enzima usada	Replicación de DNA <i>in vitro</i>		PCR
		Hebra complementaria al molde sintetizada	Frecuencia de error* de la síntesis de DNA	Producto de PCR fabricado
1	holoenzima de <i>E. coli</i>	SÍ	10 ⁻⁶	NO
2	holoenzima de <i>E. coli</i> sin α	NO	-	NO
3	holoenzima de <i>E. coli</i> sin τ	SÍ	10 ⁻⁶	NO
4	holoenzima de <i>E. coli</i> sin ϵ	SÍ	10 ⁻⁴	NO
5	Subunidad α de <i>Taq</i>	SÍ	10 ⁻⁴	SÍ
6	Subunidad α de <i>Pfu</i>	SÍ	10 ⁻⁶	SÍ
7	Subunidad α de <i>Pfu</i> mutada en uno de sus aminoácidos	SÍ	10 ⁻⁴	SÍ
8	Subunidad α de <i>Pfu</i> pre-tratada con mercaptoetanol	SÍ	10 ⁻⁶	NO

* 10⁻⁶ = 1 mutación cada millón de nucleótidos incorporados.

10⁻⁴ = 1 mutación cada 10.000 nucleótidos incorporados.

Tabla 2

c) Como se mencionó, el oligómero de **206 kDa** que incluye una subunidad α **preserva la actividad de polimerasa y su fidelidad** sólo *in vitro* (experimento 3 de la Tabla). ¿Por qué la duplicación del DNA *in vivo* requiere de la holoenzima completa conteniendo **las 2 subunidades α** ? **Justifique.**

d) ¿En base a los datos de la Tabla 1, qué diferencias en cuanto a la actividad 3'-5' exonucleasa existen entre las subunidades α de *E. coli*, *Pfu* y *Taq*? Fundamente su razonamiento, aclarando la implicancia biológica de dicha actividad.

e) Interprete los resultados del experimento 8.

f) Diseñe un experimento que le permita determinar la **posesividad** de cada una de las polimerasas estudiadas.

PROBLEMA 16

En la retina del ojo de los humanos existen dos tipos de células: los bastones y los conos. Los bastones expresan específicamente una proteína llamada rodopsina, la cual posibilita la visión en general. En cuanto a los conos, existen tres tipos celulares diferentes: los conos "azules", los "rojos" y los "verdes", expresando específica y exclusivamente cada uno de estos las proteínas conocidas como pigmentos visuales "azul", "rojo" y "verde" respectivamente. Estos pigmentos son capaces de captar luz de los colores indicados por su nombre y el funcionamiento conjunto de los tres tipos de conos da por resultado la visión policromática.

El gen del pigmento azul (gen A) se encuentra localizado en el cromosoma humano N° 7. En cambio, los genes de los pigmentos rojo (gen R) y verde (gen V) se encuentran uno al lado del otro (o sea, en tandem) en el cromosoma sexual X, no habiendo contraparte en el cromosoma Y.



Figura 1

Cada uno de estos dos genes tiene su propio promotor y región reguladora de la transcripción, y se transcriben de manera específica, es decir, el gen R sólo en los conos "rojos" y el gen V sólo en los conos "verdes".

Los genes R y V tienen secuencias nucleotídicas muy similares (98% de similitud), a tal punto que muchos sitios para enzimas de restricción se encuentran conservados en ambos genes. La Figura 2 muestra una estructura más detallada de ellos.

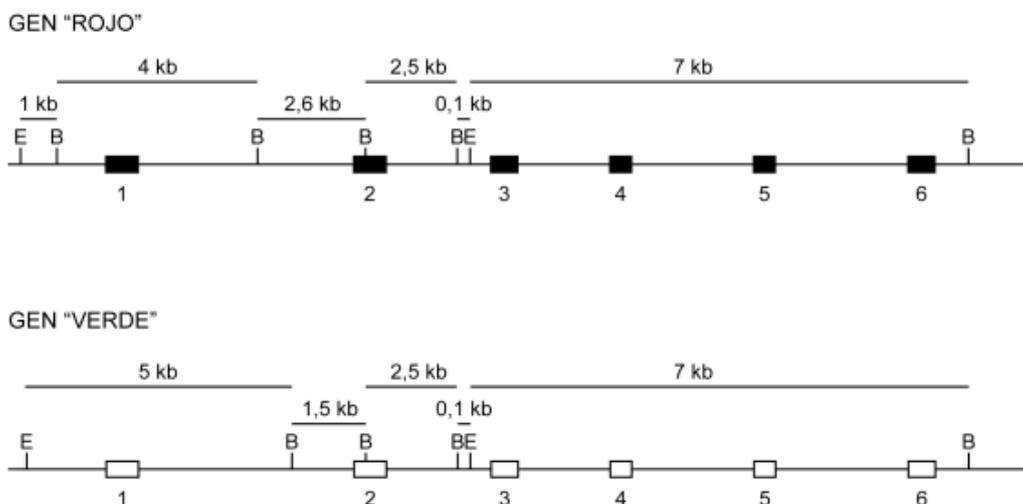


Figura 2

Desde 1779 se conoce el carácter hereditario de la alteración en la visión en colores en humanos. Varones que tengan deletado el gen R no ven el rojo y varones que tengan deletado el gen V, no ven el verde.

a) Dibuje las bandas de hibridación que obtendría en un *Southern* de DNA genómico cortado simultáneamente con las enzimas de restricción EcoRI (E) y BamHI (B), obtenido de sangre de los siguientes individuos:

- varón R^+V^+ : tiene los dos genes sanos y enteros.
- varón R^+V^- : tiene deletado el gen "verde".
- varón R^-V^+ : tiene deletado el gen "rojo".
- varón R^-V^- : tiene deletados ambos genes.

Se utilizó como sonda a un clon de cDNA que contiene **sólo los exones 1 y 2 del gen "verde"**, marcado con ^{32}P por "*nick translation*". Esta sonda reconoce a ambos genes, aún en condiciones de alta rigurosidad de hibridación (baja sal).

b) ¿Es el experimento anterior útil para determinar los genotipos de las cuatro personas?

Justifique.

c) Dibuje las bandas de *Southern* que hubiera obtenido de los mismos pacientes si en lugar de usar la sonda indicada se hubiera usado como sonda **sólo al exón 5**. ¿Hubiera sido este análisis tan informativo como el de la pregunta a)? Justifique.

d) Una manera más rápida de efectuar el análisis de los cuatro individuos es realizando una PCR con "*primers*" específicos para el gen "verde" que se aparean a zonas de sus exones 4 y 5, según se ve en la Figura 3. Estos *primers* no se aparean con las secuencias de los exones 4 y 5 del gen "rojo":

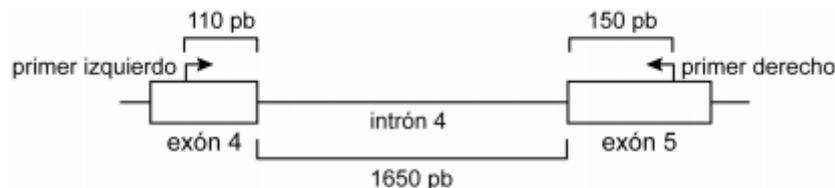


Figura 3

Diga si detecta o no productos de PCR y de qué tamaño para cada uno de los cuatro individuos, habiendo usado como molde DNA genómico de sangre.

e) ¿Qué productos de PCR y de qué tamaño habría obtenido en cada uno de los individuos si hubiera usado como molde cDNA total obtenido de retina?

f) ¿Con cuál de las dos hebras (codificante o no codificante) se aparearía el primer izquierdo? ¿Y el derecho?

g) La delección de la región del cromosoma X marcada como LCR en la figura 1 provoca una fuerte disminución de la transcripción de ambos genes R y V. ¿Qué función le atribuiría Ud. a la región LCR? ¿Qué motivos de secuencia aminoacídica esperaría Ud. encontrar en las proteínas que se unan a la región LCR? Justifique.

h) ¿Qué fenotipo esperaría Ud. encontrar en un animal (cuyo mecanismo de visión policromática normal fuera similar al de los humanos) en el cual se haya introducido un transgén que llevara la región promotora del gen "rojo" incluyendo el LCR, colocada "río arriba" del gen de la toxina diftérica, una proteína que mata sólo a las células donde se fabrica.

i) ¿Qué colores percibirán los humanos R^-V^- y los humanos que tienen deletado el LCR?

PARTE II: ÁCIDOS NUCLEICOS

TRANSCRIPCIÓN, MODIFICACIONES POST-TRANSCRIPCIONALES Y REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

A) GUÍA DE ESTUDIO

- 1) Haga un esquema de un gen eucariótico típico. Señale qué porciones del gen se verán representadas en el mRNA maduro y qué porciones se verán representadas en la proteína que codifica.
- 2) ¿Qué significa que la TATA box (TATA) es una secuencia consenso? Escriba todas las secuencias posibles que caigan dentro del consenso de la TATA box. ¿Qué función cumpliría la TATA box?
- 3) Describa las diferencias entre los RNA mensajeros de procariontes y de eucariotes.
- 4) ¿Qué es un RNA mensajero policistrónico y en qué organismos se observa este tipo de mRNA?
- 5) Defina: a) gen, b) replicón, c) plásmido, d) intrón, e) exón, f) *splicing*, g) pseudogén
- 6) ¿A partir de qué sustratos se sintetiza RNA mensajero? ¿Sobre qué molde? ¿Se requiere cebador o "primer"? Describa las enzimas que realizan la transcripción en procariontes y eucariotes.
- 7) ¿La sustitución de una base por otra en una zona del DNA que codifica para proteínas (mutación puntual) da lugar necesariamente a un cambio de aminoácido?
- 8) Describa el mecanismo propuesto para el procesamiento (*splicing*) del RNA mensajero. ¿Qué entiende por *splicing* alternativo o diferencial?
- 9) Además del *splicing* del RNA, ¿existe el "*splicing*" de proteínas? ¿Qué son las inteínas y las exteínas? ¿Para qué codifican las inteínas?
- 10) ¿Qué es una enzima de restricción? ¿De dónde se obtienen? ¿Para qué se usan? ¿Qué tipos de extremos pueden dejar en el DNA de cadena doble?
- 11) Complete las siguientes secuencias para que correspondan a posibles palíndromos reconocibles por una enzima de restricción:
 - a) AGT
 - b) CAA
 - c) CCC
 - d) ATC

B) PROBLEMAS

PROBLEMA 1

¿Cuáles de las siguientes preparaciones llevan secuencias de intrones?

- a) DNA cromosómico humano.
- b) DNA cromosómico de *Ombú*.
- c) DNA cromosómico del protozoo *Trypanosoma cruzi*.
- d) DNA cromosómico de *Escherichia coli*.
- e) RNAs mensajeros citoplasmáticos humanos.
- f) RNAs nucleares precursores del mRNA (transcriptos primarios) de ratón.
- g) Un banco de cDNA (cDNA "library") de trigo.
- h) Un banco de genes (genoteca o "gene library") de trigo.
- i) RNA ribosómico maduro de cucaracha.
- j) RNA de transferencia (maduro) de chimpancé.
- k) DNA de mitocondrias de mamíferos.

l) DNA de mitocondrias de levaduras.

m) DNA de cloroplastos de girasol.

PROBLEMA 2

Existe un solo gen para la fibronectina (FN) en cada célula de mamífero (en realidad dos copias, dos alelos, cuyas secuencias son idénticas). El gen tiene 70 kpb de longitud. Sin embargo, se han encontrado en el citoplasma de fibroblastos dos RNA mensajeros de 7,7 y 8,0 kb de longitud, respectivamente.

El de 7,7 kb es idéntico en secuencia al de 8,0 kb, excepto por el hecho de que carece de un segmento interno de 0,3 kb.

a) ¿Cómo explica la gran diferencia de tamaño entre el gen (70 kpb) y sus mensajeros (aproximadamente 8,0 kb)?

b) ¿Cómo explica la existencia de dos tipos de RNA mensajeros de FN diferentes? Discuta los posibles mecanismos que pudieron originar los dos mRNAs. ¿Qué implicancias biológicas podría tener la presencia de los dos mRNAs?

Ud. supone que algunos tejidos expresan el mensajero de 7,7 kb, mientras que otros sólo expresan el de 8,0 kb, y decide investigarlo usando hibridación de sondas de cDNA radiactivo a preparaciones de mensajero total de distintos tejidos.

c) ¿Cuál de las dos especies de mensajero detecta en un Northern con cada una de las siguientes tres sondas? Justifique.

i) un cDNA del mRNA de FN de 7,7 kb.

ii) un cDNA del mRNA de FN de 8,0 kb.

iii) un cDNA del mRNA del segmento diferencial de 0,3 kb.

PROBLEMA 3

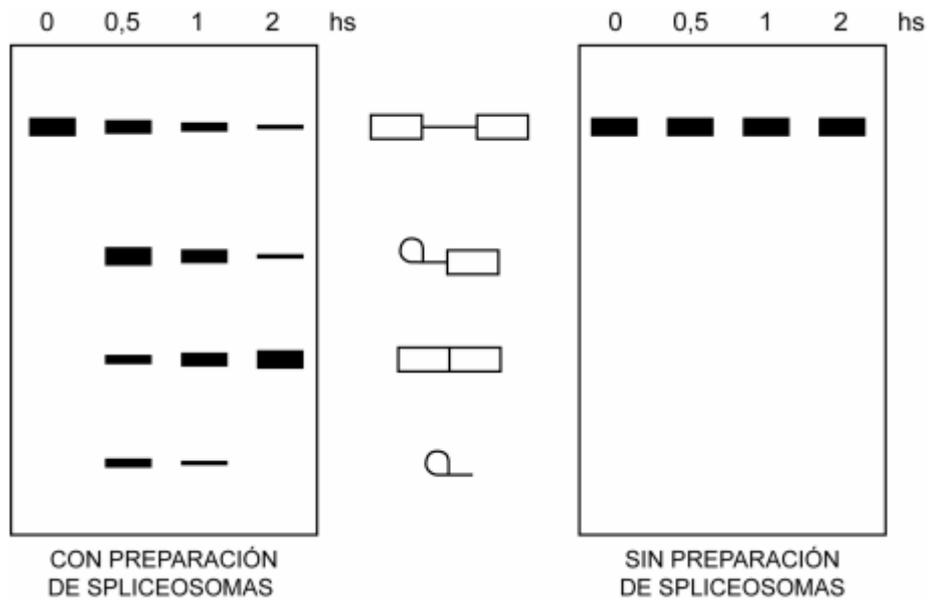
El *splicing* es una reacción enzimática por la cual se eliminan los intrones del RNA transcrito primario y los exones son unidos entre sí para formar el RNA maduro. Se ha descrito *splicing* en transcritos primarios tanto de RNAs mensajeros (el más común) como de RNAs ribosomales y de transferencia (menos frecuentes). Las reacciones de *splicing* pueden ser reproducidas "*in vitro*", es decir, en un tubo de ensayo si se colocan en el mismo los sustratos adecuados y las enzimas o complejos enzimáticos correspondientes. Se estudiaron "*in vitro*" dos tipos distintos de reacciones de *splicing*:

I) *Splicing* de un transcrito primario de RNA mensajero.

II) *Splicing* de un transcrito primario de RNA ribosomal.

Cada uno de los transcritos primarios marcados radiactivamente fue incubado en presencia o en ausencia de una preparación nuclear enriquecida en spliceosomas. A distintos tiempos (de 0 a 2 hs de incubación) se tomaron muestras y se las sembró en calles de un gel de poliacrilamida donde, luego de la electroforesis, se observan bandas radiactivas correspondientes a los sustratos, moléculas intermediarias y productos de las reacciones. La posición de cada uno de éstos está representada por diagramas, donde los rectángulos son exones y las líneas, intrones.

I) *Splicing* de un transcrito primario de RNA mensajero

**Preguntas:**

a) Identifique sustrato, producto/s y molécula/s intermediaria/s de la reacción e interprete la variación con el paso del tiempo de las intensidades de cada banda en el panel de la izquierda.

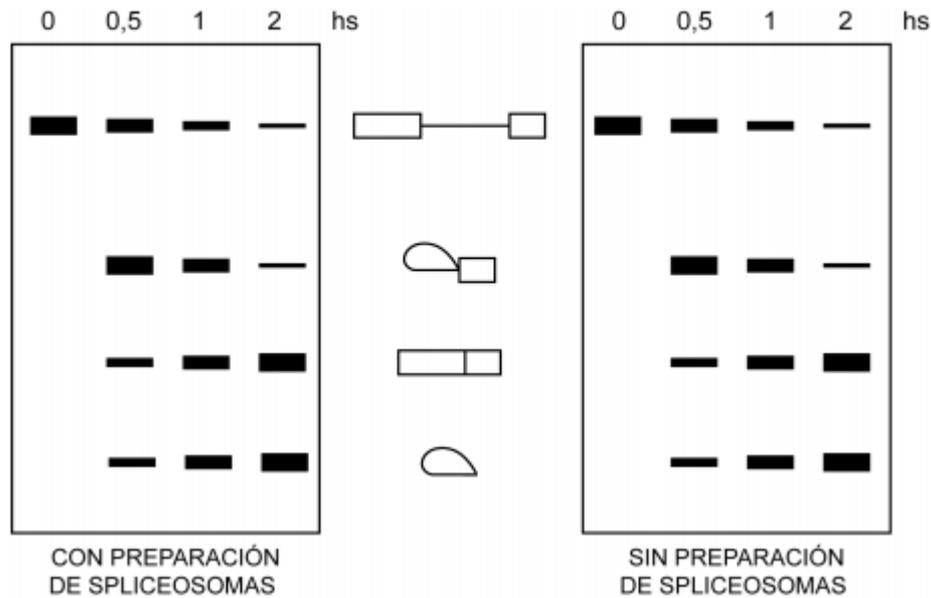
b) ¿Por qué el patrón de bandas del panel de la derecha es diferente?

c) ¿Qué patrón de bandas habría obtenido en los siguientes experimentos en los que la preparación de spliceosomas hubiera sido pretratada de las siguientes maneras:

- i) Calentamiento a 100°C por 10 minutos y enfriamiento rápido en hielo.
- ii) Digestión con una lipasa (enzima que degrada lípidos, es decir, grasas).
- iii) Digestión con una proteasa (enzima que degrada proteínas).
- iv) Digestión con una DNasa (enzima que degrada DNA).
- v) Digestión con una RNasa (enzima que degrada RNA).

Nota: Las enzimas mencionadas fueron eliminadas antes de agregar la preparación de spliceosomas pre-tratada al tubo donde se ensaya la reacción de splicing *in vitro*.

II) Splicing de un transcrito primario de RNA ribosomal

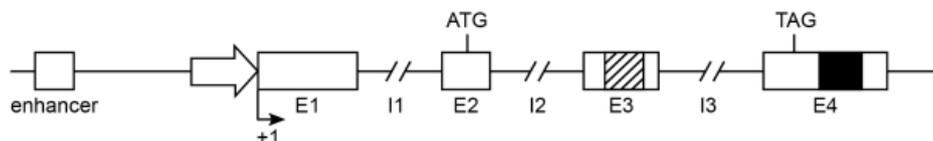


- d) Identifique sustrato, producto/s e intermediario/s de la reacción e interprete la variación con el paso del tiempo de las intensidades de cada banda en el panel de la izquierda.
- e) Dado que los patrones de bandas son idénticos en ambos paneles, es decir en presencia o en ausencia de preparación de spliceosomas, ¿qué puede Ud. concluir sobre el mecanismo del splicing de este RNA ribosomal comparativamente con el del RNA mensajero?
- f) ¿En cuál de los dos splicings estudiados (I o II) será crítica la estructura secundaria del transcrito primario para que la reacción ocurra?
- g) ¿Cuál podría ser la causa de que la cantidad de la forma  varíe con el tiempo de incubación de manera diferente de la cantidad de la forma ?

PROBLEMA 4

En el proceso de traducción eucariótica, la subunidad menor del ribosoma (40S) reconoce al “cap” del mRNA y rápidamente lo “escanea” de 5’ a 3’ hasta encontrar el primer AUG.

Entonces se acopla la subunidad mayor (60S) y el ribosoma empieza a traducir leyendo nucleótidos de a 3 (tripletes o codones). **En su camino, el ribosoma desplaza toda proteína que se encuentre unida al mRNA.** Para estudiar este proceso se construyó un plásmido de expresión en células eucariotas, cuyo inserto se muestra en la Fig. 1.



Datos:

- El exón 3 es alternativo en varios tipos celulares pero en las células hepáticas se incluye totalmente en el mRNA maduro.
- E1 = 200 pb
- I1 = 1500 pb
- E2 = 100 pb
- I2 = 2000 pb
- La A del ATG está ubicada en la posición +1740 del gen.
- La T del TAG está ubicada en la posición +4810 del gen.
- Río abajo de este TAG no hay ningún otro codón STOP.
- E3 = 150 pb
- I3 = 800 pb
- E4 = 250 pb

Figura 1

Preguntas:

a) Proporcione los siguientes datos, **mostrando los correspondientes cálculos**:

- i) Longitud del "transcripto primario" (en nucleótidos).
- ii) Longitud del RNA mensajero (en nucleótidos) en hígado.
- iii) Peso molecular (PM) del polipéptido codificado en hígado (en Daltons, considerando el PM promedio de 1 aminoácido igual a 110 Daltons).

Sigue el problema....

El polipéptido codificado por el gen de la Fig. 1 no tiene una función relevante a los fines del problema. Lo que importa es que al gen de la figura se le han incorporado artificialmente por ingeniería genética **dos secuencias (esquematizadas en rayado y en negro)**, provenientes de genomas de bacteriófagos, es decir, que no existen en ningún mRNA celular ni procarionta ni eucariota. La presencia de estas secuencias le confiere al RNA codificado por este gen la propiedad de unirse a proteínas fluorescentes de distinto color.

La secuencia rayada es capaz de unirse específicamente a una proteína fluorescente verde (PFV) y la secuencia negra es capaz de unirse específicamente a una proteína fluorescente roja (PFR). La emisión de luz de color (fluorescencia) de cada una de éstas **sólo se observa cuando están unidas a la secuencia de RNA correspondiente**. Cuando PFV y PFR están unidas a sus respectivas secuencias blanco **en la misma molécula de mRNA**, en lugar de sólo **verde** o sólo **rojo**, se observa una fluorescencia de color **amarillo**, resultante de la combinación de ambas fluorescencias (Fig. 2).

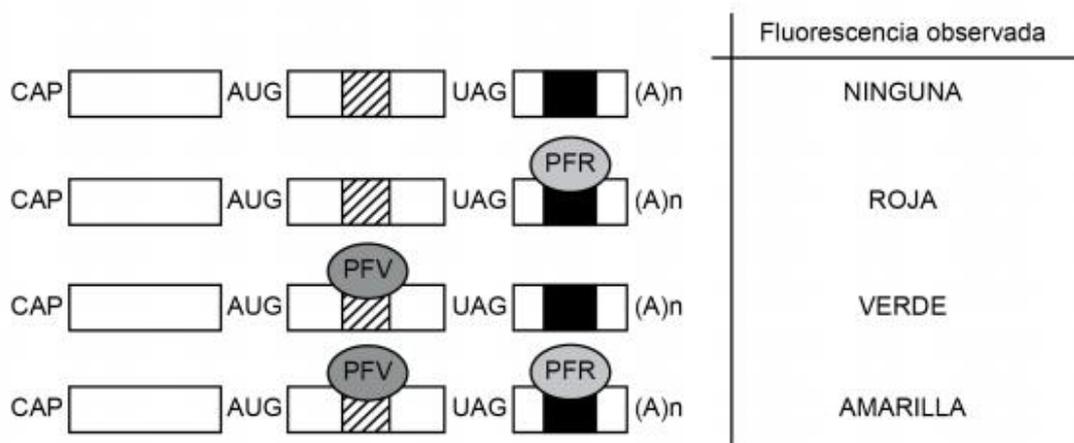


Figura 2

La transcripción del gen de la Fig. 1 está bajo el control del **enhancer** del gen de la $\alpha 1$ antitripsina, una proteína **que se expresa sólo en células hepáticas**.

Se dispone de dos líneas celulares humanas, una de origen hepático y otra de origen neuronal. A ambas líneas se las modificó genéticamente de modo de que **expresen simultáneamente y constitutivamente las proteínas PFV y PFR que difunden rápidamente tanto en el citoplasma como en el núcleo**.

b) Cuando se transfecta la línea neuronal con el plásmido de la Fig. 1, no se observa fluorescencia ni en el núcleo ni en el citoplasma mientras que la transfección en la línea hepática muestra fluorescencia en ambos compartimentos. ¿Qué tiene la línea hepática o qué le falta a la línea neuronal para explicar estos resultados?

c) En la transfección en la línea hepática se observa una fuerte fluorescencia amarilla en el núcleo y una marcada fluorescencia roja en el citoplasma (Tabla 1, experimento 1). En cambio, si se tratan las células con el inhibidor de la traducción cicloheximida, sólo se observa fluorescencia amarilla tanto en el núcleo como en el citoplasma (Tabla 1, experimento 2). **Explique el porqué de ambos resultados**.

d) **Complete la Tabla 1 y justifique sus respuestas** para cada uno de los tratamientos de los experimentos 3 al 6 (los experimentos 1 y 2 ya fueron explicados en la pregunta anterior). En todos

los casos las células hepáticas que expresan PFV y PFR fueron transfectadas con el plásmido de la Fig. 1.

Exp.	Tratamiento	Fluorescencia en núcleo		Fluorescencia en citoplasma	
		Sí/No	Color	Sí/No	Color
1	Ninguno	sí	amarillo	sí	rojo
2	Agregado de cicloheximida (inhibe traducción)	sí	amarillo	sí	amarillo
3	Agregado de actinomicina D (inhibe transcripción)
4	Co-transfección con un plásmido que expresa un tRNA supresor cuyo anticodón es 3' AUC 5'
5	Co-transfección con un plásmido que expresa microRNA (miRNA) que se apareja a una secuencia de la región 3' no codificante del mRNA de RFP e inhibe totalmente su traducción.
6	Co-transfección con un plásmido que expresa un factor de splicing que provoca la exclusión total del exón 3 del mRNA maduro.

Tabla 1

e) ¿Observaría fluorescencia, y en caso afirmativo de qué color, en bacterias *Escherichia coli* modificadas genéticamente para expresar constitutivamente PFV y PFR, transformadas con:

i) el plásmido de la Fig. 1?

ii) un plásmido similar al de la Fig. 1 pero en el que se reemplazó el promotor y enhancer eucarióticos por un promotor procariótico y donde la secuencia rayada se sacó del exón 3 y se la puso en el intrón 2?

La construcción **no tiene** secuencia de Shine-Dalgarno (sitio de unión al ribosoma). **Justifique**

PROBLEMA 5

El gen *bdf* codifica para la proteína **BDF**, un factor de transcripción que controla la transcripción de diversos genes involucrados en la diferenciación del tejido óseo en los vertebrados. La Figura 1 muestra que la transcripción del gen *bdf* es "despertada" por la unión de otro factor de transcripción, la proteína **BAF**, a un *enhancer* que está presente en la región promotora del gen *bdf*. El transcripto primario del gen *bdf* puede ser procesado por "*splicing*" alternativo generando 2 mRNAs distintos, uno con y otro sin el exón 3. Nunca los dos tipos de mRNAs se dan simultáneamente en el mismo tipo celular o tejido. Uno de los dos mRNAs da polipéptidos de **BDF** activos y el otro no. La inclusión del exón 3 en el mRNA es provocada por la unión específica de la proteína **SF2** (factor de *splicing* alternativo) a una secuencia de 9 bases presente en el exón 3 del transcripto primario.

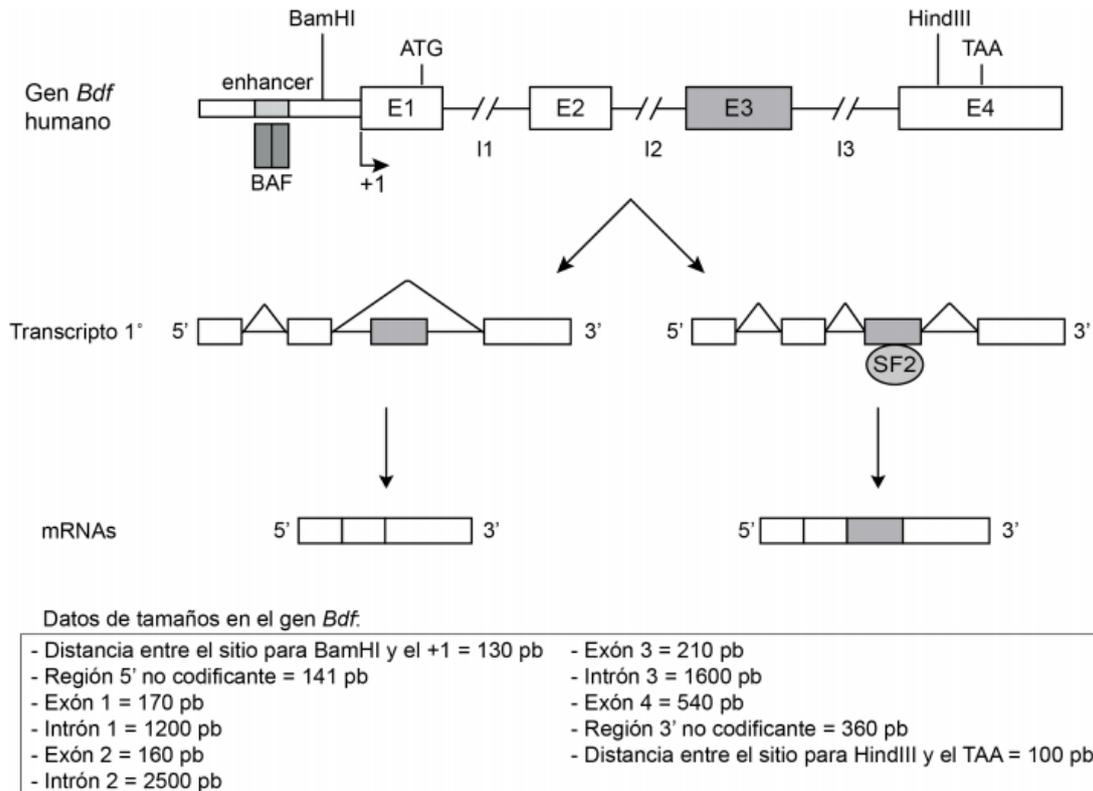


Figura 1

Preguntas:

a) Ubique la señal y el sitio de corte y poliadenilación, y la TATA box en las regiones que corresponda en los esquemas del gen, del transcripto primario y de los mRNAs de la Figura 1.

b) Defina secuencia palindrómica. ¿Cuáles de los elementos nombrados en el gen *bdf* en la Figura 1 generalmente corresponden a secuencias palindrómicas?

c) ¿Cuántas bandas de hibridación y de qué tamaño en pares de bases (pb) se observaría en un *Southern* de DNA genómico humano digerido simultáneamente con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, en dos experimentos distintos: uno hibridado con una sonda correspondiente al exón 2 y otro hibridado con una sonda correspondiente al exón 4? Si lo considera necesario ayúdese con esquemas.

Se analizó la expresión del gen *bdf* en 3 tejidos humanos (sangre, hueso e hígado) mediante las técnicas de *Northern* y *Western blot* (Figura 2). En el *Northern blot*, se corrieron RNAs de los 3 tejidos mencionados en 3 calles separadas en geles de agarosa, transferidos e hibridados con una sonda correspondiente al exón 2. En el *Western blot*, se corrieron proteínas de los 3 tejidos mencionados en geles de poliacrilamida con SDS, sin y con pre-tratamiento con β -mercaptoetanol (β -MSH), transferidas y reveladas por un anticuerpo contra la porción de la proteína **BDF** codificada por el exón 2.

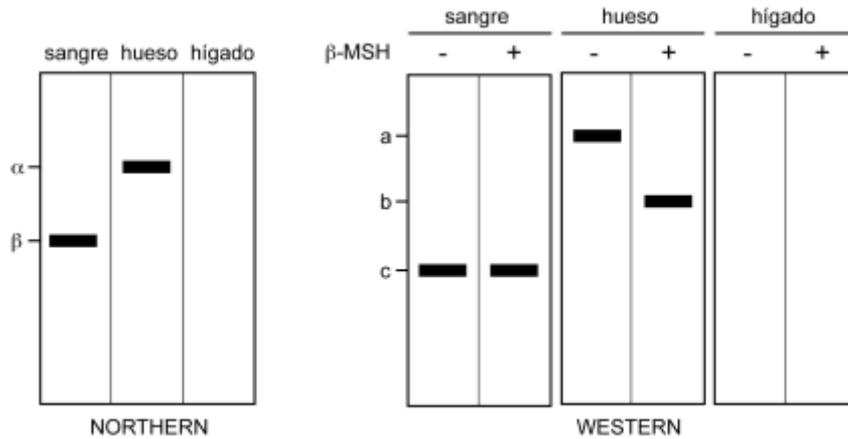


Figura 2

- d) Asigne los tamaños en bases a las bandas de mRNAs α y β del Northern.
- e) Calcule y asigne los pesos moleculares en Daltons a las bandas **b** y **c** del Western. El PM de la banda **a** es de aproximadamente 42 kDa. PM de un aminoácido = 110 Da.
- f) ¿Para cuál de los 3 dominios característicos de los factores de transcripción (unión al DNA, dimerización y transactivación) codifica el exón 3? ¿Cuál es la estructura cuaternaria de **BDF**?
- g) ¿En cuál/es de los 3 tejidos analizados será activo el factor de transcripción **BDF**?
- h) Teniendo en cuenta que la velocidad de degradación de los mRNAs de **BDF** es igual en todos los tejidos, ¿en cuál/es de los 3 tejidos analizados esperaríamos que se exprese la proteína **BAF**?
- i) ¿En cuál/es de los 3 tejidos analizados se expresa la proteína **SF2**?
- j) Las proteínas BAF, BDF y SF2 participan en el mecanismo de diferenciación del tejido óseo. Sin embargo la tabla muestra que los correspondientes *knock outs* tienen fenotipos muy diferentes. ¿Cómo explica cada uno de ellos?

GEN KNOCKEADO	FENOTIPO DEL RATÓN
Baf (codifica para proteína BAF)	Normal (indistinguible del salvaje)
Bdf (codifica para proteína BDF)	Nace y crece con deficiencias en el desarrollo óseo
Sf2 (codifica para proteína SF2)	Letal embrionario

k) Dos mutaciones distintas **en el medio del exón 3** provocan el mismo fenotipo: la ausencia de actividad de la proteína **BDF**. ¿Por qué mecanismo actúa cada una de ellas?

Aminoácidos	Glu	Arg	Asp
Hebra codificante	5'...GAA AGA GAC...3'	5'...GAA TGA GAC...3'	5'...GAA CGA GAC...3'
	SALVAJE	MUTANTE 1	MUTANTE 2

PROBLEMA 6

En un filtro de nitrocelulosa como el de la Figura 1 se depositaron 24 clones genómicos distintos conocidos (es decir, se sabe exactamente a qué gen corresponde cada uno) en forma de manchas circulares ordenadas en una matriz A1, A2,...; B1, B2,...; etc. Todos los clones habían sido obtenidos con el mismo vector plasmídico y los 24 insertos corresponden a 24 genes humanos diferentes. El DNA depositado en las manchas fue inmovilizado y desnaturizado por tratamiento del filtro con NaOH 0,5 N. Luego el filtro fue hibridado en condiciones rigurosas con una sonda radiactiva correspondiente al DNA del vector plasmídico solo, lavado en condiciones rigurosas y expuesto a una película radiográfica, obteniéndose el resultado de la Figura 2. Esta técnica se llama "**dot blot**".

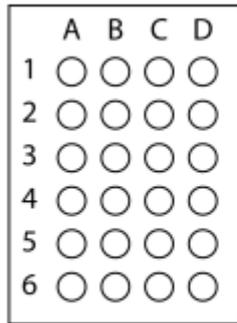


Figura 1. Filtro no hibridado.

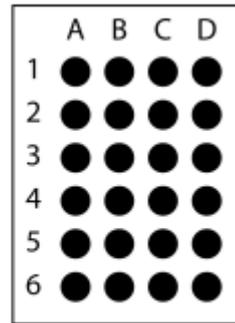


Figura 2. Autorradiografía del filtro hibridado con vector solo.

Una vez obtenido el resultado, el filtro fue tratado con agua destilada a 100°C durante 10 minutos, tratamiento (llamado "*strip off*") que despegga y lava la sonda radiactiva hibridada pero no despegga a los DNAs de los clones que habían sido inmovilizados en el filtro. Luego el filtro fue hibridado en condiciones rigurosas con una preparación de RNA mensajeros de hígado humano marcados radiactivamente, y luego del lavado y autorradiografía se obtuvo el resultado de la Figura 3.

Por último, se realizó un nuevo "*strip off*" y el filtro fue hibridado en condiciones rigurosas con una preparación de RNA mensajeros de páncreas humano marcados radiactivamente y, luego del lavado y autorradiografía, se obtuvo el resultado de la Figura 4.

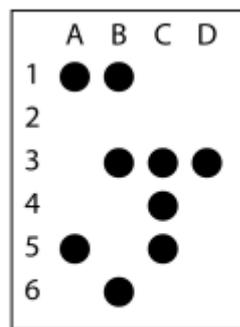


Figura 3. Autorradiografía del filtro hibridado con mRNAs de hígado.

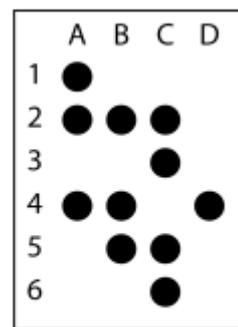


Figura 4. Autorradiografía del filtro hibridado con mRNAs de páncreas.

Preguntas:

a) ¿Cuál es la causa de que en la Figura 2 todas las manchas den hibridación positiva?

b) ¿Cuáles de los 24 genes:

- i) se expresan solamente en hígado?
- ii) se expresan solamente en páncreas?
- iii) se expresan en ambos órganos?
- iv) no se expresan en ninguno de los dos órganos?

c) Si unos de los clones llevara por inserto al gen de la insulina humana, ¿qué señal esperarías obtener en la coordenada correspondiente a ese clon en las Figuras 3 y 4? ¿Y para otro clon que llevara por inserto el gen de actina humana?

d) ¿Por qué se usa agua destilada para el "*strip off*" y no agua de la canilla (grifo)?

e) Los experimentos mostrados en este problema reflejan los principios de la moderna tecnología de los "chips" de DNA. La diferencia es que en lugar de un filtro de nitrocelulosa se usa un soporte sólido del tamaño de un cubreobjetos; y en lugar de depositar un arreglo ordenado de sólo 24 genes, se hace un arreglo de todos los genes de un organismo (6.000 en la levadura, por ejemplo; ¿cuántos en el humano?). Dicho arreglo o chip puede ser hibridado, por ejemplo, con cualquiera de las preparaciones que se listan al final de este párrafo. Los patrones de hibridación del "chip" son

analizados tanto cualitativamente como cuantitativamente por medio de computadoras. Discuta la utilidad de cada experimento.

i) mRNAs marcados provenientes de distintos tejidos

ii) mRNAs marcados provenientes de un mismo tipo celular en dos condiciones distintas, una antes y otra después del tratamiento con un medicamento.

iii) mRNAs marcados provenientes de un tipo celular de fenotipo normal y otro de fenotipo canceroso.

Busque información periodística, de divulgación científica o en la web sobre los "DNA chips", también llamados "DNA microarrays" y discuta su importancia.

PROBLEMA 7

La pérdida de extremidades ha ocurrido en diversas líneas evolutivas de los animales. En los reptiles, por ejemplo, se sabe que las serpientes evolucionaron a partir de ancestros con cuatro patas. Lo mismo ocurrió en los mamíferos, donde los cetáceos (ballenas y delfines) provienen de ancestros cuadrúpedos. En este contexto resulta importante saber si la pérdida o reducción de extremidades fue un proceso gradual o abrupto y cuáles fueron los genes responsables de la misma. Un modelo muy valioso para estudiar este problema lo constituyen los "espinosos", que son peces de la especie *Gasterosteus aculeatus*. En los peces en general, los dos pares de aletas (anteriores y posteriores) son los equivalentes de las patas de los otros vertebrados. En los espinosos **marinos**, el par de aletas posteriores (llamadas también aletas pélvicas) se presenta como dos espinas punzantes (Fig. 1, arriba). Sin embargo, los espinosos **de agua dulce** carecen de las dos espinas pélvicas o las tienen muy reducidas (Fig. 1, abajo).

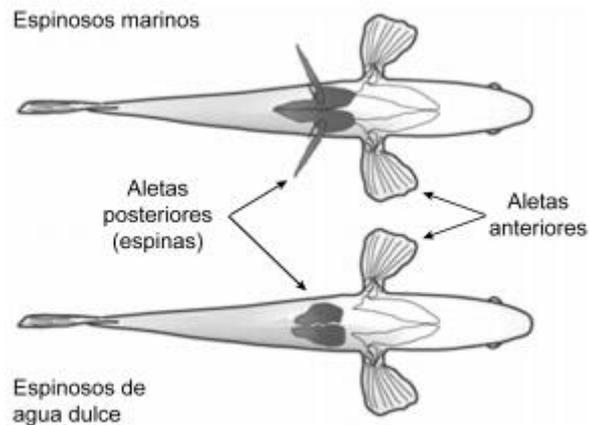


Figura 1. Vistas ventrales de espinosos adultos

Un grupo de investigadores de EEUU, Canadá e Islandia publicó el 15 de abril de 2004 un trabajo en Nature (Vol. 428, pág. 717-723) donde identificaron al gen responsable de la diferencia anatómica entre los espinosos marinos y de agua dulce. Se trata del gen *Pitx1* (Fig. 2), que codifica una proteína de **283 aminoácidos**, que tiene un **dominio homeótico** en el medio. Una vez comprobado que el transcripto de *Pitx1* no sufre ningún tipo de splicing alternativo, aislaron clones de cDNA a partir de mRNA de espinosos marinos y de agua dulce y, para su sorpresa, comprobaron que las secuencias de ambos tipos de clones eran **idénticas**.

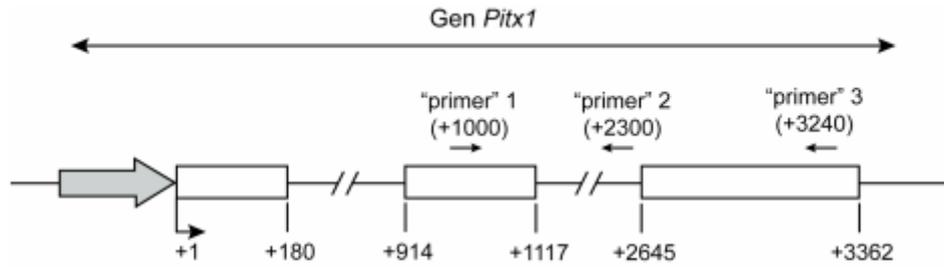


Figura 2. Esquema del gen *Pitx1*. Las cajas representan exones y las líneas entre las cajas, intrones. Cada uno de los 3 "primers" tiene 20 nucleótidos de largo. La numeración entre paréntesis de cada "primer" corresponde a la posición de su extremo 3'.

Inmediatamente realizaron experimentos de Northern (Fig. 3) con mRNAs extraídos de distintas partes de larvas de espinosos marinos y de agua dulce, usando como sonda radiactiva al cDNA. Las larvas todavía no han desarrollado aletas.

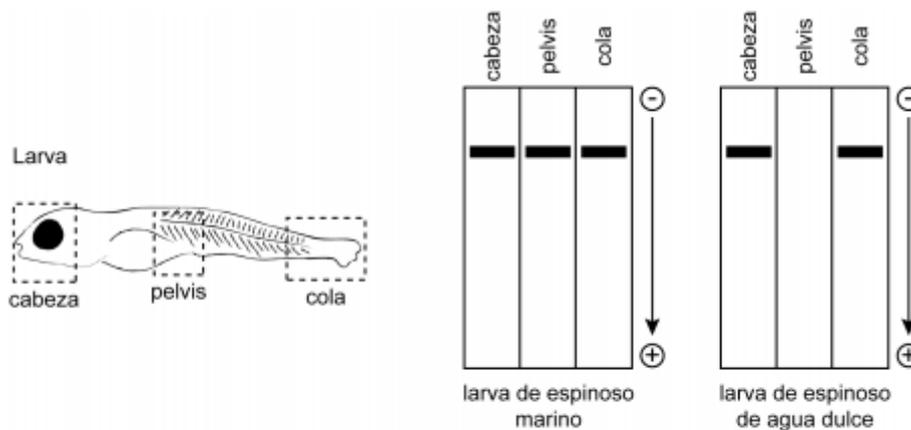


Figura 3

Preguntas:

- a) ¿Cuál es la longitud en nucleótidos del mRNA maduro del gen *Pitx1*? Justifique.
- b) ¿Qué fenómenos ocurren en cada una de las dos posiciones numeradas como +1 y +3362? Justifique.
- c) ¿Entre el +1 y qué posición como máximo podría estar situado el ATG iniciador de la traducción del gen *Pitx1*? Justifique.
- d) Indique si se obtiene producto de PCR y en caso afirmativo de qué tamaño (longitud en pares de bases) en los siguientes experimentos:
 - i) Primers 1 y 2 usando como molde DNA genómico de espinoso
 - ii) Primers 1 y 3 usando como molde DNA genómico de espinoso
 - iii) Primers 2 y 3 usando como molde DNA genómico de espinoso
 - iv) Primers 1 y 2 usando como molde cDNA de espinoso marino
 - v) Primers 1 y 3 usando como molde cDNA de espinoso marino
 - vi) Primers 2 y 3 usando como molde cDNA de espinoso marino
- e) ¿Qué función cumplirá la proteína codificada por el gen *Pitx1*. Justifique.
- f) En ratones existe un homólogo del gen *Pitx1* de peces. El gen se expresa en diversas partes del cuerpo incluyendo la pelvis. El knockout homocigota de este gen produce severas alteraciones en diversas partes del cuerpo de las crías que les provocan una muerte prematura. Entre las alteraciones mencionadas figura una reducción del tamaño de sus extremidades posteriores.

Teniendo en cuenta lo que pasa en ratones, el hecho de que las secuencias de los cDNAs de *Pitx1* de espinosos marinos y de agua dulce son idénticas y los resultados de la Figura 3, ¿qué mutación del gen *Pitx1* podría haber causado la pérdida de espinas en los espinosos de agua dulce y cómo alteraría su expresión? Justifique.

g) Si se comprobara que ninguna región del gen *Pitx1* se encontrara mutada en los espinosos de agua dulce, ¿qué otro gen podría estar mutado y así causar la pérdida de espinas? Justifique.

h) ¿Por qué la diferencia genética en los espinosos de agua dulce no causa otras alteraciones corporales y su muerte prematura, a diferencia de lo que ocurre con el *knockout* de *Pitx1* en ratones? Justifique.

i) Los lagos post-glaciales en los que se generaron los espinosos sin espinas son muy recientes en términos geológicos. ¿Es este hecho consistente o contradictorio con los datos del paper de Nature? Justifique.

j) La presencia de espinas pélvicas en los espinosos marinos parece ser una adaptación defensiva contra peces predadores de estructuras bucales blandas. La ausencia de espinas pélvicas en espinosos de agua dulce parece ser una adaptación defensiva contra invertebrados predadores que atrapan más eficientemente a los espinosos con espinas pélvicas agarrándose de las mismas.

Asigne verdadero o falso, justificando solamente las falsas:

a) La presencia de invertebrados predadores en agua dulce provocó la aparición de mutaciones que causan la desaparición de las espinas pélvicas en los espinosos.

b) La presencia de invertebrados predadores en agua dulce aceleró la aparición de mutaciones que causan la desaparición de las espinas pélvicas en los espinosos.

c) El origen de la mutación que causa la desaparición de las espinas pélvicas es un hecho independiente de la presencia de invertebrados predadores en agua dulce.

d) La mutación que causa la desaparición de las espinas pélvicas tiene valor adaptativo neutro en ambientes marinos.

e) La mutación que causa la desaparición de las espinas pélvicas tiene valor adaptativo positivo en ambientes de agua dulce.

PROBLEMA 8

En las plantas la luz controla la expresión de muchos genes involucrados en procesos importantes como el crecimiento, y la formación de flores y frutos. La molécula encargada de transferir la señal luminosa a estos efectos biológicos es una holoproteína llamada **fitocromo**. El fitocromo está constituido por una porción proteica (**apofitocromo**, de 240.000 Daltons de peso molecular nativo) unido a un **grupo prostético** no proteico (tetrapirrol) de bajo peso molecular. Existen dos formas del fitocromo, una llamada **Pfr** y otra llamada **Pr**. La conformación del apofitocromo es idéntica en las dos formas. Lo que las distingue es una distinta conformación del grupo prostético. La secuencia aminoacídica del apofitocromo no presenta motivos tipo cierre de leucinas, dedos de zinc o hélice-vuelta-hélice.

En la oscuridad, las moléculas de fitocromo se encuentran como **Pr**. Si se iluminan las plantas con luz roja, ésta es absorbida por el grupo prostético, el cual cambia de conformación y el fitocromo se vuelve **Pfr**.

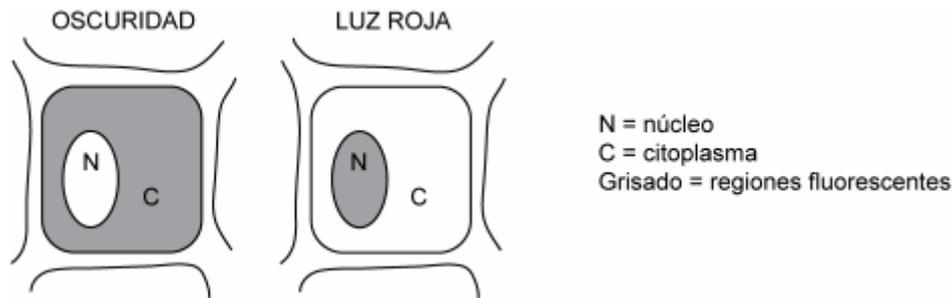
Preguntas:

a) Conociendo el PM nativo del apofitocromo (ver enunciado) y sabiendo que el mRNA del apofitocromo es de 4000 bases, que su región 5' no codificante es de 50 bases y que su región 3' no codificante es de 350 bases (incluyendo al codón "stop"), ¿cuál es la estructura cuaternaria del apofitocromo? Para facilitar los cálculos considere el PM de 1 aminoácido = 100 Daltons.

Con el fin de averiguar cuál es el mecanismo por el cual el fitocromo controla la expresión de los genes vegetales se realizaron los siguientes experimentos:

Cuando se detecta mediante anticuerpos fluorescentes específicos contra apofitocromo la localización del fitocromo en células vegetales mantenidas en oscuridad se observa la imagen de la

izquierda. Si las células son previamente irradiadas con luz roja, se observa la imagen de la derecha. Resultados similares a los de la figura se obtienen si en ambos casos se tratan además las células con cicloheximida, un inhibidor de la peptidiltransferasa eucariota.



- b)**
- ¿Qué le indica el experimento 1 respecto de la localización del fitocromo y la influencia de la luz?
 - ¿Para qué se hizo el experimento control con cicloheximida?
 - Dibuje los resultados que habría obtenido en oscuridad y en luz roja si en lugar de usar anticuerpos contra el apofitocromo hubiera usado anticuerpos que reconocen al grupo prostético sólo en la conformación en que se encuentra como Pfr.

Al someter a un extracto de proteínas nucleares vegetales a una cromatografía de afinidad en columna de fitocromo puro unido covalentemente a agarosa, ninguna proteína del extracto queda retenida en la columna si esta se hace en oscuridad. En cambio, si la columna es pre-irradiada con luz roja, una proteína llamada PIF queda específicamente retenida y así se la puede purificar.

- c)** ¿Qué conclusiones saca de este experimento?

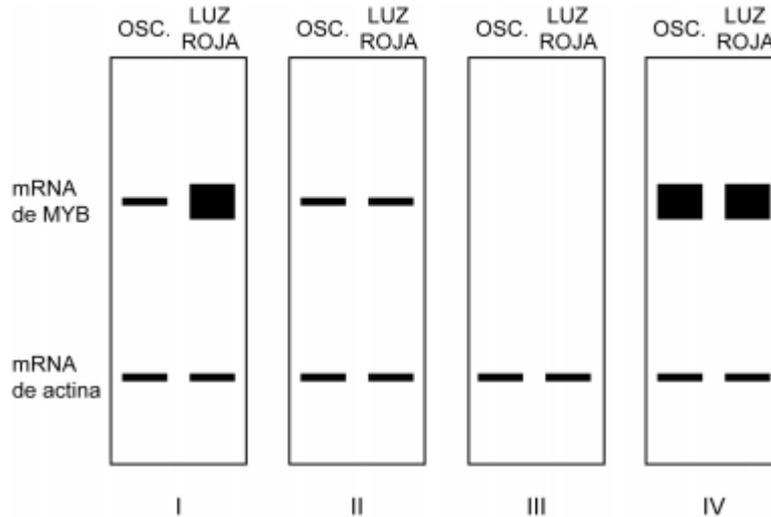
Se comprobó que la proteína PIF es capaz de unirse al enhancer (DNA doble cadena) 5'CACGTG3'. Buscando genes que tuvieran este enhancer en su región promotora se encontró al gen que codifica para una proteína llamada MYB. MYB es una proteína dimérica cuyos polipéptidos tienen un motivo estructural tipo hélice-vuelta-hélice. La figura muestra un esquema del gen que codifica para MYB.



Nota: La "A" del ATG es justo la primera base del exón 3.

- d)** ¿Qué función tendrá la proteína MYB?
- e)** ¿Cómo afectarían a la expresión del gen MYB, a nivel del mRNA y su proteína, las siguientes mutaciones:
- Inserción de una base en el exón 2?
 - Inserción de una base en la posición inmediatamente río abajo del ATG?
 - Inserción de una base entre el TGA y la señal de poliadenilación?
- f)** Dado que la secuencia CACGTG del promotor del gen MYB es un palíndromo de 6 bases, ¿por qué este promotor no es destruido por una enzima de restricción en la planta *in vivo*?
- g)** ¿Por qué la estructura del gen MYB revela que es incorrecta la definición de exón como *la porción del gen que se expresa en proteína*? ¿Cuál es la definición más adecuada de exón?

Se realizaron *Northerns* de RNA de una planta normal (I) y 3 plantas mutantes (II, III y IV), previamente sometidas a oscuridad o a luz roja. En la hibridación se usó una mezcla de sondas para los mRNAs de MYB y de la proteína de expresión constitutiva actina. La mutante II es homocigota para un codón "stop" prematuro en el gen de PIF. La información para las mutantes III y IV se traspapeló, pero se sabe que una es una mutante homocigota que sólo fabrica la conformación Pfr del fitocromo (no puede cambiar a Pr), mientras la otra es una mutante homocigota para una deleción de la TATA box del gen MYB.



h) i) Interprete los *Northern*s I y II del experimento 4 ¿Por qué dan distinto?

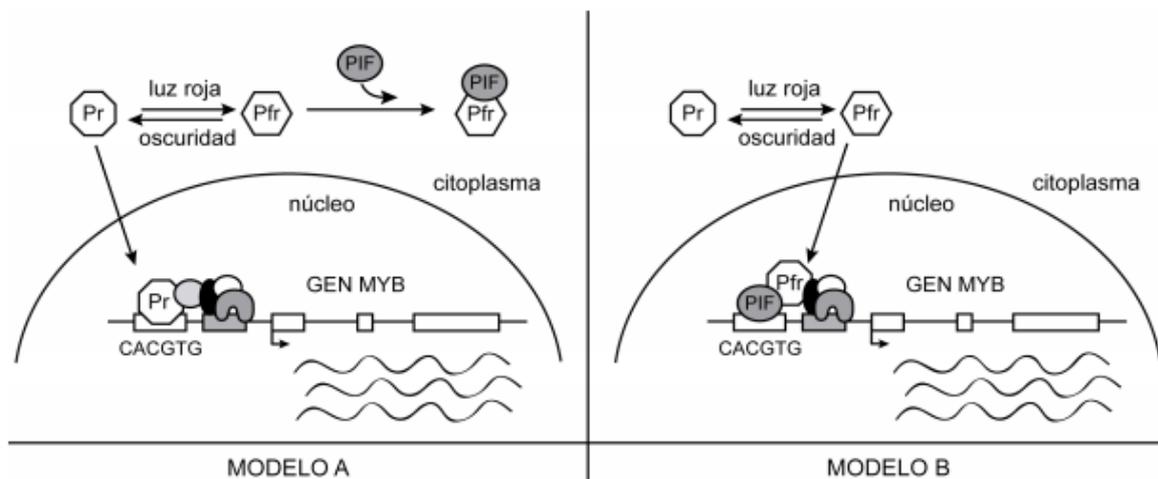
ii) ¿Qué le indica la banda de hibridación de actina?

iii) Identifique a cuál mutante corresponde cada uno de los *Northern*s III y IV. Justifique.

iv) Dibuje los *Northern*s que obtendría con la planta normal y las 3 mutantes si usara una sonda que reconociera al mRNA de la proteína PIF, sabiendo que PIF se expresa en todos los tejidos de la planta y siempre de manera no regulada por la luz.

i) ¿Cuál de los dos modelos de abajo (A o B) es compatible con los resultados de los experimentos de arriba? No lo justifique.

Respecto del OTRO modelo (el que Ud. consideró incorrecto) justifique y describa TODOS los aspectos que son incompatibles con los resultados descritos.



PROBLEMA 9

Primera parte

El **factor de transcripción trimerina**, que se fabrica sólo en células de la glándula mamaria, es producto de un **gen maestro** que determina la diferenciación de la glándula y activa la transcripción de los genes que producen proteínas de la leche. La Figura 1 muestra la estructura del gen de la **trimerina** de ratón. El mRNA de este gen presenta *splicing* alternativo de su exón 3, que codifica para el **dominio de transactivación** de este factor de transcripción. En condiciones normales, en cada

célula de la glándula mamaria se producen cantidades suficientes de los 2 mRNAs: el que incluye al exón 3 y el que lo excluye.

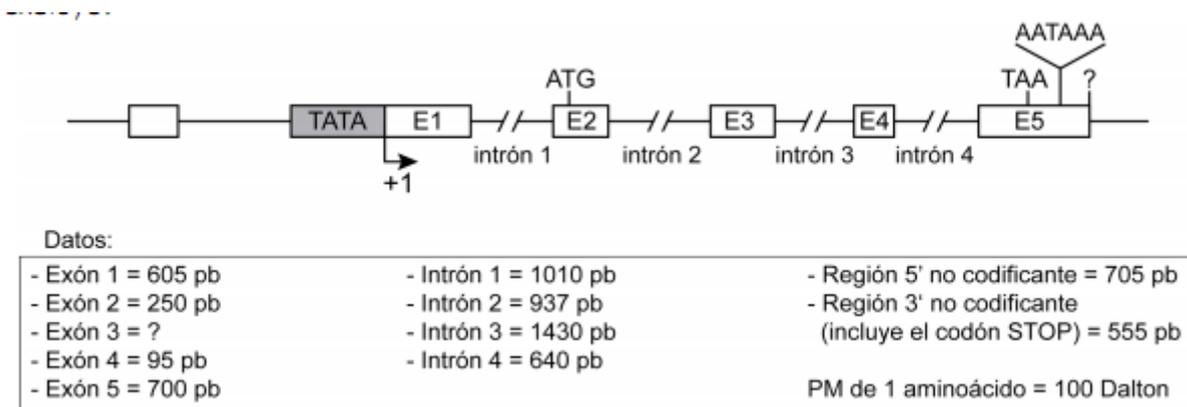


Figura 1

La Figura 2 muestra la estructura cuaternaria de la proteína trimerina. Las 3 subunidades son producto del gen de la Figura 1. La subunidad α es producida por el mRNA que incluye al exón 3, mientras que las dos subunidades β , que son idénticas, son codificadas por el mRNA que carece del exón 3.

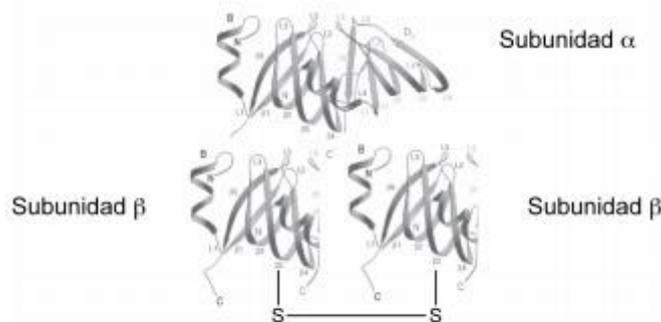


Figura 2

Preguntas:

- ¿El sitio marcado con un signo de interrogación en la Figura 1 es donde termina la transcripción? Justifique brevemente.
- i) Dibuje las bandas y asigne la longitud de los mRNAs en nucleótidos en un experimento de *Northern* donde RNA total de glándula mamaria de ratón es hibridado con una sonda correspondiente al exón 1 del gen de trimerina, sabiendo que la subunidad α es 10.000 Daltons más pesada que la β .
ii) Dibuje las bandas que observaría si hubiera usado como sonda al exón 3.
- ¿Cuál será la longitud del transcripto primario del gen de trimerina? ¿La especie molecular llamada "transcripto primario" existe realmente? Justifique.
- ¿Está bien llamar exón al exón 1 si bien éste no codifica ninguna porción de la proteína trimerina? Justifique.
- Dibuje las bandas y asigne el PM en kilodaltons en un experimento de *Western* (gel de poliacrilamida con SDS, una calle con y otra sin mercaptoetanol) donde proteínas de glándula mamaria de ratón son reveladas con un anticuerpo que reconoce la secuencia aminoacídica codificada por el exón 4 de la trimerina.
- Existe una cepa de ratón mutante en que el gen (maestro) de la trimerina se transcribe muy poco (prácticamente a niveles basales) y su fenotipo es ausencia de glándula mamaria. En lugar de estar mutado el promotor del gen de trimerina, se descubrió que lo que se encuentra fallado por una mutación es el *splicing* alternativo de su exón 3 de modo que éste no se incluye nunca en el mRNA maduro. Explique cómo la mutación mencionada afecta la expresión de trimerina y la aparición de glándula mamaria.

Segunda parte

En un intento por disminuir el consumo de bebidas alcohólicas por parte de los jóvenes en los boliches, el gobierno de Vacalandia quiere promover el consumo de leche. Para ello, ha contratado a la empresa biotecnológica "Greenmuuuu" para que genere vacas transgénicas que fabriquen una leche que se vea verde fluorescente cuando es iluminada por luz negra (luz de 400 nm de longitud de onda, cercana al ultravioleta), justamente el tipo de iluminación que se usa para bailar en los boliches, suponiendo que la leche verde fluorescente resultará tan atractiva y divertida para los jóvenes que la preferirán en lugar del alcohol.

Para lograr su cometido, la empresa obtuvo vacas transgénicas usando un plásmido en el cual el cDNA del gen GFP fue colocado río abajo del promotor y *enhancer* del gen de la quesina de vaca, un gen que sólo se expresa en glándula mamaria (Figura 3).

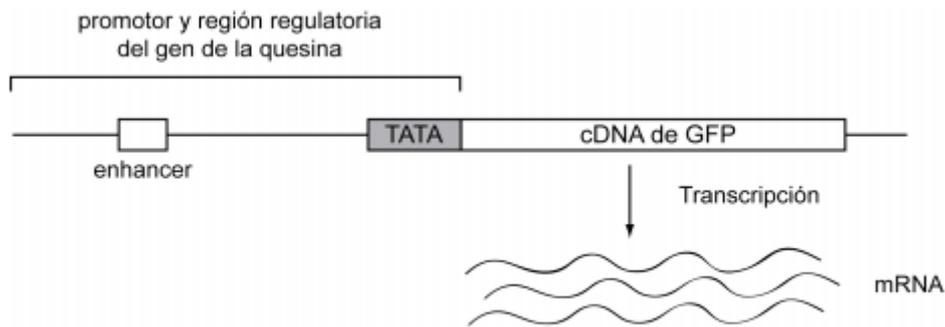


Figura 3

Aclaración: El cDNA de GFP proviene de la medusa (aguaviva) *Aequorea victoria* y codifica la proteína verde fluorescente (GFP), una proteína de una estructura terciaria muy particular tal que genera luz verde (fluoresce) cuando es excitada con luz de 400 nm, sin estar unida a ningún grupo prostético.

g) ¿Cuáles de los siguientes pasos experimentales NO corresponden a la obtención del cDNA de GFP que se usó para armar el transgén de la Figura 3? Justifique sólo esos pasos que no corresponden.

- i) Aislamiento de RNA total de *Aequorea victoria*.
- ii) Digestión de DNA genómico de *Aequorea victoria* con una enzima de restricción.
- iii) Digestión de RNA total de *Aequorea victoria* con una enzima de restricción.
- iv) Incubación del RNA total de *Aequorea victoria* con oligo dT, transcriptasa reversa y desoxirribonucleósidos trifosfato.
- v) Incubación del RNA total de *Aequorea victoria* con oligo dT, transcriptasa reversa y ribonucleósidos trifosfato.

h) Indique en la Figura 3 dónde se ubican la trimerina, los factores de transcripción basales, la RNA polimerasa II, la cola de poliA, el cap, los spliceosomas y la proteína quesina.

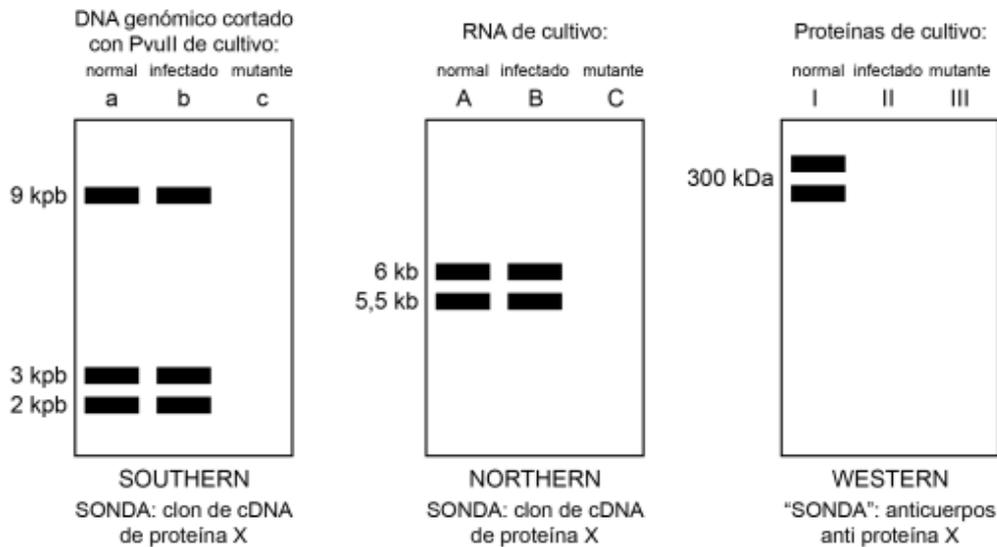
Justifique los casos en los que no se pueda ubicar algo de lo que se le pide.

i) ¿Existirá peligro de que las mujeres que beban leche fluorescente verde conteniendo la proteína GFP produzcan leche fluorescente verde en sus propias mamas? Justifique.

PROBLEMA 10

Un cultivo de células de embrión de pollo (cultivo normal) produce grandes cantidades de la proteína X. Cuando estas células en cultivo son infectadas con el virus de sarcoma (cultivo infectado) las células no mueren, pero en ellas ya no se detecta actividad biológica de la proteína X. Por otra parte, existe un tipo de células de embrión de pollo que no presenta actividad biológica de la proteína X en

ninguna condición (cultivo mutante). Se dispone de un clon de cDNA de la proteína X y de anticuerpos anti-proteína X (que reconocen a la proteína X tanto nativa como desnaturalizada). Estos reactivos son utilizados como "sondas" en los siguientes experimentos de *Southern*, *Northern* y *Western*:



Nota 1: El Western se realizó en un gel con SDS y β-mercaptoetanol.

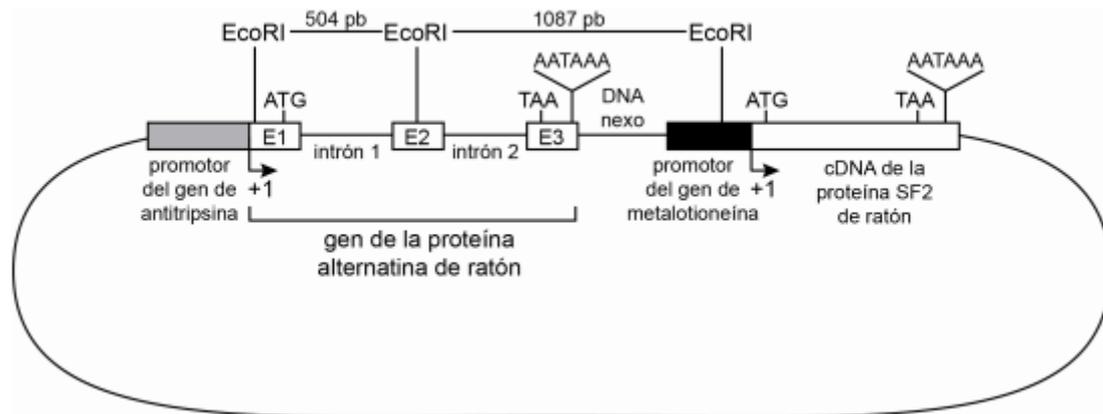
Nota 2: Tanto las células mutantes como las salvajes son homocigotas para el gen que codifica para la proteína X.

Complete los lugares donde haya puntos suspensivos y responda cada pregunta:

- Sabiendo que el clon de cDNA usado como sonda no posee sitios para la enzima PvuII y que existe un solo gen para la proteína (2 alelos) por genoma, ¿qué indica la presencia de 3 bandas de hibridación en los carriles **a** y **b** del experimento de *Southern*?
- ¿A qué nivel está afectada la actividad de la proteína X en el cultivo infectado?
- ¿Y en el cultivo mutante?
- ¿Qué conclusiones le sugiere la existencia de 2 bandas de hibridación en los carriles **A** y **B** del experimento de *Northern*?
- El mRNA más largo de la proteína X es de 6 kb. Este mRNA daría una proteína de a lo sumo aminoácidos. El peso promedio de cada residuo aminoacídico es 110 Daltons, por lo tanto el polipéptido más grande de la proteína X debería pesar Daltons. ¿Cómo se explica que la banda más grande en el *Western* presente un PM aparente mayor (300.000 Daltons)?

PROBLEMA 11

Se utilizó la construcción de la Figura 1 para obtener ratones transgénicos. En dicha construcción se clonaron el gen de la alternatina (proteína de nombre imaginario) de ratón, bajo las órdenes del promotor y región regulatoria del gen de la antitripsina y el cDNA de la proteína SF2 de ratón, bajo las órdenes del promotor y región regulatoria del gen de la metalotioneína. Ambas unidades transcripcionales fueron separadas por un segmento de DNA "nexo" que no codifica para nada ni tiene actividad regulatoria de la transcripción.



OTROS DATOS:

SEGMENTO:

Exón 1 del gen "alternatina"

Intrón 1 del gen "alternatina"

Exón 2 del gen "alternatina"

Intrón 2 del gen "alternatina"

Exón 3 del gen "alternatina"

DNA nexa

promotor del gen de metalotioneína

cDNA de SF2

LONGITUD:

150 pb

340 pb

141 pb

320 pb

107 pb

260 pb

280 pb

640 pb

Promotor y zona regulatoria del gen de antitripsina: activo solamente en hígado.

Promotor del gen y zona regulatoria del gen de metalotioneína: activable en todos los tejidos por metales como el Zn^{2+} .

Figura 1

Preguntas:

a) ¿Qué longitud (en nucleótidos) tienen el transcripto primario y los 2 mRNAs maduros de "alternatina" que se producen por "splicing" alternativo del exón 2?

b) ¿Qué peso molecular tienen los 2 polipéptidos de "alternatina", sabiendo que las regiones 5' y 3' no codificantes de su gen son de 100 y 70 pb respectivamente? PM 1 aa = 110 Da.

c) ¿Qué peso molecular tiene la proteína SF2 sabiendo que las regiones 5' y 3' no codificantes de su gen son de 50 y 110 pb respectivamente?

d) Para identificar cuáles de las crías eran transgénicas se preparó DNA genómico de las colas de los ratoncitos, se lo digirió con la enzima de restricción EcoRI, y se lo sometió a la técnica de *Southern*, usando como sondas de hibridación o bien al intrón 1, o bien al intrón 2 del gen de "alternatina".

i) ¿Qué resultados habría esperado (número de bandas y tamaño) sabiendo que río abajo del gen endógeno de "alternatina" las secuencias del cromosoma de ratón no tienen nada que ver con lo que se encuentra río abajo de dicho gen en la construcción de la figura?

ii) ¿Cuál de las 2 sondas es informativa para saber qué ratones son transgénicos y cuáles no? Justifique.

e) En aquellas condiciones y tejidos del transgénico en que ambos promotores están encendidos, la construcción de la Figura 1 produce 3 tipos de mRNAs: los 2 de "alternatina" y el de SF2. ¿Cuántos tipos de mRNAs maduros se producirán en las mismas condiciones y tejidos de una construcción idéntica a la de la Figura 1, pero que llevara una mutación que altere la secuencia AATAAA del exón 3 del gen de "alternatina", anulando su función? Justifique.

Mediante la técnica de *Northern* se estudió la expresión de los mRNAs de "alternatina", SF2 y actina en preparaciones de RNA de cerebro e hígado de ratones normales (no transgénicos), transgénicos para la construcción de la Figura 1, y transgénicos para la misma construcción a los que se suministró agua de beber con exceso del ión Zn^{2+} desde el nacimiento. Los resultados se encuentran en la Figura 2.

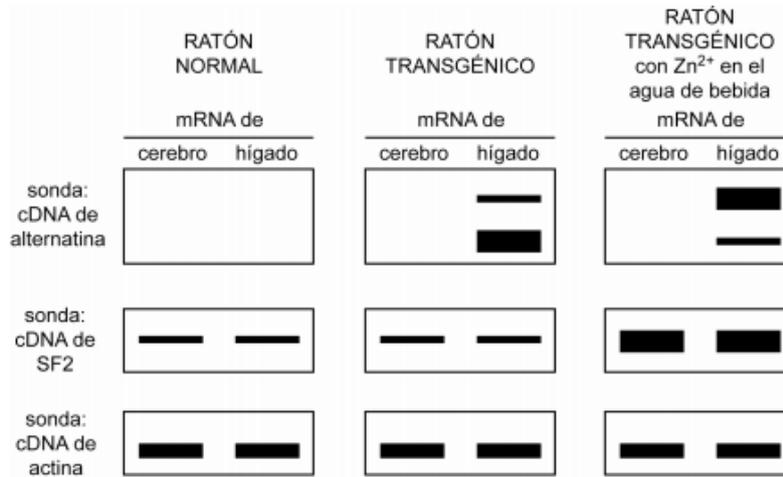


Figura 2

f) Interprete los resultados. Su interpretación debe justificar la ausencia, presencia e intensidad de bandas detectadas por cada sonda en los 2 tejidos de cada tipo de ratón.

g) La proteína SF2 se localiza normalmente en el núcleo y es capaz de reconocer y unirse específicamente a ciertas secuencias de los RNAs transcriptos primarios. En base a esta información y a los resultados anteriores, ¿qué función le parece a Ud. que tiene esta proteína?

h) ¿Qué resultados de Northern se obtendrán si se genera un ratón transgénico con una construcción idéntica a la de la Fig. 1 pero con una mutación en el cDNA de SF2 que introduce un codón stop de la traducción prematuro, localizado a 5 codones río abajo del ATG iniciador, y se le da de beber agua con exceso de Zn²⁺? Justifique.

i) ¿Por qué dicha mutación no provoca la degradación del mRNA de SF2 por NMD (nonsense mediated mRNA decay)?

j) ¿A qué se debe la transcripción tejido-específica del transgén de "alternatina"? ¿Y la transcripción activable por Zn²⁺ del transgén de SF2?

PROBLEMA 12

Se estudió la interacción entre el DNA del bacteriófago T4 y la RNA pol. Para ello se realizó un ensayo de unión a filtros de nitrocelulosa en presencia y ausencia del factor sigma y también a distintas temperaturas, obteniéndose los resultados de la figura 1.

a) Indique cómo está compuesta la RNA pol procarionta y cuál es el rol de cada subunidad.

b) Indique cuáles son las mejores condiciones para la unión de la RNA pol al promotor.

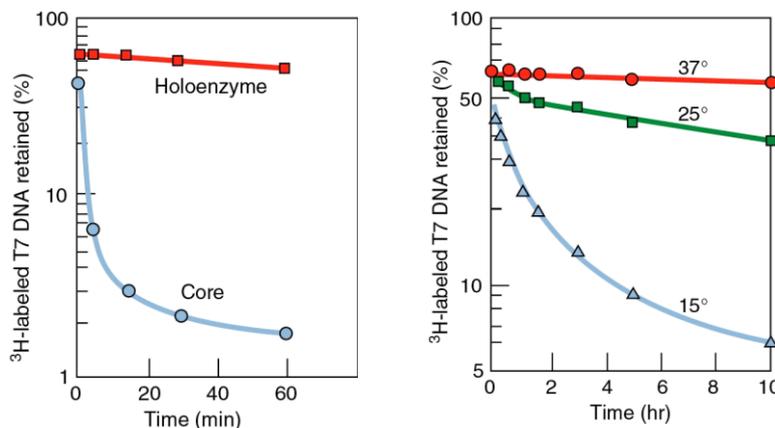


Figura 1

Continuando con estos ensayos se analizó la transcripción *in vitro*, empleando también DNA del bacteriófago T4 como molde, la RNA polimerasa núcleo ("core") de *E.coli* con y sin la subunidad σ . En ausencia de la subunidad σ se observó que no hay síntesis de RNA. Si se agrega σ purificado (PM 1.105 Da) a la enzima núcleo (PM 4.105 Da) se recupera la actividad. Se hacen dos experimentos para estudiar el rol de σ en la iniciación, la cual se mide por incorporación de ^{32}P a RNA (por precipitación con TCA) en función del tiempo, usando una mezcla de NTPs marcados en γ .

La mezcla de **reacción 1** contiene 0,4 μg de enzima "núcleo" y 0,1 μg de σ

La mezcla de **reacción 2** contiene 4 μg de núcleo y 0,1 μg de σ . Ambas mezclas contienen DNA de T4 en exceso y 1 mmol de ^{32}P NTPs (10^8 cpm/mmol) en un volumen de 1 ml.

Los resultados de los experimentos (cpm incorporados/ml en función del tiempo de incubación) se muestran en la **figura 2**.

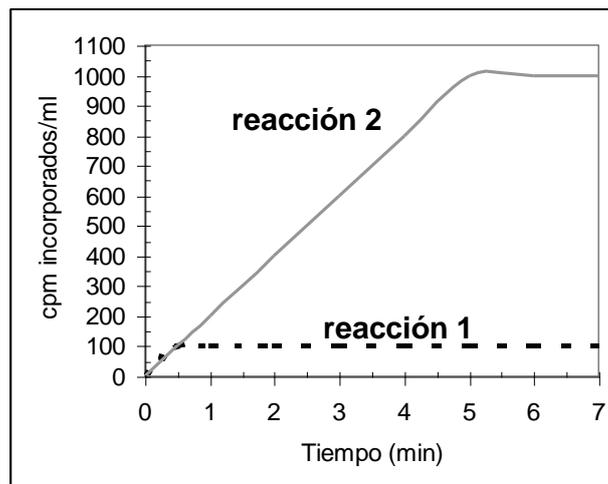


Figura 2

- ¿Es válido el ensayo como medida de iniciación de síntesis de RNA? ¿Por qué?
- ¿Cuántas iniciaciones se producen por molécula de enzima núcleo y por molécula de σ en cada reacción? Da 1000 iniciaciones por core, cosa que no cierra con el equilibrio a los 5 min
- ¿Cuál es el rol de σ en la iniciación de la transcripción de acuerdo a estos resultados?
- ¿Hay evidencias de re-iniciación de síntesis de RNA de acuerdo a estos resultados?
- Dibuje el gráfico que obtendría en este sistema si la mezcla de reacción tuviera 4 μg de enzima núcleo y 1 μg de σ .

PARTE III: ÁCIDOS NUCLEICOS

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN BACTERIAS

A) GUÍA DE ESTUDIO

1) Defina los siguientes términos, identificando si se trata de una proteína, un segmento de DNA (gen), o una molécula pequeña (metabolito) distinta de DNA y proteína: Operador, represor, inductor, promotor, co-represor, alolactosa, β -galactosidasa

2) ¿Qué es un diploide parcial?

3) Explique los siguientes términos:

- Reprimido

- Inducido
- Constitutivo

- 4) ¿Qué es un inductor gratuito? Dé ejemplos.
- 5) ¿Qué utilidad tiene para la bacteria que la lactosa sea un inductor de su operón y, en cambio, el triptofano un co-represor del suyo?
- 6) ¿Qué es la represión catabólica?
- 7) ¿Qué papel juega el AMP cíclico (cAMP) en la transcripción de los genes del operón lactosa?
- 8) ¿Qué ocurre con la concentración intracelular de cAMP de *E. coli* cuando ésta es cultivada en un medio con glucosa? Relacione su respuesta con las de las preguntas 6 y 7.
- 9) Explique el fenómeno de diauxia.
- 10) Aceptando el hecho de que todas las células de un organismo pluricelular poseen los mismos genes, ¿qué ocurriría en ese organismo si no existiera el fenómeno de regulación de la expresión genética?
- 11) ¿Qué elementos del sistema del operón lactosa actúan *en cis* y cuáles *en trans*?
- 12) ¿Qué es un "enhancer"? ¿Cómo funcionan estos elementos en la regulación de la expresión genética en eucariotas?
- 13) ¿Qué son los factores de transcripción? ¿Cómo funcionan? ¿Qué relaciones tienen con los productos de los oncogenes?
- 14) ¿Qué son las estructuras "cierres relámpago" de leucinas, "dedos" de zinc y hélice vuelta hélice?
- 15) ¿Qué es un homeobox?

B) PROBLEMAS

PROBLEMA 1

a) Describa el fenotipo correspondiente a los siguientes genotipos:

GENOTIPO	FENOTIPO			
	NO INDUCIDO		INDUCIDO	
	actividad β-gal	reconocimiento por Ac. anti β-gal	actividad β-gal	reconocimiento por Ac. anti β-gal
$i^+p^-oc^+z^+$				
$i^+p^+o^c z^{crm}$				
$i^+p^+o^c z^+ / i^+p^-o^c z^{crm}$				
$i^-p^+o^+z^+$				
$i^+p^+o^c z^{crm} / i^-p^+o^+z^+$				

i: gen que codifica al represor

p: promotor

o: operador

o^c : operador constitutivo, esto es, que no reconoce al represor

z: gen estructural de la β-galactosidasa

z^{crm} : mutante del gen z que produce una enzima inactiva, pero la cual es reconocida por anticuerpos anti β-galactosidasa ($crm = "cross\ reacting\ material"$: material que reacciona en forma cruzada con anticuerpos contra β-galactosidasa).

b) Vuelva a completar el cuadro suponiendo que se agregó glucosa al medio de cultivo.

PROBLEMA 2

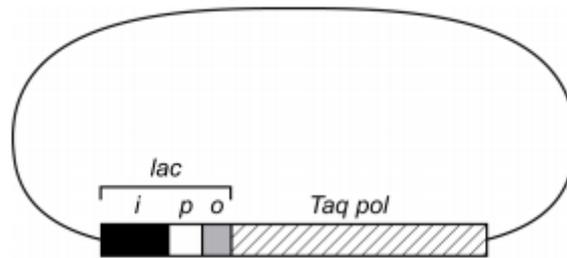
Dos horas después de agregar el compuesto X a un cultivo de bacterias, en presencia o ausencia del antibiótico cloranfenicol, se midió la actividad de 3 enzimas: A, B y C. De acuerdo a los resultados de la tabla, defina cuál de las enzimas es constitutiva, cuál activable y cuál inducible por el compuesto X.

Agregados al cultivo	Actividad de enzima A	Actividad de enzima B	Actividad de enzima C
Ninguno	0	100	0
Compuesto X	100	100	100
Compuesto X +Cloranfenicol	0	90	90

PROBLEMA 3

La termoestabilidad de la DNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus* (*T. aquaticus*) ha contribuido a la automatización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), al evitar el agregado de enzima en cada ciclo. Es posible purificar la enzima a partir de *T. aquaticus*, pero los rendimientos son bajos y es más difícil cultivar esta bacteria termófila que a *E. coli*.

El clonado del gen de la DNA polimerasa de *T. aquaticus* y su expresión en *E. coli* (Lawyer *et al.* J. Biol. Chem. 264, 6427, 1989) permitió evitar los dos problemas mencionados y producir la enzima en escala industrial. La estrategia utilizada para expresar la Taq polimerasa en *E. coli* fue transformar esta última con un plásmido que lleva el gen completo de la Taq polimerasa (desprovisto de su propio promotor), colocado río abajo de la zona regulatoria del operón **lac**, la cual incluye el gen del represor (*i*), el promotor (*p*) y el operador (*o*).



Indique el/los cultivo/s que Ud. elegiría como material de partida para la purificación de *Taq* polimerasa, con el objeto de usarla después en reacciones de PCR. Fundamente las respuestas.

Frasco	Temp.	Agregados al medio	¿Lo elegiría? Fundamente los "no"
1	37°C	lactosa	
2	37°C	lactosa + glucosa	
3	37°C	lactosa + glucosa + cAMP	
4	37°C	lactosa + cloranfenicol	
5	95°C	lactosa	
6	95°C	lactosa + glucosa	
7	95°C	lactosa + glucosa + cAMP	
8	95°C	lactosa + cloranfenicol	

PROBLEMA 4

Existe una variante mutante del gen que codifica para la proteína represora del operón lac de *E. coli* que se denomina super represor (lac I^S). Este represor mutante se caracteriza por ser incapaz de unirse al inductor del operón (alolactosa, IPTG, etc.).

Sin embargo, el super represor conserva intacta la capacidad de unirse al operador del operón lac. Suponga que, en una bacteria que posee en su cromosoma una mutación lac I^S y el resto del operón lac normal, se introduce un plásmido que contiene un operón lac normal entero (incluyendo un gen del represor normal lac i^+). Si se cultiva la bacteria en un medio que contiene lactosa:

- ¿Es la β -galactosidasa de esta bacteria constitutiva, inducible o no inducible?
- ¿Cuál de los dos genes (lac I^S o lac i^+) será dominante? ¿En *cis* o en *trans*?
- ¿Cuál será el efecto sobre la expresión de las proteínas del operón lac de agregar AMP cíclico (cAMP) al medio de cultivo? ¿Y el de agregar glucosa?
- ¿Podrá crecer esta bacteria en otro medio de cultivo adecuado que contenga lactosa como único alimento? ¿Y si también se agrega IPTG a este medio?

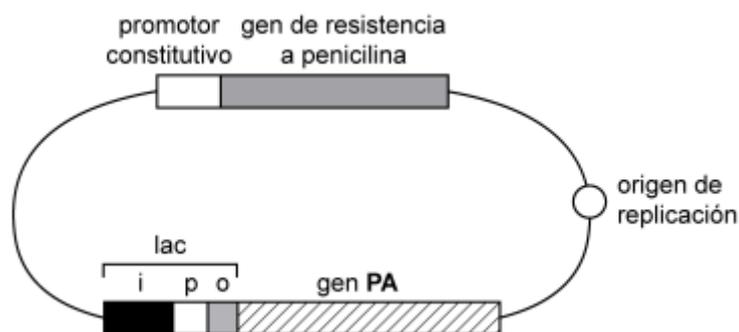
PROBLEMA 5

(Basado en los *papers* de Chopra et al., J. Biol. Chem. (marzo 2003) y Park et al. Science (sept 2002).) *Bacillus anthracis* (o ántrax) es una bacteria extremadamente patogénica que amenaza a la salud pública, ya que presumiblemente fue usada dentro de sobres de correo como arma mortal en ataques bioterroristas. Su toxina está formada por dos componentes proteicos secretados. Uno de ellos es la proteína **PA**, cuyo peso molecular nativo es 441 kDa.

Cuando el ántrax ingresa a una persona por inhalación, **PA** es secretada por la bacteria hacia afuera y se inserta en la membrana de las células humanas atacadas, formando un canal. A través de este canal, el otro componente proteico, llamado "factor letal" (**LF**), es capaz de pasar al citosol de las células infectadas, para allí ejercer su acción devastadora.

Para comprender los mecanismos de la acción mortífera del ántrax, se realizó el siguiente experimento:

Mediante PCR (usando DNA del ántrax como molde y *primers* apropiados), se amplificó el gen de **PA** (desprovisto de su propio promotor), el cual fue colocado en un plásmido, río abajo de la región regulatoria completa del operón lac, como se muestra en la figura:



El plásmido recombinante de la figura fue usado para transformar células de *Escherichia coli*. Las bacterias así transformadas fueron cultivadas en un medio mínimo (sin glucosa ni lactosa, con penicilina) y luego se transfirieron a diferentes tubos con los agregados que figuran a continuación y se continuó cultivando:

- IPTG
- IPTG + glucosa
- lactosa + glucosa
- lactosa + glucosa + tetraciclina*
- lactosa + glucosa + cAMP

* La tetraciclina es un inhibidor de la traducción procariota.

Preguntas:

- a) ¿La cepa de *E. coli* transformada con el plásmido de la figura podrá causar la enfermedad del antrax? ¿Por qué?
- b) Dibuje la curva de crecimiento bacteriano y el gráfico de cantidad de **PA** biosintetizada en función del tiempo de cultivo, esperable para cada uno de los cinco casos. Tome en cuenta el fenómeno de diauxia. Justifique sus respuestas muy brevemente.
- c) ¿Habría podido realizarse este experimento si no se hubiera agregado penicilina en la primera etapa del cultivo? ¿Por qué?

PROBLEMA 6

La proteína de shock térmico (*heat-shock protein*) GroEL de *Escherichia coli* tiene un PM de 57.000 Daltons y forma multímeros tetradecaméricos (14 subunidades). **GroEL es inducible por calor** (tratamiento de las bacterias 5 minutos a 43°C).

Preguntas:

- a) ¿Qué significa que GroEL es **inducible**?
- b) El hecho de que GroEL sea inducible por calor, ¿le sugiere alguna hipótesis sobre las características de la proteína represora? ¿Cuál es esa hipótesis?
- c) ¿Qué tipo de mutantes de *E. coli* en que GroEL **no** sea inducible por calor deberían poder encontrarse?

PARTE IV: ÁCIDOS NUCLEICOS**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN EUKARIOTAS****PROBLEMA 1**

Con el fin de determinar zonas importantes para la expresión del gen *grp1.8* de tomate se realizó un ensayo de retraso en geles (EMSA = *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) empleando fragmentos de una región del promotor (indicados en la **figura 1**) y extractos de proteínas nucleares de tomate.

- a) Explique en qué consiste el ensayo (EMSA = *Electrophoretic Mobility Shift Assay*).
- b) Indique qué zona/s considera importante/s para la actividad de dicho promotor (márquelas en esta hoja) y justifique su respuesta.
- c) ¿Qué ensayos realizaría para corroborar la funcionalidad de la/s región/es del inciso a? Explique cómo los haría y qué resultados esperaría obtener.
- d) Explique cómo prepara el DNA marcado que utiliza en el ensayo.

Continuando con los estudios del promotor *grp1.8* Ud. realiza un ensayo de "*primer extension*" para identificar el sitio de inicio de transcripción. Con este fin emplea un primer que se aparea en la zona del codón de iniciación del gen codificante para *grp1.8*. Los resultados obtenidos cuando se emplea una preparación de RNA total de tomate como molde se muestran en la calle 1 del gel de la **figura 2**.

- e) Explique cómo se realiza el ensayo de *primer extension*
- f) Escriba los 10 primeros nucleótidos del mRNA de *grp1.8* y dibuje un esquema del ensayo (indicando el mRNA, el ORF, el primer, etc.).

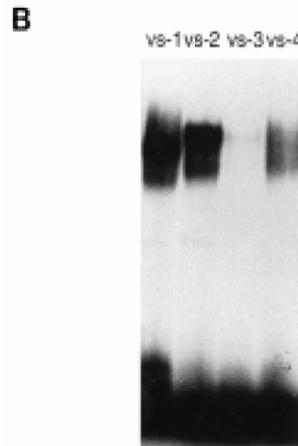
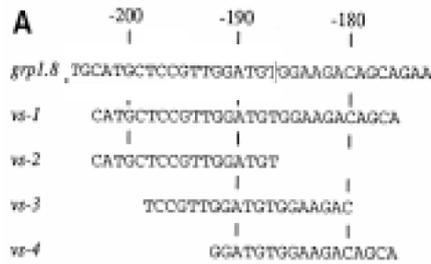


Figura 1: Ensayo de retraso en geles
A: Regiones del promotor *grp1.8* empleadas como sondas.
B: Resultados del ensayo

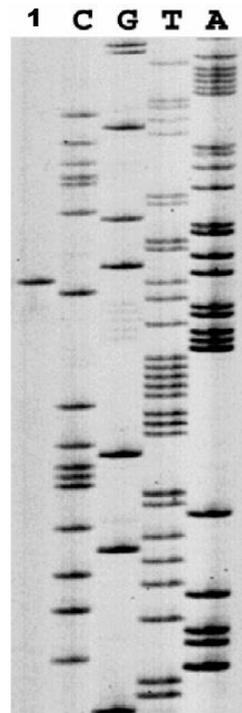


Figura 2: Ensayo de primer extension. El ensayo se realizó empleando una preparación de RNA de tomate como molde (calle 1) o plásmido conteniendo una secuencia genómica del gen *grp1.8* (calles C,G,T, A). C, G; T, A indica reacciones realizadas en presencia de ddCTP, ddGTP, ddTTP y ddATP, respectivamente.

PROBLEMA 2

- a) Un mutante de levadura expresa constitutivamente los genes estructurales implicados en el metabolismo de la galactosa. Por el contrario, un segundo mutante es incapaz de expresar referidos genes incluso en presencia de galactosa ¿Podría Ud. sugerir las mutaciones que expliquen estos fenotipos?.
- b) Una de las herramientas más poderosas utilizadas actualmente para estudiar interacción entre dos proteínas es el sistema del "doble híbrido". Haga un esquema explicando el fundamento de esta técnica.

PROBLEMA 3

En la Figura se muestra un fragmento de DNA que contiene parte de la región codificante de un gen eucariótico X y los 130 pb que preceden al sitio de iniciación de la transcripción de dicho gen. También se muestran fragmentos de ese mismo DNA al que se le han delecionado diferentes trozos del extremo 5' (DNA -90, -70, etc.; el número indica el nucleótido hasta donde llega la deleción). Estos DNA se han transcrito in vitro utilizando como fuente de factores de transcripción bien un extracto crudo de núcleos o una mezcla de RNA pol II, TFIID y TFIIB altamente purificados, obteniéndose los resultados indicados en la Tabla.

		-130	-110	-90	-70	-50	-30	-10	+1	
DNA completo	5'	-----X-genX---								
DNA	-90				-----X-----					
DNA	-70					-----X-----				

DNA -50 -----X-----
 DNA -30 -----X-----
 DNA -10 -----X-----

Fragmento	Transcripción (%)	
	Sistema crudo	Sistema purificado
DNA completo	100	30
DNA -90	100	30
DNA -70	100	30
DNA -50	30	30
DNA -30	0	0
DNA -10	0	0

- a) Sugiera una explicación para la bajada en la eficiencia de transcripción del DNA completo cuando se utiliza el sistema purificado.
- b) ¿Por qué la transcripción del DNA -50 con respecto a la del DNA -70 desciende hasta el 30% con el extracto crudo de núcleos pero se mantiene en el sistema purificado?.
- c) ¿A qué se debe que los DNAs -30 y -10 no se transcriban en ninguno de los sistemas?.

PROBLEMA 4

Se acaba de purificar una proteína X a partir de un cultivo de células eucarióticas y se sospecha que se puede tratar de un factor de transcripción que reconoce la secuencia reguladora CAAT. Se ha diseñado un ensayo funcional *in vivo* para probar esta hipótesis de acuerdo con la Figura que se muestra a continuación.

Interprete esta Figura describiendo con todo detalle en qué consiste este ensayo de transcripción *in vivo*.

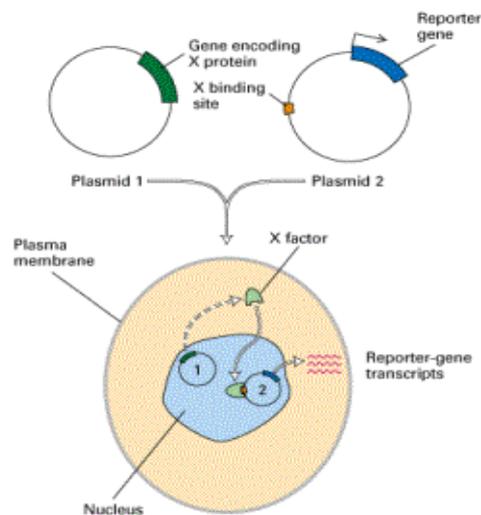


Fig. tomada de Molecular Cell Biology (2000, 4 th ed.) H. Lodish et al., Freeman.

PROBLEMA 5

Se ha obtenido un mutante de levadura con una expresión constitutiva (es decir, tanto en presencia como en ausencia de galactosa) de los genes GAL1 y GAL10, implicados en el metabolismo de galactosa. ¿Podría Ud. sugerir dos razones diferentes que expliquen el fenotipo de este mutante?.

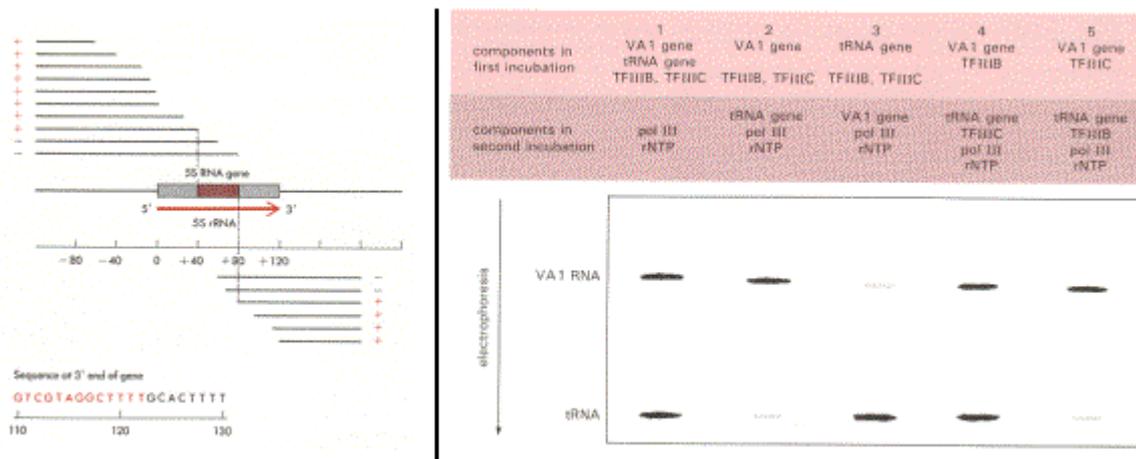
PROBLEMA 6

Imagínese que le acaban de proponer un proyecto para demostrar la hipótesis de que una proteína recientemente purificada en un laboratorio es realmente un factor de transcripción que estimula la transcripción de un gen X catalizada por la RNA polimerasa II. Explique dos abordajes experimentales distintos que le permitan apoyar dicha hipótesis.

PROBLEMA 7

a) En la Figura de la izquierda se muestra el experimento que permitió localizar la región promotora del gen del rRNA 5S en *Xenopus*. Describa el experimento.

b) La transcripción de este gen la lleva a cabo la RNA polimerasa III con la ayuda de los factores TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. Otros genes transcritos por esta RNA polimerasa son los de los tRNAs y el VA1 pero en este caso sólo intervienen los factores TFIIIB y TFIIIC. Con el fin de entender el mecanismo molecular de funcionamiento de estas proteínas se realizó el experimento que se indica en la Figura de la derecha. Interprete.



Figuras de Watson, J. D. et al. (1987) Molecular Biology of the Gene (4ª ed.) Benjamin/Cummings Pub.

PROBLEMA 8

Ud. está interesado en incorporarse a un laboratorio que está estudiando la transcripción del gen X. Datos previos han sugerido que este gen parece activarse por glucocorticoides. Durante su entrevista con el jefe del laboratorio, le comenta que acaban de determinar el mapa de restricción de una región de DNA de 600 pb que precede al sitio de iniciación de la transcripción del gen X, y le pide que proponga dos abordajes experimentales que confirmen la existencia de un elemento de respuesta a glucocorticoides dentro de esa región.

NOTA: En sus propuestas debe tener en cuenta que en ese laboratorio disponen de células que responden a glucocorticoides, de todas las herramientas necesarias para construir DNAs recombinantes y, además, son expertos en purificación de proteínas. Sin embargo, no tienen un equipo adecuado para secuenciar DNA.

PROBLEMA 9

En la Figura se muestra un abordaje experimental, denominado “linker scanning” que permite la localización de secuencias reguladoras de la transcripción de genes eucarióticos. Describa este abordaje e interprete la figura.

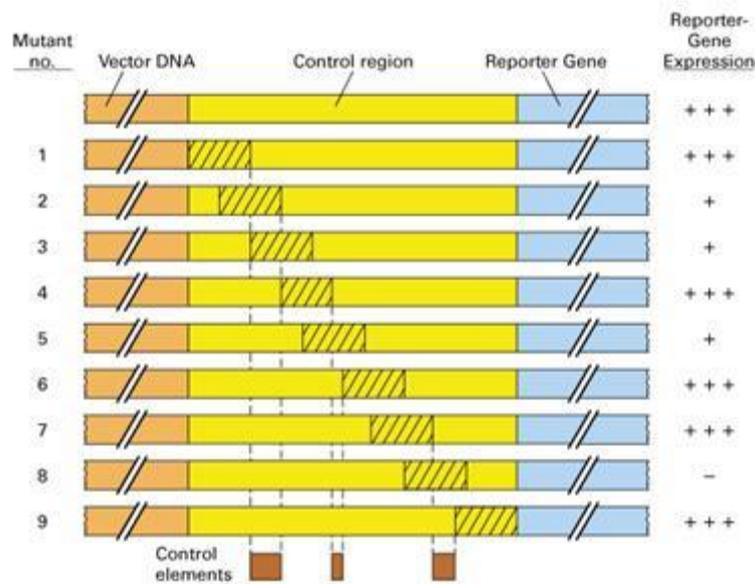


Fig. tomada de Molecular Cell Biology (2000, 4 th ed.) H. Lodish et al., Freeman.

PROBLEMA 10

Durante la caracterización de las regiones reguladoras de la transcripción de un gen eucariótico X se ha detectado una secuencia corta (TACGTTTC) que actúa como un activador transcripcional ya que su delección provoca un descenso significativo en la transcripción de dicho gen. Se sospecha que esta secuencia es reconocida directamente por un factor de transcripción. Ud. se acaba de incorporar a este proyecto, con la recomendación de los Profesores de Genética Molecular, y el Director del mismo pone a prueba sus conocimientos pidiéndole que diseñe dos experimentos:

- Uno para confirmar la presencia de dicho factor de transcripción en células eucarióticas en cultivo.
- El otro para purificar de forma rápida la proteína detectada en el experimento anterior. Explique sus dos propuestas.

PROBLEMA 11

- Describa el mecanismo de acción de un glucocorticoide.
- Haga un **esquema** de los principales dominios funcionales del receptor de glucocorticoides.
- Suponga que se han obtenido dos tipos de células de mamífero en las que el gen del receptor de glucocorticoides ha sufrido una de las siguientes modificaciones:
 - Sustitución del dominio de unión al DNA del receptor de glucocorticoides por el mismo dominio pero del receptor de estrógenos;
 - Sustitución del dominio de unión al glucocorticoide por el dominio de unión a estrógenos del receptor de estrógenos. Indique si las células que expresan cada uno de estos receptores híbridos activarán o no la transcripción de genes diana en respuesta a glucocorticoides o a estrógenos y si se activarán o no los genes que normalmente responden a glucocorticoides o a estrógenos.

PROBLEMA 12

Se sospecha que una región del DNA de ciertos virus oncogénicos contiene un elemento de respuesta a glucocorticoides, lo que explicaría la activación transcripcional de genes virales en respuesta a dexametazona. Con el fin de confirmar esta hipótesis se han construido dos DNAs recombinantes (A y B, ver tabla). El DNA-A contiene el gen reportero cat y un promotor (P). El DNA B contiene además del gen cat y el promotor, la región del DNA viral donde se sospecha la presencia del elemento de respuesta. Se transfectan dos cultivos idénticos de células con cada uno de estos

DNAs y se mide la actividad CAT en las células transfectadas en ausencia (-) o en presencia (+) de dexametazona. En la Tabla se muestran los resultados obtenidos.

- a) De forma esquemática, resume el mecanismo de activación transcripcional por un glucocorticoide.
- b) ¿Tiene la línea celular usada receptores de glucocorticoides?. ¿Existe un elemento de respuesta a glucocorticoides en el DNA viral?.
- c) ¿A qué se debe la expresión de CAT en presencia de DNA-B y en ausencia de dexametazona?. Indique dos posibles razones.
- d) ¿Se le ocurre algún experimento que permita confirmar que alguna de las interpretaciones anteriores es correcta?.

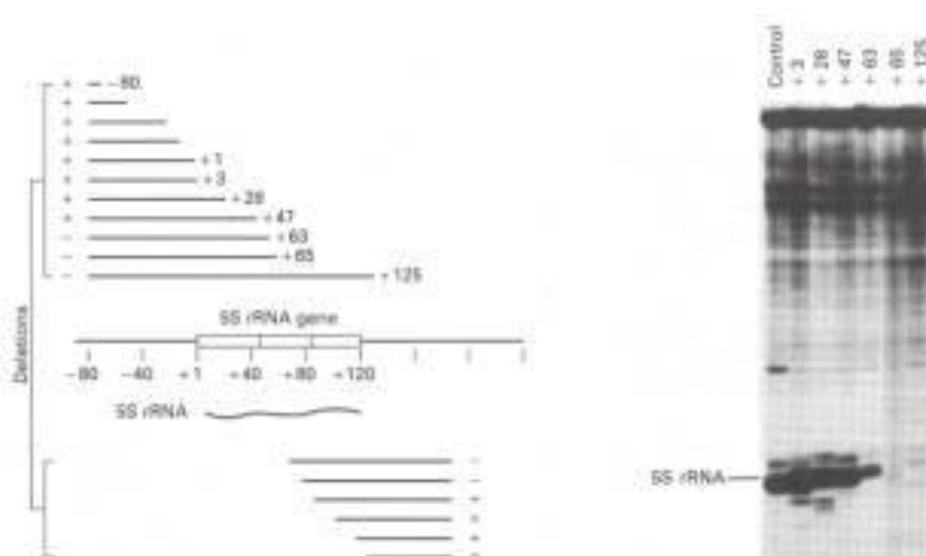
DNAs recombinantes	Elementos	Nivel de CAT	
		Dexametazona (-)	Dexametazona (+)
DNA-A	P— cat	1	1
DNA-B	ER?---P—cat	20	100

PROBLEMA 13

La parte central de la figura muestra un fragmento de DNA que contiene el gen que codifica el rRNA 5S de *Xenopus laevis* así como las secuencias situadas antes y después de dicho gen.

Para determinar la región reguladora de la transcripción de este gen se han preparado varias deleciones, que se indican en la parte superior e inferior de la figura, estudiándose el nivel de transcripción de cada una de ellas. Los mutantes que se transcriben se indican con + y los que no se transcriben con -.

- a) Interprete los resultados obtenidos en relación con la localización de la región reguladora de la transcripción del gen.
- b) Haga un esquema del mecanismo de iniciación de la transcripción del gen 5S indicando los factores proteicos implicados.



PROBLEMA 14

Ud ha sido recomendado por los profesores de Genética Molecular para incorporarse a un laboratorio que está investigando la transcripción de un gen eucariótico del que se sospecha se activa por glucocorticoides porque debe tener un "elemento de respuesta" específico próximo al sitio de

iniciación de la transcripción del gen. En el laboratorio han aislado un fragmento de restricción del DNA celular que contiene la región que precede a este sitio de iniciación.

- a) Defina brevemente qué es un "elemento de respuesta".
- b) ¿Qué experimento propondría Ud. (UNO SOLO) a ese laboratorio que permitiese confirmar la existencia de ese "elemento de respuesta" en el fragmento de restricción?.

PROBLEMA 15

- a) ¿Qué se necesita para que un gen eucariótico X clonado en *E. coli* se transcriba de forma eficiente sólo cuando las bacterias son sometidas a un choque térmico pero no cuando están creciendo a temperaturas normales?.
- b) ¿Qué ventajas encuentra Ud. al hecho de que la expresión de este gen X esté bajo el mecanismo de control de la respuesta al choque térmico?.

PROBLEMA 16

La metabolización de la galactosa en levaduras depende de la expresión coordinada de cuatro genes (GAL1, GAL2, GAL7 y GAL10) en la que interviene una secuencia y dos proteínas reguladoras.

- a) Haga un esquema de este mecanismo de regulación.
- b) Se ha obtenido un mutante de levadura con una expresión constitutiva (es decir, tanto en presencia como en ausencia de galactosa) de los cuatro genes estructurales. ¿Podría Ud. sugerir dos mutaciones diferentes que expliquen el fenotipo de este mutante?.
- c) ¿Qué otras dos mutaciones explicarían la no expresión de estos genes tanto en presencia como en ausencia de galactosa?.
- d) El grupo de M. Ptashne realizó el experimento pionero que se muestra en la figura. Explíquelo e indique la conclusión del mismo en relación con los dominios funcionales de GAL4.

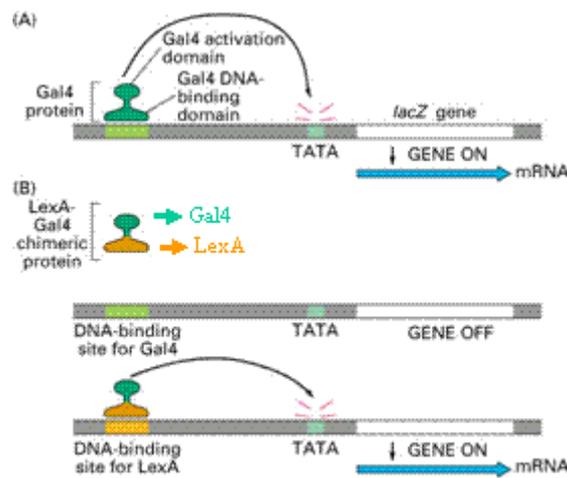


Figure 7-42. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

PROBLEMA 17

Ud acaba de clonar un fragmento de 10 kb de DNA genómico que incluye la unidad de transcripción completa de un gen. Ahora desea determinar de forma aproximada el sitio de iniciación de la transcripción de este gen utilizando cadenas nacientes de RNA marcado.

- a) En primer lugar, el fragmento de restricción de 10 kb, obtenido mediante digestión con Sall, lo digiere con diversas endonucleasas de restricción, obteniendo varios fragmentos con diferentes tamaños, tal y como se indica en la **Tabla 1**. Construya el mapa de restricción obtenido del fragmento de 10 kb, explicando cómo lo ha hecho.

Tabla 1

Fragmento de restricción	Enzimas usadas	Longitud del fragmento (pb)
(A)	Sall (extremo izquierdo) - PvuI	8000
(B)	Sall (extremo izquierdo) - BamHI	2200
(C)	EcoRI - BamHI	700
(D)	EcoRI - PvuI	6500
(E)	EcoRI - HindIII	400
(F)	PvuI - Sall (extremo derecho)	2000
(G)	HindIII - BamHI	300
(H)	PstI - PvuI	3200

b) A continuación cada uno de estos fragmentos de restricción los hibrida con una población de cadenas de RNA **naciente** radiactivas. Los resultados de estas hibridaciones se muestran en la **Tabla 2**. Indique entre qué dos blancos de restricción se sitúa el sitio de iniciación de la transcripción y la longitud en pb de este fragmento de DNA.

Tabla 2

Fragmento	Hibridación	Fragmento	Hibridación
A	Si	E	No
B	No	F	No
C	No	G	No
D	Si	H	Si

c) ¿Qué haría Ud. para determinar con más precisión el sitio de iniciación de la transcripción de este gen?.

PROBLEMA 18

Se dispone de un fragmento de DNA de 100 pb que preceden al sitio de iniciación de la transcripción de un gen X. Se sospecha que en este fragmento existe una secuencia reguladora de transcripción reconocida por un factor de transcripción implicado en la activación transcripcional del gen.

a) ¿Cómo determinaría Ud. la existencia de esta proteína en un extracto de núcleos de células que expresan dicho gen?.

b) Una vez demostrada la existencia de esta proteína, ¿cómo la purificaría Ud. a partir de estos extractos nucleares?.

c) Una vez purificada, ¿cómo demostraría Ud. que efectivamente se trata de un activador transcripcional?.

PARTE V: PROTEINAS

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

A) GUÍA DE ESTUDIO DE PROTEÍNAS

- 1) ¿Cuáles son los aminoácidos que forman parte de las proteínas? ¿Cuáles son polares y cuáles no polares? ¿Qué aminoácidos están cargados positivamente y cuáles negativamente a pH neutro?
 - 2) Nombre 3 aminoácidos básicos, 2 ácidos, 2 que contengan azufre, y 2 con restos aromáticos.
 - 3) Describa las características de las siguientes uniones que participan en proteínas: a) peptídica, b) puente de hidrógeno, c) fuerzas de Van der Waals, d) puente disulfuro, e) unión hidrofóbica, f) unión iónica o electrostática. ¿Cuáles de éstas son necesarias para formar una alfa hélice o una hoja plegada β ?
 - 4) Defina estructura primaria, secundaria y terciaria de una proteína.
 - 5) ¿Puede una proteína sintetizarse como un único polipéptido y después de alguna modificación post-traducciona convertirse en una proteína formada por dos polipéptidos?
- Averigüe en la bibliografía qué pasa con la insulina.
- 6) ¿Qué se entiende por modificaciones post-traduccionales de las proteínas? Mencione algunas de ellas.
 - 7) ¿Cuáles son las diferencias entre una proteína globular y una fibrosa? Dé ejemplos de ambas.
 - 8) ¿Qué es la cromatografía de afinidad? Diseñe un experimento en el que utilizándola Ud. pueda purificar a la proteína que se une específicamente a la insulina (receptor de insulina).
 - 9) ¿Cuál es el efecto de los siguientes tratamientos sobre una proteína nativa en solución acuosa: urea, mercaptoetanol, SDS (dodecilsulfato de sodio), hidrólisis ácida fuerte, calentamiento a 90°C.
 - 10) Mencione las características de las enzimas. Defina: sustrato, producto, energía de activación, sitio activo, cofactor.
 - 11) ¿Qué diferencia existe entre una coenzima y un grupo prostético?
 - 12) ¿Qué es una enzima alostérica? ¿El fenómeno de alosterismo está solamente restringido a las enzimas? ¿Qué es el efecto cooperativo?
 - 13) Señale cuáles de las siguientes sustancias son proteínas y cuáles no:

anticuerpos	hemoglobina
miosina (músculo)	enzimas
actina (músculo, citoesqueleto)	clorofila
interleuquinas	aspirina
celulosa (vegetales)	bilirrubina
caseína (leche)	quitina (hongos, insectos)
receptores hormonales	queratina (piel, pelo)
insulina	albúmina (plasma sanguíneo)
plastoquinona	caroteno
adrenalina	represor del operón lac
sacarosa	genes
acetilcolina	penicilina (antibiótico)
colágeno	fibrina (seda)
antígenos	colesterol
factores de transcripción	telomerasa
transcriptasa reversa del virus del SIDA	toxina del cólera
factores de crecimiento de células animales	

- 14) Se suele estimar la concentración de proteínas por absorción de luz ultravioleta (UV). ¿Cuáles son los aminoácidos responsables de dicha absorción?
- 15) ¿En qué consiste la técnica de *Western blot*?

PARTE VI: PROTEINAS

BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS y CÓDIGO GENÉTICO

A) GUÍA DE ESTUDIO

- 1) ¿Con qué polaridad son sintetizadas las proteínas en los ribosomas? ¿Con qué polaridad es leído el mRNA?
- 2) Describa los procesos que tienen lugar luego de la llegada de un aminoacil-tRNA al ribosoma, hasta la llegada del siguiente aminoacil-tRNA.
- 3) ¿Qué quiere decir que el código genético es universal y degenerado? ¿Es estrictamente universal?
- 4) ¿Qué entiende por hipótesis del “wobbling”? ¿Qué son los tRNAs isoaceptores?
- 5) ¿Cuál es el codón de iniciación y cuáles los codones de terminación de la traducción?
- 6) ¿Qué función cumplen las aminoacil-tRNA sintetetasas?
- 7) ¿Qué función cumple la peptidil-transferasa? ¿Se trata de una proteína?
- 8) ¿Cuál es la forma de las moléculas de tRNA? Señale los lugares donde se encuentra el anticodón y el sitio de unión a los aminoácidos.
- 9) ¿Qué entiende por tRNA supresor, y cómo se origina ese tipo de molécula?
- 10) Compare la estructura en subunidades y la composición de los ribosomas procarióticos y eucarióticos.
- 11) ¿Cuál es el efecto del cloranfenicol, actinomicina D, estreptomycin, puromicina y cicloheximida sobre la síntesis de proteínas: a) en procariotas y b) en eucariotas?
- 12) ¿Cuál es la diferencia entre un mensajero policistrónico y un mensajero que codifica para una poliproteína? Dé ejemplos.
- 13) Asigne verdadero o falso.
 - a) El fMet-tRNA^{Met} se une inicialmente a la subunidad 30S del ribosoma.
 - b) El aminoácido se une covalentemente al ribosoma por medio de una peptidiltransferasa.
 - c) El ribosoma 70S se disocia para formar partículas 30S Y 50S.
 - d) Las cadenas laterales de los aminoácidos reconocen a los codones del mRNA.
 - e) El tRNA reconoce a una molécula de DNA.
 - f) El tRNA reconoce a un codón.
 - g) El tRNA reconoce a un anticodón.
 - h) La aminoacil-tRNA sintetasa reconoce al codón.
 - i) Las moléculas de tRNA son sintetizadas a través de un mRNA intermediario.
 - j) Las moléculas de tRNA se unen a los aminoácidos sin la necesidad de enzimas.
 - k) El codón AUG no codifica para aminoácido alguno; es simplemente un codón de iniciación.
 - l) El cloranfenicol y la cicloheximida inhiben a la peptidil transferasa.
 - m) El PM de un polipéptido es siempre mayor que el del mRNA que lo codifica.

EL CÓDIGO GENÉTICO Y LA DESIGNACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS MEDIANTE LETRAS ÚNICAS

		SEGUNDA LETRA												
		T			C			A			G			
PRIMERA LETRA	T	TTT	phe	F	TCT	ser	S	TAT	tyr	Y	TGT	cys	C	T
		TTC	phe	F	TCC	ser	S	TAC	tyr	Y	TGC	cys	C	C
		TTA	leu	L	TCA	ser	S	TAA	STOP	Z	TGA	STOP	Z	A
		TTG	leu	L	TCG	ser	S	TAG	STOP	Z	TGG	trp	W	G
C	CTT	leu	L	CCT	pro	P	CAT	his	H	CGT	arg	R	T	
	CTC	leu	L	CCC	pro	P	CAC	his	H	CGC	arg	R	C	
	CTA	leu	L	CCA	pro	P	CAA	gln	Q	CGA	arg	R	A	
	CTG	leu	L	CCG	pro	P	CAG	gln	Q	CGG	arg	R	G	
A	ATT	ile	I	ACT	thr	T	AAT	asn	N	AGT	ser	S	T	
	ATC	ile	I	ACC	thr	T	AAC	asn	N	AGC	ser	S	C	
	ATA	ile	I	ACA	thr	T	AAA	lys	K	AGA	arg	R	A	
	ATG	met	M	ACG	thr	T	AAG	lys	K	AGG	arg	R	G	
G	GTT	val	V	GCT	ala	A	GAT	asp	D	GGT	gly	G	T	
	GTC	val	V	GCC	ala	A	GAC	asp	D	GGC	gly	G	C	
	GTA	val	V	GCA	ala	A	GAA	glu	E	GGA	gly	G	A	
	GTG	val	V	GCG	ala	A	GAG	glu	E	GGG	gly	G	G	
		TERCERA LETRA												

B) PROBLEMAS

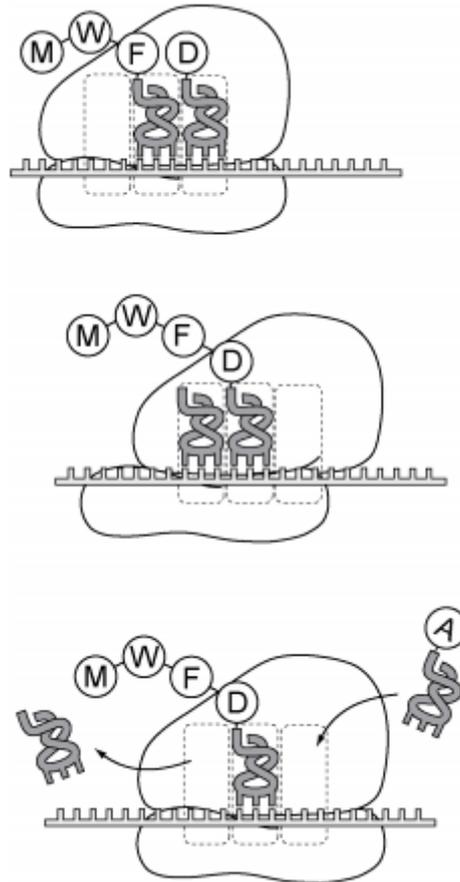
PROBLEMA 1

De arriba hacia abajo, la figura muestra 3 etapas consecutivas de la elongación de la traducción en los ribosomas.

a) Identifique en los dibujos lo siguiente: extremos 5' y 3' del mRNA, extremo NH₂-terminal del polipéptido naciente, extremos 5' y 3' de cada anticodón, sitios "A", "P" y "E" del ribosoma, uniones peptídicas, uniones covalentes no peptídicas, puentes de hidrógeno.

b) Sabiendo que los círculos representan a los aminoácidos metionina (M), triptofano (W), fenilalanina (F) y ácido aspártico (D), asigne las bases que pueda al mRNA y a los anticodones.

c) ¿En qué etapa actúa la peptidil transferasa?



PROBLEMA 2

Una mutación puntual (C que cambia a G) en un gen bacteriano produce la aparición de un codón stop UAG en la mitad de su mensajero, lo cual provoca la pérdida de la capacidad de usar ácidos grasos como fuente de alimento.

a) ¿Cuál era el aa codificado por el codón alterado? (utilice el código genético)

Una segunda mutación (independiente de la primera) en un gen que codifica para un RNA de transferencia provoca la alteración de su anticodón de manera tal que se aparea con el codón stop UAG, incorporando el aminoácido tirosina en esa posición. Tal mutación suprime los efectos de la primera, restaurando a las bacterias su capacidad de alimentarse de ácidos grasos.

b) ¿Qué cambio de base es el que determina la segunda mutación?

c) ¿Qué mecanismos garantizan:

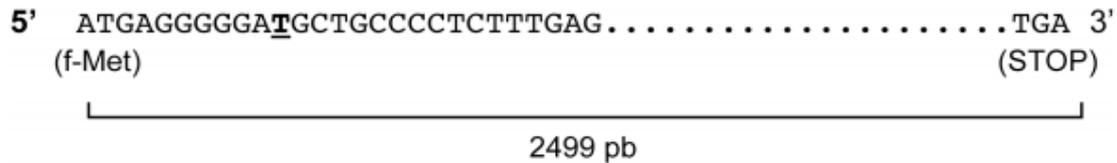
i) que se incorpore tirosina en las posiciones correctas de esa y otras proteínas?

ii) la terminación de la traducción de aquellos mensajeros cuyo codón stop natural es UAG?

d) Discuta las consecuencias fisiológicas que puede ocasionar a la bacteria la adquisición de esta nueva mutación supresora.

PROBLEMA 3

La región codificante del gen de la *Taq* polimerasa (DNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*) comienza con la siguiente secuencia de nucleótidos como se muestra en el esquema:

**Preguntas:**

a) La *Taq* polimerasa tiene en total aminoácidos, de los cuales los 300 primeros del extremo NH₂ son responsables de la actividad exonucleasa de 5'a 3'; mientras que en el extremo COOH reside la actividad de polimerasa.

Se sabe que además de la proteína completa de kDa, *T. aquaticus* sintetiza a partir del mismo mRNA una proteína de 65,5 kDa, con plena actividad de DNA polimerasa y sin actividad 5' a 3' exonucleasa, como consecuencia de la iniciación en un codón interno para metionina.

Dato: PM promedio para un aminoácido = 110 Da.

b) ¿Cuál sería el efecto (sobre la síntesis de la proteína completa y sobre la corta) de la inserción de una A a la derecha de la **T** indicada en la figura? En su respuesta debe indicar cuáles actividades (exonucleasa, polimerasa o ambas) esperaría encontrar.

c) Comparando las secuencias aminoacídicas de las DNA polimerasas de *T. aquaticus* y *E. coli*, se observa que hay un 38% de identidad de secuencia. Sin embargo, las secuencias nucleotídicas de los genes correspondientes no guardan identidad entre sí. Dé una explicación para este hecho en base al código genético.

d) *Thermus aquaticus* tiene en sus ácidos nucleicos un contenido de G+C más elevado que *E. coli*. ¿Cuál puede ser la ventaja de este hecho para *T. aquaticus*?

e) El gen de la *Taq* polimerasa tiene 76 codones para arginina distribuidos así:

CGT	0	AGG	25
CGC	24	AGA	0
CGG	27		
CGA	0		

¿Por qué piensa Ud. que estos organismos evolucionaron de manera de poseer esta particular distribución de codones sinónimos?

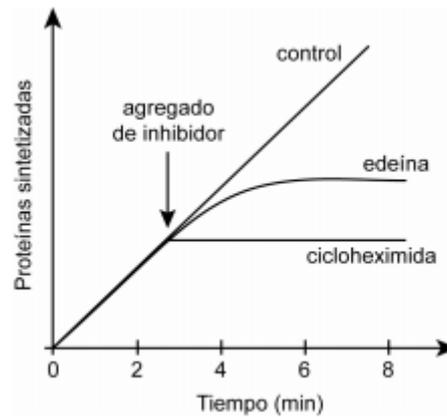
PROBLEMA 4

Se aisló un antibiótico llamado edeína a partir de un cultivo bacteriano. La edeína inhibe la síntesis de proteínas, pero no tiene efecto sobre la síntesis de DNA (duplicación), ni sobre la de RNA (transcripción). Cuando se agrega a un sistema de síntesis de proteínas *in vitro* (lisado de reticulocitos), la edeína detiene la síntesis luego de un corto período de retardo (lag) (ver figura), a diferencia de la cicloheximida, que detiene la síntesis proteica inmediatamente. Un análisis de la mezcla de traducción *in vitro* muestra que luego de 5 minutos de tratamiento con edeína no quedan prácticamente polirribosomas y todo el mRNA aparece unido a subunidades ribosomales pequeñas (40S).

a) ¿Qué etapa de la síntesis proteica es inhibida por la edeína?

b) ¿Por qué hay un retardo (lag) en el efecto inhibitorio de la edeína?

c) ¿Esperaría Ud. que los polirribosomas desaparecieran al agregar cicloheximida?



PROBLEMA 5

La ciclosporina A, producida por un hongo, es un polipéptido de poderosa acción inmunosupresora. De hecho, es utilizado para prevenir el rechazo de injertos de riñón o hígado. La incubación de linfocitos T con ciclosporina A marcada radiativamente resulta en la inmediata acumulación de la droga en el citosol (citoplasma).

Nunca se detecta la droga marcada asociada a la membrana plasmática. La ciclosporina A marcada del citosol se encuentra unida a un receptor de 17.000 Daltons de peso molecular. Una vez unida a su receptor, la ciclosporina A inhibe la aparición de la proteína interleuquina 2 (IL-2) en cultivos de linfocitos T. Este efecto podría deberse a uno o más de los siguientes fenómenos *in vivo*:

- 1) Inhibición de la transcripción del gen de la IL-2.
- 2) Estimulación de la degradación del mRNA de la IL-2.
- 3) Inhibición de la traducción del mRNA de la IL-2.
- 4) Destrucción de la IL-2 secretada.
- 5) Aumento de la rapidez de utilización de IL-2 secretada.

Para determinar cuáles de estas hipótesis podrían ser correctas, se hizo una preparación de todos los RNAs poliadenilados de dos cultivos de linfocitos T, uno tratado y otro no tratado previamente con ciclosporina A. Cada una de las dos preparaciones de RNA poliadenilado fue ensayada en un sistema de traducción *in vitro* y se midió (por medio de anticuerpos específicos y electroforesis en geles) la cantidad de IL-2 fabricada (ver tabla).

Preparación de RNA poliadenilado proveniente de:	Cantidad de IL-2 sintetizada <i>in vitro</i> (unidades arbitrarias)	Cantidad de actina sintetizada <i>in vitro</i> (unidades arbitrarias)
Linfocitos T <u>no tratados</u> con ciclosporina	100	500
Linfocitos T <u>tratados</u> con ciclosporina	1	500

Nota: La actina es una proteína presente en todas las células eucariotas que es imprescindible para su estructura, forma y función.

Preguntas:

- a) ¿A cuáles de los cinco niveles mencionados más arriba podría actuar la ciclosporina?
- b) ¿Qué objeto tiene medir en paralelo la cantidad de actina sintetizada?
- c) Vuelva a este problema luego de resolver Nucleicos II y proponga otros experimentos para confirmar la respuesta a la pregunta a).

PROBLEMA 6

En eucariotas, la subunidad pequeña (40S) se une al extremo 5'CAP de los mRNAs. Luego se desliza en dirección 3' y sólo se detiene al encontrar un AUG que se encuentre situado dentro de la secuencia adecuada, necesaria para que sea reconocido como iniciador.

Se realizó un ensayo de traducción *in vitro* en un lisado de reticulocitos (libre de mRNA endógenos), al que se le agregaron distintas variantes (artificiales) de mensajero de una dada proteína, los cuales sólo diferían en las bases que aparecen en la figura.

Se midió luego la cantidad de proteína correctamente sintetizada:

	Secuencia del mRNA alrededor del primer AUG	Cantidad de proteína sintetizada a partir del AUG resaltado en negrita (% respecto del máximo)
1)	5' NN...NNNGGAUU AUG GNN...NN 3'	100
2)	5' NN...NNNGGACU AUG GNN...NN 3'	100
3)	5' NN...NNNGGAUC AUG GNN...NN 3'	100
4)	5' NN...NNNGGAAU AUG GNN...NN 3'	100
5)	5' NN...NNNGGAUA AUG GNN...NN 3'	100
6)	5' NN...NNNGGAGU AUG GNN...NN 3'	100
7)	5' NN...NNNGGAUG AUG GNN...NN 3'	100
8)	5' NN...NNNGGAUU AUG UNN...NN 3'	2
9)	5' NN...NNNGGAUU AUG CNN...NN 3'	2
10)	5' NN...NNNGGAUU AUG ANN...NN 3'	2
11)	5' NN...NNNGGGUU AUG GNN...NN 3'	100
12)	5' NN...NNNGGCUU AUG GNN...NN 3'	2
13)	5' NN...NNNGGUUU AUG GNN...NN 3'	2
14)	5' NN...NNNGCAUU AUG GNN...NN 3'	100
15)	5' NN...NNNGAAUU AUG GNN...NN 3'	100
16)	5' NN...NNNGUAUU AUG GNN...NN 3'	100
17)	5' NN...NNNGGGCU AUG GNN...NN 3'	100
18)	5' NN...NNNGCGAA AUG GNN...NN 3'	100
19)	5' NN...NNNGGUUU AUG UNN...NN 3'	1
20)	5' NN...NNNGGAUA AUG UNN...NN 3'	2
21)	5' NN...NNNCGAUU AUG GNN...NN 3'	100
22)	5' NN...NNNAGAUU AUG GNN...NN 3'	100
23)	5' NN...NNNUGAUU AUG GNN...NN 3'	100
24)	5' NN...NNNCCAUC AUG GNN...NN 3'	100

El 1) es el mRNA original. Del 2) al 24) son variantes artificiales.

- a) Determine cuáles de los cambios impiden el reconocimiento del iniciador y cuáles no.
- b) Escriba una secuencia consenso para el contexto del AUG iniciador.
- c) ¿Habrá genes eucariotas que para la función de su producto no necesiten de este consenso?
- d) La figura de abajo muestra dos mRNAs que tienen dos AUG cerca del 5'CAP. Determine, en cada caso, en cuál se iniciará la traducción y cuál será la secuencia de los primeros aminoácidos:
 - i) 5' NN...NNNUGUUU**AUG**UCACCA**AUG**GUAGUNN...NN 3'
 - ii) 5' NN...NNNUGAUU**AUG**GCACCA**AUG**GUAGUNN...NN 3'

PROBLEMA 7

En el año 1961, un investigador llamado Dintzis (Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 247,1961) hizo un experimento usando reticulocitos (células precursoras de los glóbulos rojos) enteros incubados a 15°C en presencia de aminoácidos y otros nutrientes esenciales. Luego de 1 hora de incubación, agregó aminoácidos marcados todos radiactivamente y sacó alícuotas a diferentes tiempos para analizar los productos marcados obtenidos.

A los 4 minutos, observó que las únicas cadenas completas de hemoglobina α que estaban marcadas, lo estaban en el extremo -COOH, y que recién a los 60 minutos aparecían cadenas completas marcadas en su totalidad, incluyendo su extremo -NH₂.

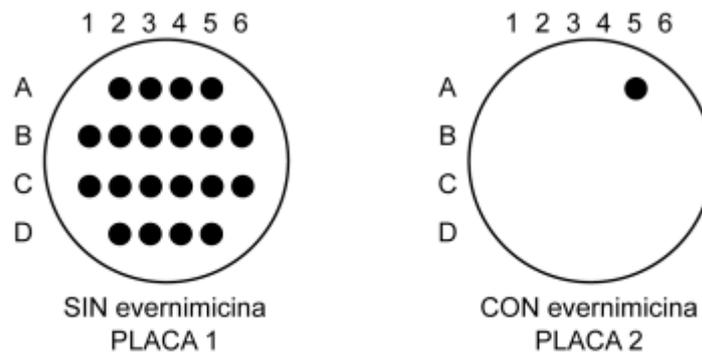
- a) ¿Con qué polaridad (direccionalidad) son sintetizadas las cadenas de hemoglobina α ?
- b) ¿Por qué cree Ud. que Dintzis incubó a 15°C y no a 37°C?

c) ¿Ud. cree que se puede generalizar en forma universal la respuesta a), es decir, que los resultados pueden ser extrapolables a todas las proteínas?

PROBLEMA 8

Streptococcus pneumoniae, o neumococo, es una bacteria que infecta las vías respiratorias de los humanos y es difícil de atacar con los antibióticos tradicionales porque suelen aparecer cepas bacterianas resistentes a ellos. Por eso se están usando nuevos antibióticos más efectivos, como la evernomicina. El neumococo es normalmente sensible a este antibiótico, aunque también, pero muy esporádicamente, aparecen cepas resistentes. Para aislar el gen de la resistencia se hicieron los siguientes experimentos:

Se sembraron ordenadamente y por separado bacterias provenientes de pacientes no tratados con evernomicina en dos placas de Petri, una conteniendo evernomicina y la otra no. Ambas placas se incubaron a 37°C para que crezcan las colonias. La figura muestra lo observado al día siguiente:



Nota: Las manchas negras representan colonias bacterianas.

Se tomó la única colonia hallada en la placa 2. Se extrajo el DNA cromosómico y, al secuenciarlo, se comprobó que el único cambio de secuencia en todo el genoma respecto del genoma de las bacterias de las colonias que crecieron en la placa 1 y no en la placa 2 (bacterias sensibles) correspondía al gen del RNA 23S, el cual mostraba una mutación: en lugar de una C (presente en el gen de las sensibles), las resistentes mostraban una T.

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos *primers* para PCR:

Par I: capaz de amplificar al gen que tiene la T pero no la C.

Par II: capaz de amplificar al gen que tiene la C pero no la T.

Preguntas:

a) ¿Cuál pudo ser la causa de la aparición de las bacterias resistentes de la figura? ¿Qué maquinaria enzimática “se equivocó”?

b) El cambio C a T en el gen de RNA de 23S de la única colonia de la placa 2, ¿surgió como consecuencia de la presencia de la evernomicina o era pre-existente? ¿Con qué mecanismo evolutivo es consistente este resultado? ¿Con qué par de *primers* (I o II) se obtendría producto de PCR a partir de DNA de las siguientes colonias?:

Placa 1: posiciones B3 y A5

Placa 2: única colonia (posición A5)

c) ¿A qué macromolécula se uniría la evernomicina y qué actividad enzimática inhibiría en las bacterias sensibles?

PROBLEMA 9

En las neuronas de algunos mamíferos que presentan síntomas neurológicos severos, se ha encontrado una proteína de 30 kDa llamada PrS, que tiende a formar agregados insolubles.

A esta proteína se le atribuyen:

- la causa de la enfermedad.

- propiedades infecciosas, ya que una pequeña cantidad (teóricamente una sola molécula) en una neurona puede desencadenar un daño importante como resultado de una propagación de la entidad molecular infectiva, y además, porque la enfermedad puede ser contagiosa.

Curiosamente, en neuronas no infectadas existe una proteína de función desconocida y con idéntica secuencia de aminoácidos y las mismas modificaciones covalentes co- y posttraduccionales, llamada PrC, pero que ni se insolubiliza ni es infectiva. Un dato interesante es que la ausencia total de la proteína normal PrC (por ausencia del gen) no provoca enfermedad y hasta protege contra el riesgo de contraerla vía infección por PrS.

Por otra parte, personas con ciertas mutaciones puntuales en el gen PrC (como por ejemplo las que causan el cambio de Glu en la posición 200 por Lys, o el cambio de Pro en la posición 102 por Leu) tienen tendencia a desarrollar espontáneamente los síntomas neurológicos sin estar infectados.

Estudios *in vitro* con las proteínas purificadas demostraron que, además de la insolubilidad e infectividad, PrS y PrC difieren en su comportamiento frente a proteasas. Además, si se mezclan 1 µg de PrS (infectiva y resistente a proteasas) con 5 µg de PrC, la mezcla se vuelve tan infectiva y resistente a proteasas como 6 µg de PrS!!

A partir de las evidencias mencionadas, deduzca:

a) ¿A qué características estructurales de estas proteínas se deben las diferentes propiedades observadas entre PrC y PrS en cuanto a su solubilidad y resistencia a proteasas?

b) ¿Qué características deben tener en común las PrC mutadas y PrS para explicar la existencia de la enfermedad neurológica de origen genético?

c) ¿Qué propiedad adicional debe tener PrS para explicar la propagación del daño que causa *in vivo* y la transformación de PrC en los experimentos *in vitro*? ¿Cree Ud. que PrS y PrC son capaces de interactuar entre sí *in vitro* e *in vivo*?

d) ¿Por qué las neuronas sin PrC son resistentes a la infección?

PROBLEMA 10

Transmitido por el mosquito *Aedes aegypti*, el **virus del dengue** es el agente causal de la llamada "fiebre dengue", enfermedad que ha reaparecido recientemente en forma preocupante en diversas regiones tropicales del mundo y también en nuestro país, sobre todo en la provincia del Chaco. Un síntoma que suele producir en los casos severos es hemorragia debido a una exagerada respuesta de las células del sistema inmune infectadas, lo cual provoca muerte de células de los vasos sanguíneos.

El virus, de la misma familia del de la fiebre amarilla, tiene como genoma **una única molécula de RNA de cadena simple**, de 10,7 kilobases (kb) y **no contiene ni codifica transcriptasa reversa**. Este genoma codifica para 10 polipéptidos virales, todos de diferente estructura primaria. Tres de estos polipéptidos, llamados estructurales, forman parte, junto al RNA, de la partícula viral o virión. Los 7 polipéptidos restantes (llamados **NS1**, **NS2a**, **NS2b**, **NS3**, **NS4a**, **NS4b** y **NS5**) no forman parte de los viriones, pero tienen diversas actividades enzimáticas, algunas importantes para la replicación del virus en la célula infectada. **NS5** es la **polimerasa** encargada de replicar al genoma viral y fabricar mRNA a partir del mismo.

Preguntas:

a) Marque en las siguientes opciones qué tipo de polimerasa será **NS5** y justifique su opción:

- i) DNA polimerasa DNA dependiente
- ii) RNA polimerasa DNA dependiente
- iii) RNA polimerasa RNA dependiente
- iv) DNA polimerasa RNA dependiente

b) ¿Necesitará la polimerasa viral NS5 un "primer" para funcionar? Justifique.

c) ¿Tendrá esta polimerasa actividad de "*proofreading*" o lectura de pruebas (3'-5' exonucleasa)?

Analizando la secuencia del mRNA de una de las variedades argentinas se observó que a partir del primer codón AUG en adelante, no hay ningún codón stop de la traducción (UAA, UAG o UGA) hasta el **codón número 3.393 (UAA)**, localizado muy cerca del extremo 3' del mRNA. Este mRNA da origen a los 10 tipos de proteínas diferentes codificadas por el virus arriba mencionados.

d) Sabiendo que el genoma de dengue no tiene intrones y que tiene un solo marco de lectura abierto, ¿qué mecanismo puede explicar la aparición de 10 polipéptidos diferentes?

e) Uno solo de los 10 polipéptidos tiene metionina como primer aminoácido, ¿cuál es?

f) **NS3** tiene actividad de **helicasa** de RNA de cadena doble y también de **proteasa**. ¿En qué ayudarán estas dos actividades de **NS3** al proceso de replicación del virus?

g) No habiendo vacuna disponible por el momento, los investigadores están tratando de desarrollar drogas que inhiban específicamente a la polimerasa viral. Se piensa que este tipo de drogas no afectaría a las células no infectadas del paciente, con lo cual no tendría efectos secundarios perjudiciales. ¿Por qué tales drogas no afectarían:

i) la duplicación del DNA?

ii) la transcripción de los genes celulares?

iii) el alargamiento de los telómeros de los cromosomas celulares?

Armá un modelo de ADN con papel

Con esta página podés armar un modelo 3D de una doble cadena de ADN en forma B. Elegí el modelo chico y esquemático de la derecha y/o el modelo grande y más detallado de la siguiente página.



Recortá el modelo



Doblá por los pliegues largos primero. Las líneas sólidas deben verse sobre el pliegue



Doblá por las líneas punteadas de forma que queden ocultas en el pliegue



Plegá por la mitad dejando sobresalir el esqueleto de azúcar-fosfato (3' escrito arriba)



Plegá las solapas de la otra cadena una sobre otra, buscando que tu modelo se vea como en la figura



Aplana el modelo y plegá sobre las líneas horizontales y diagonales como un ventilador (las líneas sólidas sobre el pliegue, las punteadas ocultas)



Tu modelo se verá así cuando todas las líneas estén plegadas sobresalir los esqueletos



Extendé el modelo dejando sobresalir los esqueletos

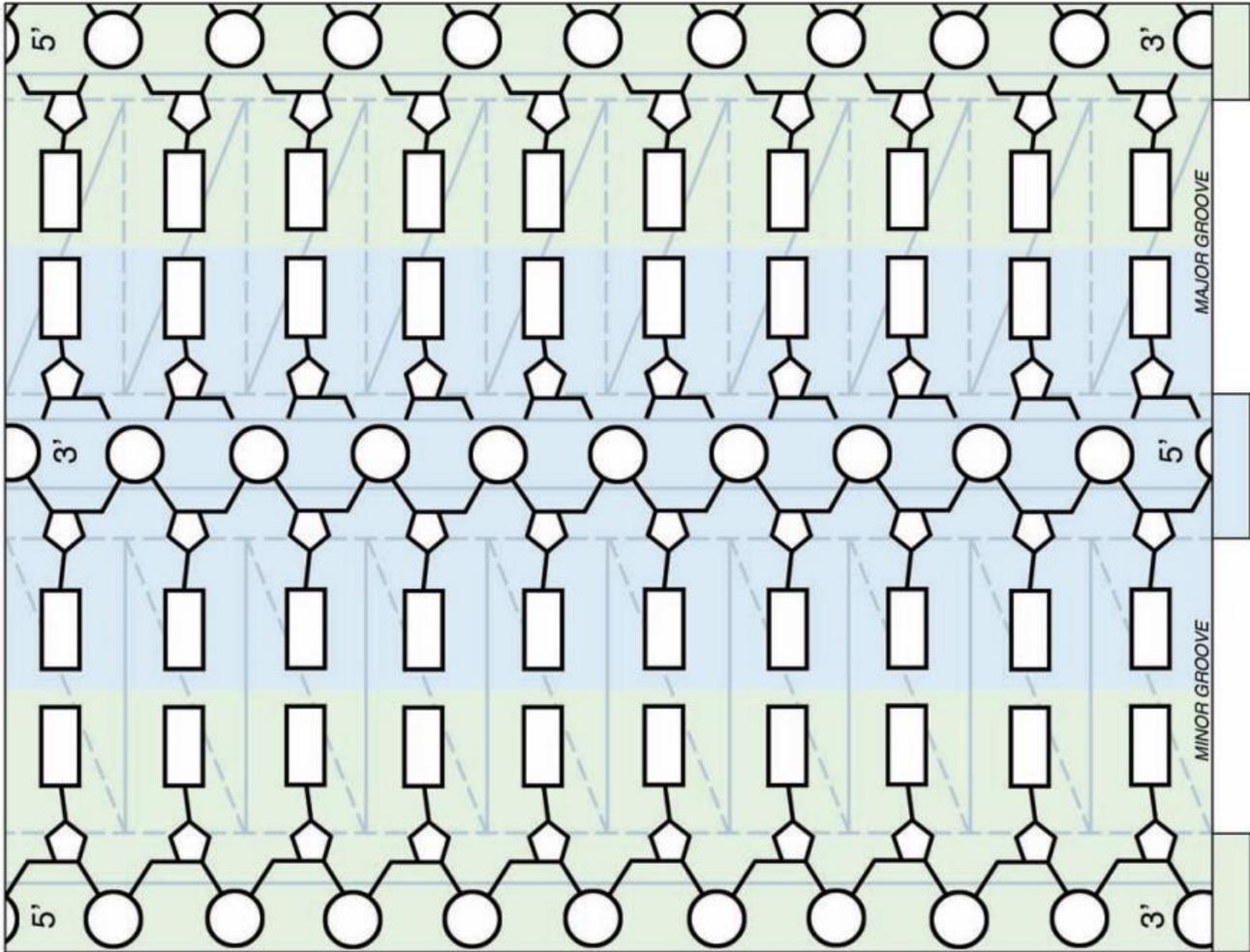


El modelo terminado es una doble-hélice dextrógira. Usá las lengüetas para conectar varios y hacer hebras más largas

Sobre el ADN

El ADN es una molécula muy eficiente para almacenar y leer información genética. Si se respeta el apareamiento de bases A::T / C::G, la estructura general es independiente de la secuencia.

El modelo detallado de la siguiente página tiene la secuencia 5'-C-G-C-T-T-A-A-G-C-G-3'. Nótese que es un palíndromo. So tomaras una hebra y la dieras vuelta en el espacio, se aparearía perfectamente con otra copia de sí misma. Los bordes de las bases quedan expuestos en los pisos de los surcos mayores y menores. Estos patrones también codifican información pues son reconocidos específicamente por proteínas.



Podés leer más sobre esto en la sección *Molecule of the Month*
http://dx.doi.org/10.2210/rcsb_ptb/mom_2011_11

Baja más copias del modelo en la página de la materia o de *Educational Resources*
<http://www.pdb.org>

para más info

