

Soluciones de la serie de ejercicios 4 (Curso 7.012)

Pregunta 1

Usted está estudiando la síntesis del aminoácido triptófano en las bacterias. Las enzimas TrpA, TrpB, TrpC, TrpD, TrpE and AroH son necesarias para la síntesis del triptófano. En presencia de triptófano, la bacteria de tipo salvaje no sintetiza ninguna de estas enzimas, sin embargo, en ausencia de triptófano, lo hacen en grandes cantidades.

- a) En términos teóricos, si la síntesis de las anteriores enzimas se regula negativamente
- I) ¿Qué cambio en la proteína represora haría que las enzimas se sintetizarán incluso en presencia de triptófano?
Inactivación del represor funcional para que no pueda unirse al operador.
- II) ¿Qué cambio en la secuencia operadora haría que las enzimas se sintetizasen incluso en presencia de triptófano?
Una mutación en la secuencia del operador de forma que no pueda seguir uniéndose con el represor.
- III) ¿Qué cambio en la proteína represora causaría la inhibición de la síntesis de las enzimas incluso en ausencia de triptófano?
Un cambio que aumente la afinidad del represor con el operador; por ejemplo, un represor constitutivamente activo.
- b) Si la síntesis de las anteriores enzimas se regula positivamente,
- I) ¿Qué cambio en la proteína activadora haría que las enzimas se sintetizaran incluso en presencia de triptófano?
Un cambio que aumente la afinidad del activador con el operador; por ejemplo, un activador constitutivamente activo. O... un cambio en el activador para que el triptófano no pueda volver a unirse.
- II) ¿Qué cambio en la proteína activadora impediría la síntesis de las enzimas, incluso en ausencia de triptófano?
Una mutación en la secuencia del gen activador para que se produzca una proteína activadora no funcional.
- III) ¿Qué cambio en la secuencia operadora impediría la síntesis de enzimas, incluso en ausencia de triptófano?
Una mutación en la secuencia operadora que le impida unirse a un activador.
- c) Mediante un análisis mutacional se identifican dos regiones de ADN muy importantes en la regulación de la síntesis del triptófano. La primera de estas regiones, llamada trpR, es un gen que codifica una proteína enlazada con el ADN. La segunda región es una secuencia de ADN, llamada trpO, a la que se une el producto del gen trpR. El análisis de las 3 cepas bacteriales con diferentes genotipos en los loci trpR y trpO arroja los siguientes resultados:

Cepa	Media de crecimiento	Niveles ARNm de trpA, trpB, trpC, trpD y trpE
<i>trpR</i> + <i>trpO</i> +	con triptófano	0,1%
	sin triptófano	100%
<i>trpR</i> – <i>trpO</i> +	con triptófano	100%
	sin triptófano	100%
<i>trpR</i> + <i>trpO</i> –	con triptófano	100%
	sin triptófano	100%

- I) ¿El control de la síntesis de triptófano es un ejemplo de regulación positiva o negativa?
- II) *La síntesis del triptófano es un ejemplo de regulación negativa.*
- III) La proteína producida a partir de un gen *trpR*, ¿es activadora o represora?
- IV) *La proteína *trpR* actúa como represor.*
- d) Los experimentos para controlar la presencia o ausencia de enzimas producidas por los genes *trpC*, *trpD*, *trpE* y *aroH* en algunos mutantes aislados muestran los siguientes resultados:

		Tipo salvaje	mutante				
			1	2	3	4	5
Nivel TrpC	con triptófano	-	-	-	-	-	+
	sin triptófano	+	-	+	+	-	+
Nivel TrpD	con triptófano	-	-	-	-	-	+
	sin triptófano	+	+	-	+	-	+
Nivel TrpE	con triptófano	-	-	-	-	-	+
	sin triptófano	+	+	+	+	-	+
Nivel AroH	con triptófano	-	-	-	-	-	+
	sin triptófano	+	+	+	-	+	+

- I) Enumere todos los mutantes cuyas mutaciones afectan la producción de cualquier TrpC funcional.
Mutante 1, mutante 4, mutante 5.
- II) Enumere todos los mutantes cuyas mutaciones afectan la producción de cualquier TrpD funcional.
Mutante 2, mutante 4, mutante 5.
- III) Enumere todos los mutantes cuyas mutaciones afectan la producción de cualquier AroH funcional.
Mutante 3 y mutante 5.

- e) ¿Coinciden los datos anteriores con la teoría de que cualquiera de estos genes se encuentra en el mismo operón (y por lo tanto bajo el control de un solo promotor)? ¿Por qué? ¿Qué genes estarían contenidos en dicho operón?

La ausencia de enzimas funcionales procedentes de tres loci, como en el caso del mutante 4, sugiere que se pueden encontrar varios genes en el mismo operón. Todos los genes del operón están bajo el control del mismo promotor, que en el caso del mutante 4, ha sufrido una transformación y no es funcional, impidiendo la síntesis de cualquiera de estas enzimas. Este operón contiene los genes trpC, trpD y trpE.

- f) ¿Cómo explicaría el mutante 5 en términos de mutaciones reguladoras?

Aunque se localicen en distintas regiones del ADN, tanto el operon trpC/trpD/trpE como el gen aroH se pueden encontrar regulados por la misma proteína represora trpR. El mutante 5 sufriría una mutación en el gen trpR que bloquearía el represor funcional trpR. Por lo tanto, todos los genes se expresarían independientemente de la presencia o ausencia de triptófano.

Pregunta 2

Trabajando con ratones dentro del programa de oportunidades de investigación para universitarios, descubre una enzima catabólica muy importante. Realiza mutaciones en el gen codificador de esa enzima de forma que la enzima mutante esté siempre activa. Los ratones portadores de dicho pierden peso de forma rápida y permanente sin otros efectos secundarios. ¡HA DESCUBIERTO POR FIN LO QUE MILLONES DE PERSONAS EN TODO EL MUNDO HAN BUSCADO DURANTE AÑOS Y AÑOS! Pero... necesita la versión humana de este gen.

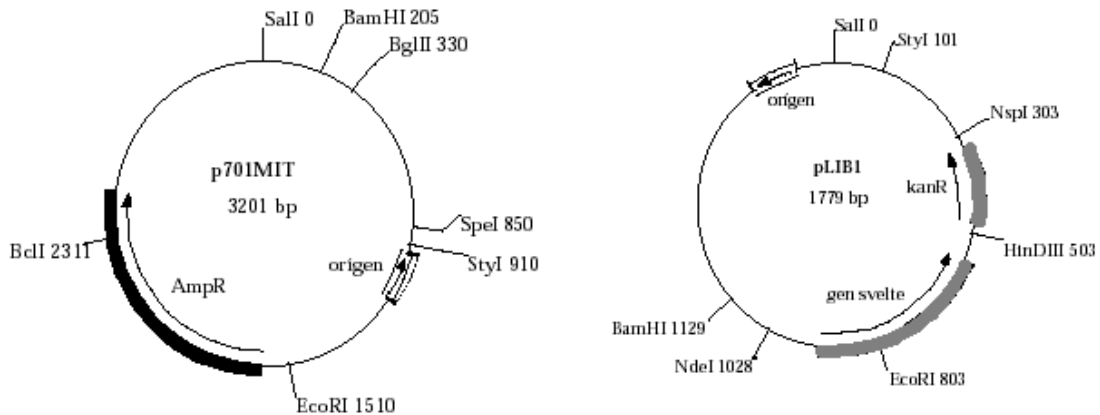
Para empezar, decide organizar una biblioteca de ADN genómico humano.

- a) A continuación, explique resumidamente cómo haría usted una biblioteca de ADN genómico humano en una bacteria. Incluya los términos: ADN genómico, enzima de restricción, plásmido, ligación, transformación, placas de Petri, sonda e hibridar.

1. *Cortar el ADN genómico humano con una enzima de restricción.*
2. *Cortar el vector de plásmido que tiene un indicador seleccionable (como la resistencia a la ampicilina) con la misma enzima de restricción.*
3. *Unir el ADN genómico con el vector.*
4. *Transformar dicha unión en E. Coli.*
5. *Cultivar el E. Coli transformado en un medio sólido en placas de Petri que contengan ampicilina.*
6. *Hacer una sonda e hibridarla al ADN de la biblioteca.*

Consigue encontrar el homólogo humano. Ha localizado la colonia que contiene plásmido, llamada *plib1*, en el homólogo humano. Aísla el plásmido, clona el gen y lo denomina gen **svelte**. Ahora, desea expresar muchas enzimas humanas para poder completar un estudio bioquímico de la proteína. Para ello, debe convertir el gen *svelte* del plásmido *plib1* en una

expresión vectorial. Tiene una gran expresión vectorial, *p7.01MIT* para usar en *E. Coli*. A continuación se muestra un diagrama de la expresión vectorial *p7.01MIT* y el *plib1* con sus únicas secuencias de enzimas de restricción.



b) Quiere insertar un fragmento de ADN, que contiene el gen *esbelto* y el gen resistente a la kanamicina (*kan R*), en la expresión vectorial *p701MIT*.

- I) ¿Qué enzima o enzimas utilizaría para cortar *plib1* y así obtener un solo fragmento que contenga el gen *esbelto* y el gen resistente a la kanamicina (*kan R*)? ¿Qué tamaño tendrían los fragmentos obtenidos?
Opción 1: SalI y BamHI: 1129 + 650
Opción 2: StyI y BamHI: 1028 + 751
- I) ¿Qué enzima o enzimas utilizaría para cortar *plib1*? ¿Qué tamaño tendrían los fragmentos obtenidos?
Opción 1: SalI y BamHI: 2996 + 205
Opción 2: StyI y BamHI: 2495 + 706

c) Después de la ligación, transforma su nuevo vector *p701MIT*, que contiene el gen *svelte* y el gen con resistencia a la kanamicina (*kan R*), en una cepa *E.coli*.

- I) Antes de llevar a cabo la transformación, esta cepa de *E.coli* debería ser...
 (rodee con un círculo la opción adecuada)

Resistente a la ampicilina
 Resistente a la kanamicina

Sensible a la ampicilina
Sensible a la kanamicina

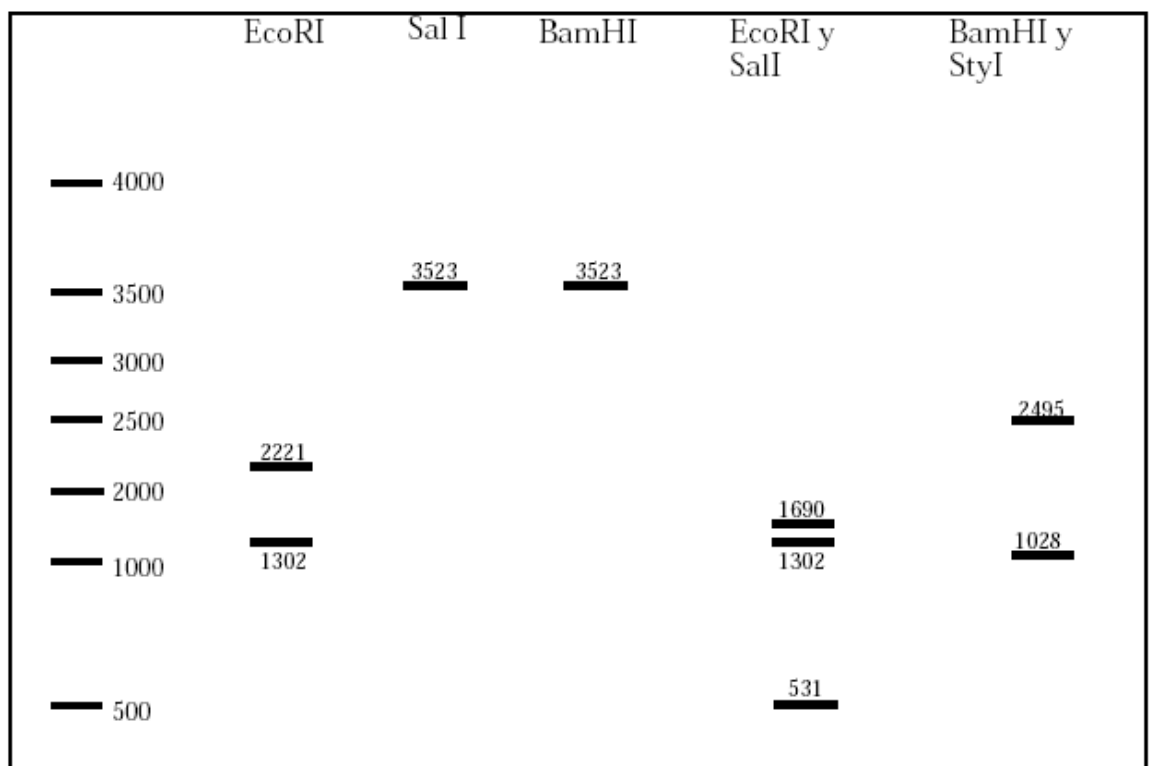
- II) ¿Cómo detectaría las células que poseen un vector que contiene a su vez el gen *svelte*?
Cultivando las células transformadas en un medio que contenga ampicilina y kanamicina.
- III) ¿Qué ventaja hay al incluir el gen *kan R* en el fragmento que clonó en un *p701MIT*?

Permite seleccionar cualquier célula que fuera transformada con el vector solamente (por ejemplo, con un vector que no portase ningún inserto), o con el vector portador del inserto inadecuado.

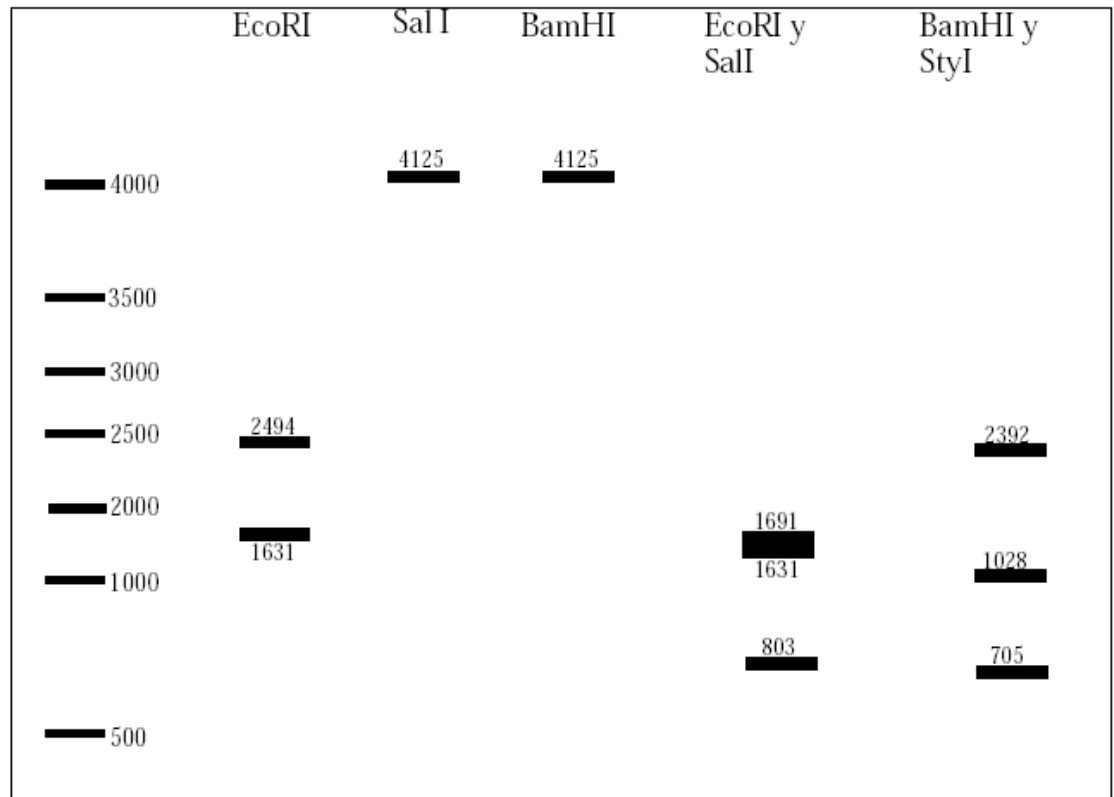
Pregunta 3

A) En la siguiente tabla, marque los lugares donde cree que puede encontrar bandas. Escriba en cada banda el número de bases que puede contener el fragmento.

Para la clonación de BamHI y StII:



Para la clonación de Sall y BamHI:



b) cebador: 5' *GAGTATCAGT* 3'

c) ¿Cuál es la secuencia del ADN recién sintetizado? Incluya y marque el cebador y marque los extremos 5' y 3'.

5' *GAGTATCAGTAGCGGGCCTTTACGCCAGCAT*
cebador

Pregunta 4

Imagine que es usted un consejero genético del hospital de Boston. Una pareja (cuyo árbol genealógico se muestra debajo) acude a usted para conocer la probabilidad de que el hijo que esperan nazca con las orejas grandes.

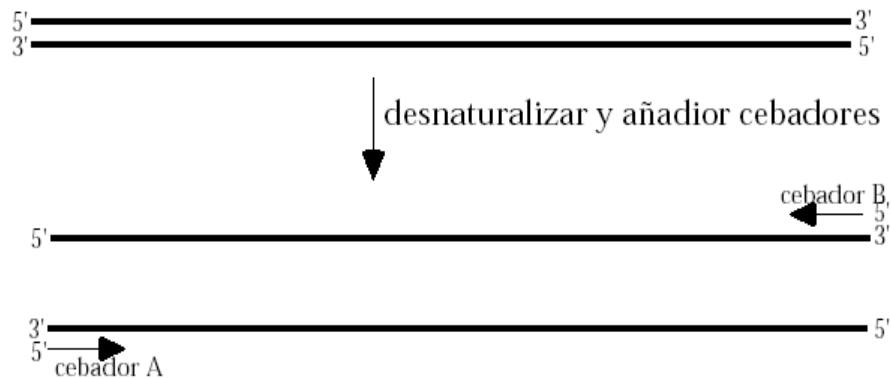
Hace muy poco que se clonó y secuenció el gen que causaba las orejas grandes. A continuación se muestra la región que rodea el gen regulador del tamaño de las orejas.

5' GTCCTGATTTAAAGGC **Gen que determina el tamaño de la oreja** GGGTCTAATGCCTAGTAGGTCCAAT3'
 3' CAGGACTAAATTTCCG CCCAGATTACGGATCATCCAGGTTA5'

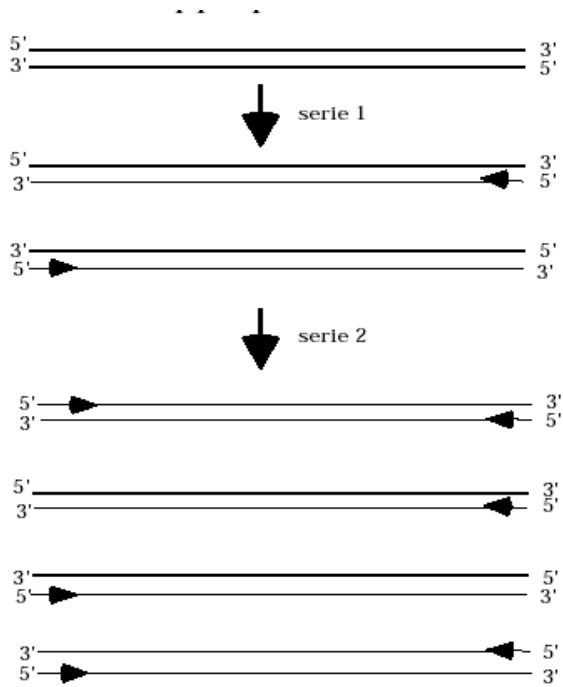
a) Quiere amplificar este gen de cada uno de los progenitores utilizando PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Obtenga la secuencia de dos cebadores para dicha reacción de PCR. Clasifique los extremos 5' y 3'.

cebador A: 5' GTCCTGATTT 3'
 cebador B: 5' ATTGGACCTA 3'

b) A continuación encontrará un esquema de la misma región. Dibuje en el diagrama de debajo donde debería unirse cada cebador.



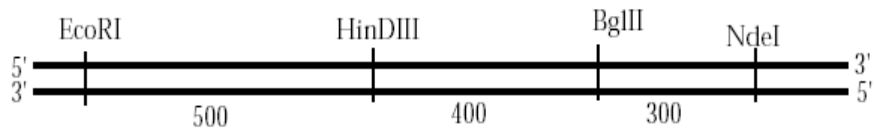
c) En un esquema como el anterior (b), dibuje las cepas de ADN que estarían presentes después de 2 series de reacción en cadena de la polimerasa. Incluya los cebadores en cada cepa donde sea necesario.



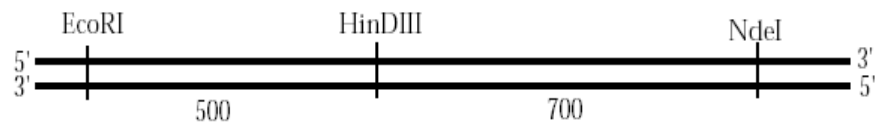
Pregunta 4 (continuación)

A continuación se muestra un mapa de restricción de esta región:

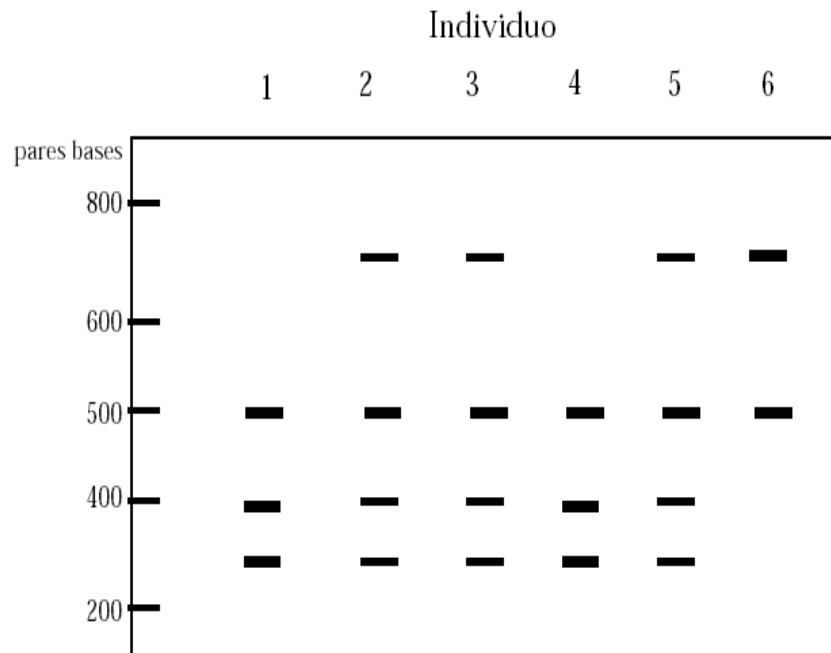
mutante



tipo salvaje



El ADN, amplificado con PCR, de cada miembro de la familia se ha asimilado con Hind III, Nde I y Bgl II. El ADN asimilado ha sido separado mediante electroforesis en gel. Los resultados son los siguientes:



d) El fenotipo de las orejas grandes, ¿es dominante o recesivo? ¿Cómo se determina esto?

El fenotipo de las orejas grandes es recesivo con respecto al fenotipo normal. En la tabla, se observa que el individuo 2 tiene el gen de tipo salvaje y el gen mutante. El individuo 2 no muestra el fenotipo de orejas grandes.

e) Después de observar el árbol genealógico y la tabla, ¿qué posibilidad hay de que los individuos 1 y 2 tengan hijos con las orejas grandes? Explíquelo.

Los individuos 1 y 2 tienen un 50% de posibilidades de tener hijos con las orejas grandes.

Ee X ee: 1 ee (afectado): 1 Ee (portador, orejas normales)