

Genética Molecular- Comisión B (turno mañana)

Guía de Problemas 2: Replicación del DNA

1. Para confirmar los resultados del experimento de Meselson y Stahl, del que concluyeron que cada célula hija hereda una y sólo una hebra del DNA de la célula madre, se realizaron los siguientes experimentos.

Se sincronizó un cultivo de células de modo que todas empiezan y terminan la síntesis del DNA (replicación) al mismo tiempo. Primero se mantuvieron en un medio de cultivo normal y luego, tras una ronda de síntesis de DNA, se traspasaron a un medio que contiene nutrientes altamente enriquecidos en los isótopos pesados del nitrógeno y el carbono (^{15}N y ^{14}C en lugar de los isótopos abundantes en la naturaleza, ^{14}N y ^{12}C).

Luego se aisló el DNA de células que han crecido en ese medio durante distintos números de generaciones y se analizó la densidad de ese DNA usando una técnica de centrifugación en gradiente de densidad en CsCl.

- a) ¿Cuál es el fundamento de esta técnica de centrifugación?
- b) ¿Podría haberse utilizado un gradiente de sacarosa?
- c) Los datos se muestran en la figura 1. ¿Están estos resultados de acuerdo con lo esperado? Explique los resultados.

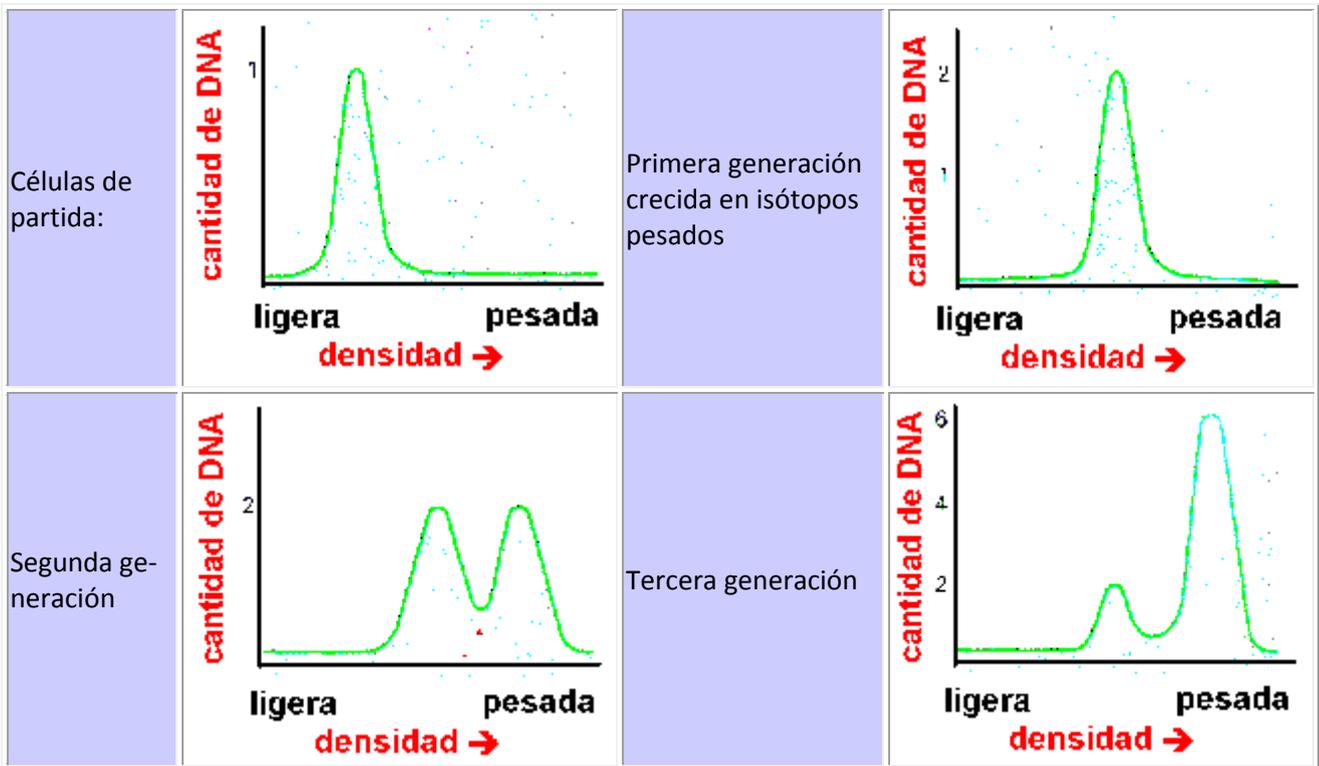
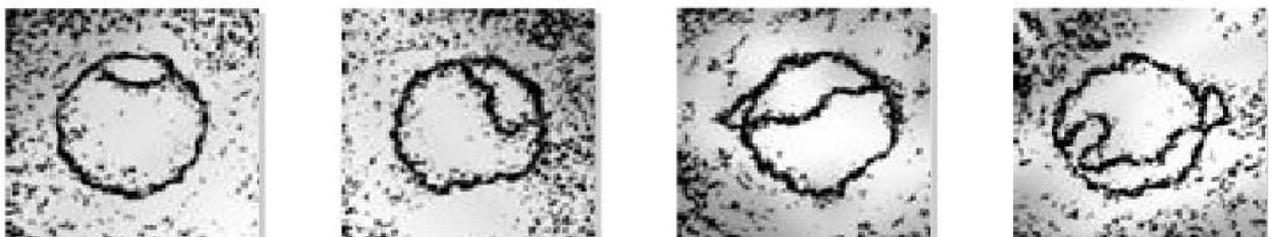
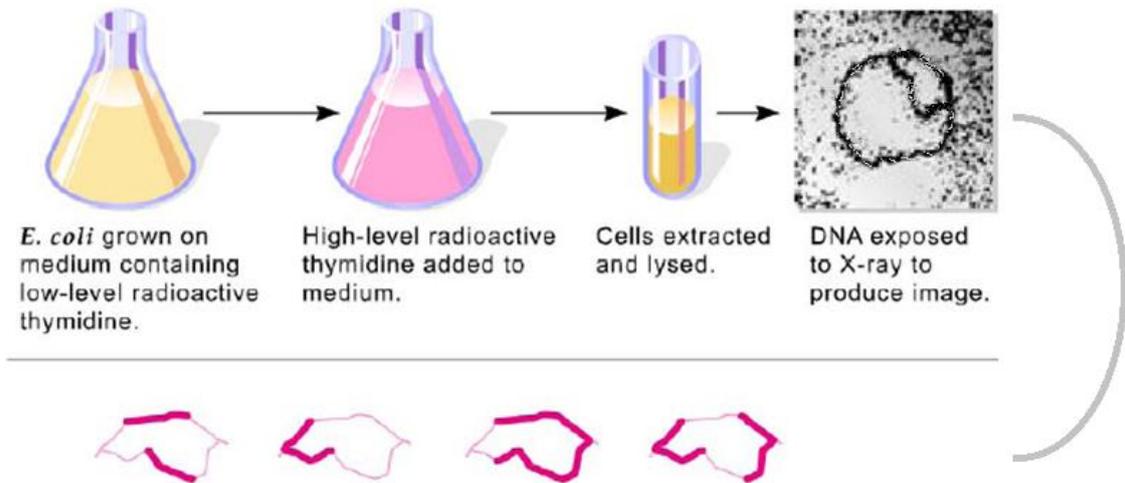


Figura 1. Representación de la cuantificación de DNA para cada una de las fracciones del gradiente de CsCl en las distintas generaciones.

2. a) Indique el número de orígenes de replicación que están presentes en las micrografías de la figura. Señale las regiones que han sufrido replicación ¿Es posible a partir de estos resultados indicar si la replicación es uni o bidireccional?. Justifique su respuesta.



b) Con el objetivo de determinar si la replicación es uni o bidireccional se realizaron los experimentos detallados en la figura empleando timidina con dos radiactividades específicas. Escoja en los diagramas de la horquilla bajo la línea, el diagrama que mejor representa los resultados que obtendría para una replicación bidireccional y para una unidireccional.



3. Esquematice una burbuja de replicación indicando las polaridades de las cadenas de DNA, RNA, avance de horquillas y las enzimas involucradas.

4. Se desea determinar el mecanismo de replicación de un fago que infecta *E. coli*, cuyo genoma es un DNA de doble cadena de 2000 pares de bases. Para ello, se propagaron los fagos en dos cultivos de *E. coli* cuya única fuente de nitrógeno era NH_4Cl (^{14}N) en uno de los cultivos y NH_4Cl (^{15}N) en el otro. Para separar las moléculas de distintas densidades se emplearon gradientes de CsCl y gradientes de CsCl-NaOH. El DNA fágico se separó del cromosomal sin introducir rupturas. La entrada del fago a la bacteria toma 2 min. (DNA desnudo) e inmediatamente comienza la replicación del DNA que finaliza a los 30 min, empleándose para ello las enzimas bacterianas.

Experimento 1: Se mezcló un inóculo de fagos con un cultivo líquido de bacterias en NH_4Cl (^{14}N) y a los 2 min se tomó una muestra de la mezcla. Se extrajo y purificó el DNA fágico y se determinó la concentración de ácido nucleico por absorbancia a 260 nm. A dos alícuotas de esta preparación de DNA se las trató con: a) una exonucleasa 3'-5' y b) una exonucleasa 5'-3'. Posteriormente, se separaron los productos de degradación y se determinó la concentración de DNA. En ambos casos, a) y b), la $A_{260\text{nm}}$ después del tratamiento fue aproximadamente la mitad de la $A_{260\text{nm}}$ inicial.

Experimento 2: En el mismo momento en que se tomó la muestra para el exp. 1, se agregó al cultivo NH_4Cl (^{15}N), lo que se consideró como tiempo cero para el experimento 2. Se tomaron alícuotas a los 15, 30 y 45 min y el DNA fágico se separó en gradiente de CsCl con y sin NaOH. De las bandas obtenidas en los gradientes de densidad, se extrajo el DNA para linearizarlo y someterlo a electroforesis en geles de agarosa y para tratarlo con exonucleasas. La tabla indica los resultados obtenidos en todas las determinaciones.

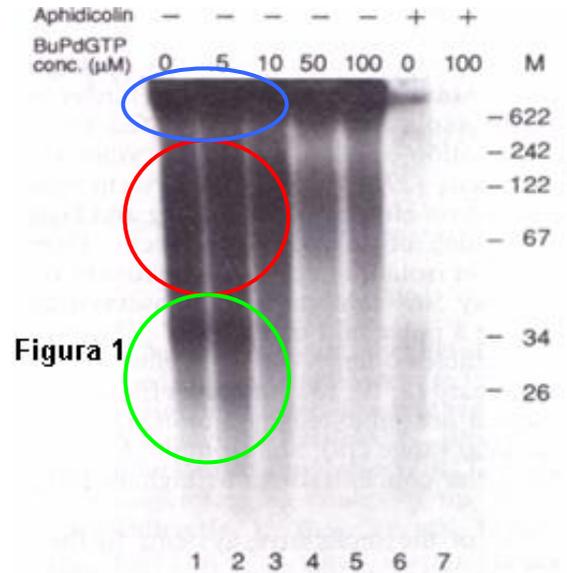
a) Basado en la información que le da el problema, esquematice claramente el mecanismo de replicación de este fago justificando sus razonamientos

Tiempo(min)	Bandas extraídas del Gradiente de CsCl	del gradiente de CsCl (NaOH)		
		Bandas	Tamaño (número de nucleótidos)	Sensibilidad a exonucleasa
15	^{14}N y ^{15}N	^{14}N	2000	No
		^{15}N	1000	Sí
		^{14}N y ^{15}N	3000	Sí
30	^{14}N y ^{15}N	^{14}N	2000	No
		^{15}N	2000	Sí
		^{14}N y ^{15}N	4000	Sí

45	^{14}N y ^{15}N	^{14}N	2000	No
		^{15}N	3000	Sí
		^{14}N y ^{15}N	5000	Sí

5. Se estudió la actividad de las DNA polimerasas α y δ en la replicación del DNA del virus eucariota SV40. Para ello estas enzimas se incubaron *in vitro* con DNA, dCTP, dGTP, dTTP cada uno en concentración 20 μM , cofactores, otras enzimas necesarias para la replicación y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP en presencia o en ausencia de butilfenil dGTP (BuPdGTP), un inhibidor competitivo de la DNA Pol α , o afidicolina, un inhibidor no competitivo de las polimerasas α y δ .

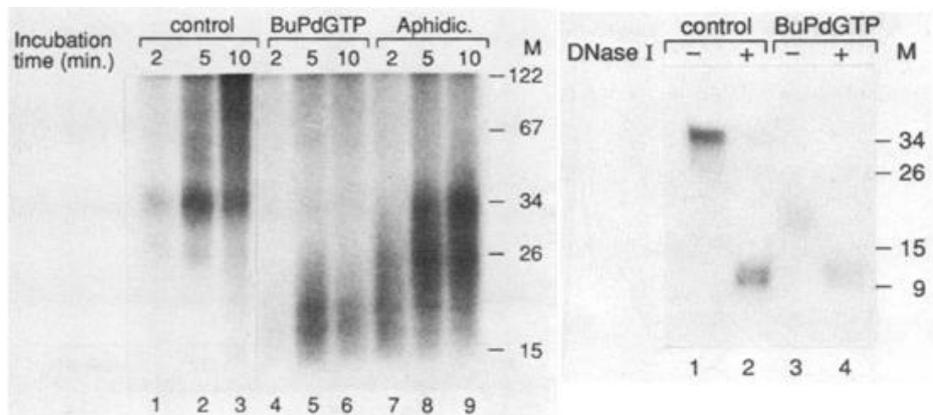
Por medio del mismo sistema de reacción, se aislaron intermediarios de la replicación, obtenidos durante incubaciones de 2 minutos en presencia de BuPdGTP y/o afidicolina, con ambas enzimas. A dichos fragmentos se los separó por electroforesis en geles de poliacrilamida con urea 8 M y se observaron sus tamaños por autorradiografía (Figura 1).



a) ¿A qué tipos de intermediarios de la replicación corresponden cada uno de los grupos de pesos moleculares que se observan en la Figura 1?

En otro ensayo, se incubaron las mezclas de reacción (con ambas enzimas y BuPdGTP o afidicolina) durante distintos tiempos en presencia de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP y con los cuatro dNTPs sin marca. Se separaron los productos por electroforesis y autorradiografía en las mismas condiciones del ensayo anterior (Figura 2a). Los productos contenidos en las bandas mayoritarias (las que contenían más material) se digirieron exhaustivamente con DNasa y se sometieron a una nueva electroforesis (Figura 2b).

b) ¿En qué región de los ácidos nucleicos nuevos se encuentra la marca que se observa en la Figura 2a? ¿Qué tipos de intermediarios representa cada región de pesos moleculares en la Figura 2a? ¿Puede corroborar estos resultados con los de la Figura 2b?



c) En base a los resultados discutidos en este problema ¿qué rol asignaría a las polimerasas α y δ en la replicación del DNA del virus eucariota SV40?

6. Los siguientes estudios se han realizado con el objeto de entender la regulación de la replicación, su relación con la síntesis de proteína y con la división celular.

Se aisló un **mutante letal condicional** de replicación sensible a la temperatura (tiene mutado un aminoácido de una proteína implicada en la replicación, de forma que ésta es funcional en condiciones permisivas pero deja de serlo en condiciones restrictivas).

La velocidad de síntesis de DNA se estudió mediante la incorporación de ³H timina. A distintos tiempos se precipitaron alícuotas del cultivo con TCA al 10%, para luego contar las cpm en un contador de centelleo. La figura 9 muestra los resultados correspondientes a la síntesis de DNA a 30 °C (temperatura permisiva), y su posterior pasaje a 42 °C (temperatura restrictiva).

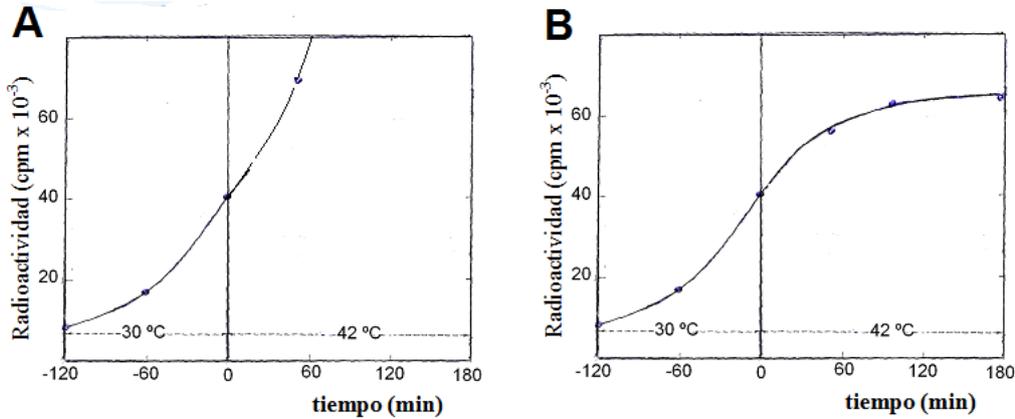


Figura 9. Incorporación de ³H timina en función del tiempo a la temperatura permisiva (30 °C) y restrictiva (42 °C). **A.** Cepa control. **B.** Mutante

- a) Explique cómo se obtuvo el **mutante letal condicional**
- b) Discuta los resultados de la figura 9. Explique la forma de la curva al pasar a 42 °C.
- c) ¿Qué etapa de la replicación cree que está afectada?.

7. Una bacteria auxótrofa para Trp se transfiere de un medio rico a uno sin triptófano y nuevamente a un medio rico. La figura 10 muestra la cuantificación de distintas moléculas en función del tiempo y la figura 11 mide el nivel de replicación de oriC y terC para este auxótrofo medido por hibridación con las respectivas sondas radioactivas correspondientes a esas regiones del genoma (considere 2 sitios terC por genoma).

- a) ¿A qué tiempo se tiene el cultivo sincronizado?
- b) ¿Cómo explica la forma de las curvas de las figuras 10 y 11. ¿Qué etapa de la replicación se ve afectada cuando se detiene la síntesis de proteínas?

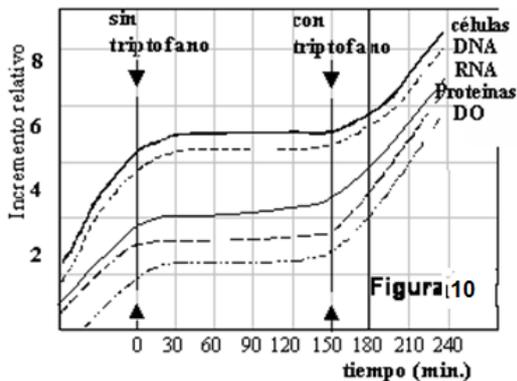


Figura 10: cuantificación de células, DNA, RNA y proteínas en función del tiempo de cultivo. Se indican los tiempos de traspaso de cultivo a medio con o sin triptófano. DO corresponde a la absorbancia a 260 nm.

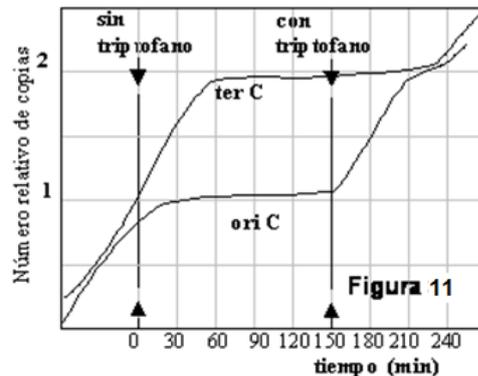


Figura 11: Replicación de las regiones correspondientes al origen (oriC) y final de replicación (terC) medidos mediante hibridación y cuantificación de la señal con cada sonda