

Nombre _____
Grupo _____

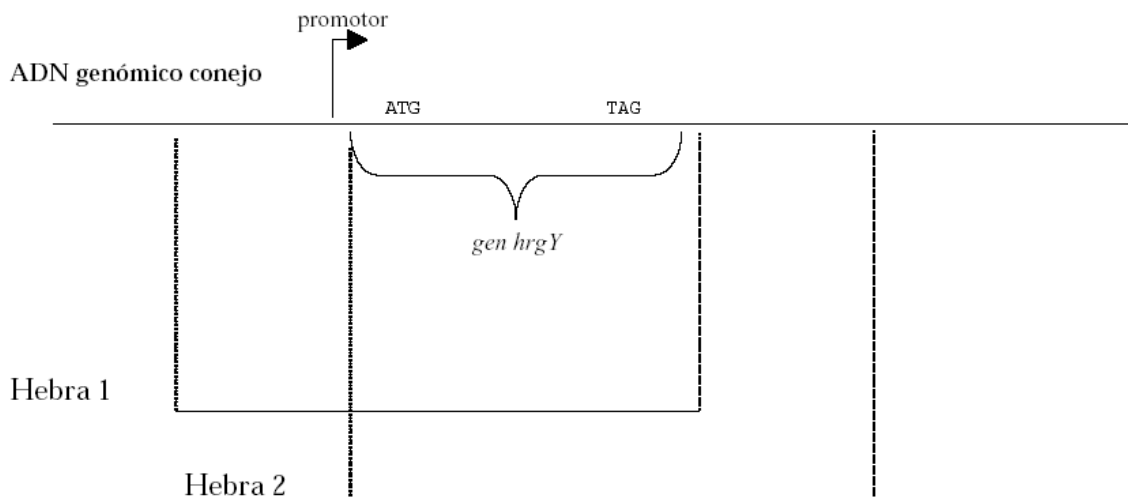
7.012 Serie de ejercicios 5

Pregunta 1

Al estudiar los problemas de esterilidad, usted intenta aislar un hipotético gen de conejo que explique la prolífica reproducción de estos animales. Después de muchos esfuerzos, consigue representar el gen del cromosoma Y en los conejos que puede ser el responsable de su gran fertilidad. Lo denomina Gen de Alta Reproducción del Cromosoma Y, cuya abreviatura será hrgY.

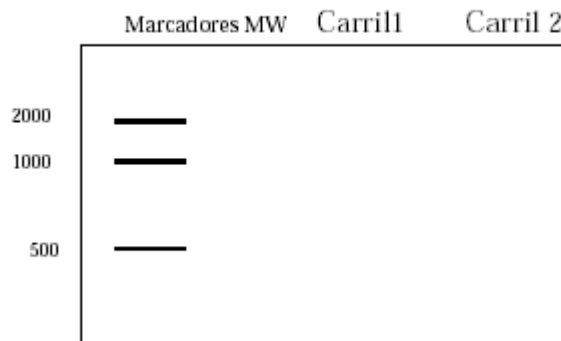
A continuación va a hacer una prueba sobre el efecto de expresar el gen hrgY del conejo en un ratón. Inyecta el fragmento lineal de ADN del gen hrgY del conejo en óvulos de ratón fertilizados en la etapa unicelular. Este ADN penetrará al azar en el genoma del ratón. Los ratones que resulten de las inyecciones realizadas con éxito tendrán el gen hrgY localizado en la misma posición en el genoma en todas las células. Este ratón sería un ratón “transgénico”.

- a) ¿Cuál de los siguientes 2 hebras de ADN genómico de ratón escogería para inyectar en un ratón? ¿ Por qué?



Ha logrado inyectar con éxito los 2.200 pares de bases de ADN hrgY de conejo en óvulos unicelulares fertilizados de ratón. De esos óvulos nacen crías de ratón. Para confirmar que esos ratones portan el gen hrgY del conejo, lleva a cabo una reacción en cadena por la polimerasa (PCR). Estas reacciones contienen una muestra de ADN genómico de cada una de las crías de ratón como molde. Utilizando los cebadores apropiados, amplifica un fragmento de 380 pares de bases dentro de un intrón del gen hrgY del conejo. El ADN amplificado se somete a una electrofóresis en gel.

b) En la columna 1 de la tabla siguiente, dibuje la banda o bandas de ADN, en caso de haberlas, que vería si se hubiera amplificado el ADN de un ratón portador del gen hrgY del conejo.



c) Después de llevar a cabo las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), encuentra un ratón portador del ADN hrgY del conejo. ¿Es esto suficiente para saber si el gen está expresado? Si no, ¿qué otras moléculas se deberían buscar y por qué?

d) Usted controla la expresión de hrgY en diferentes tipos de tejidos de ratones transgénicos y descubre que el gen sólo se expresa en un órgano del ratón, los testículos. Sin embargo, usted sabe que el gen hrgY está presente en todas las células. ¿Qué puede haber en las células de los testículos que sea el responsable de esta específica expresión histórica del gen hrgY?

Pregunta 2

Utilizando la secuencia conocida de ADN del gen hrgY, obtiene la secuencia de aminoácido de la proteína hrgY para conseguir datos sobre su función. Al considerar la polaridad, la carga y el orden posicional de los aminoácidos en hrgY, comprueba que contiene una zona transmembranal y lugares de glicosilación.

a)

- I) ¿Cuáles son las características fundamentales de una zona transmembranal? Incluya el tipo de aminoácidos que se pueden encontrar en dicha membrana.

- II) ¿Dónde se localizan las proteínas con zonas transmembranales?

- III) Nombre dos funciones de las proteínas de la membrana en una célula.

- IV) ¿Qué es la glicosilación?

- V) ¿En qué organela tiene lugar la glicosilación?

b) Si la partícula de reconocimiento de señal (SRP) estuviera ausente en una célula, podría esperarse que ...

Rodee con un círculo		
1	las proteínas transmembrana estuviesen glucosiladas?	SÍ NO
2	las proteínas transmembrana estuviesen totalmente traducidas?	SI NO
3	los genes que codifican las proteínas transmembrana fuesen transcritos?	SI NO
4	estuviesen rotas las secuencias de señal ?	SI NO
5	se exportasen las proteínas secretadas ?	SI NO

Pregunta 3

Comparando la secuencia de aminoácido de hrgY con otras proteínas conocidas, observa que la proteína comparte muchas características con otros receptores de tirosinas quinasa.

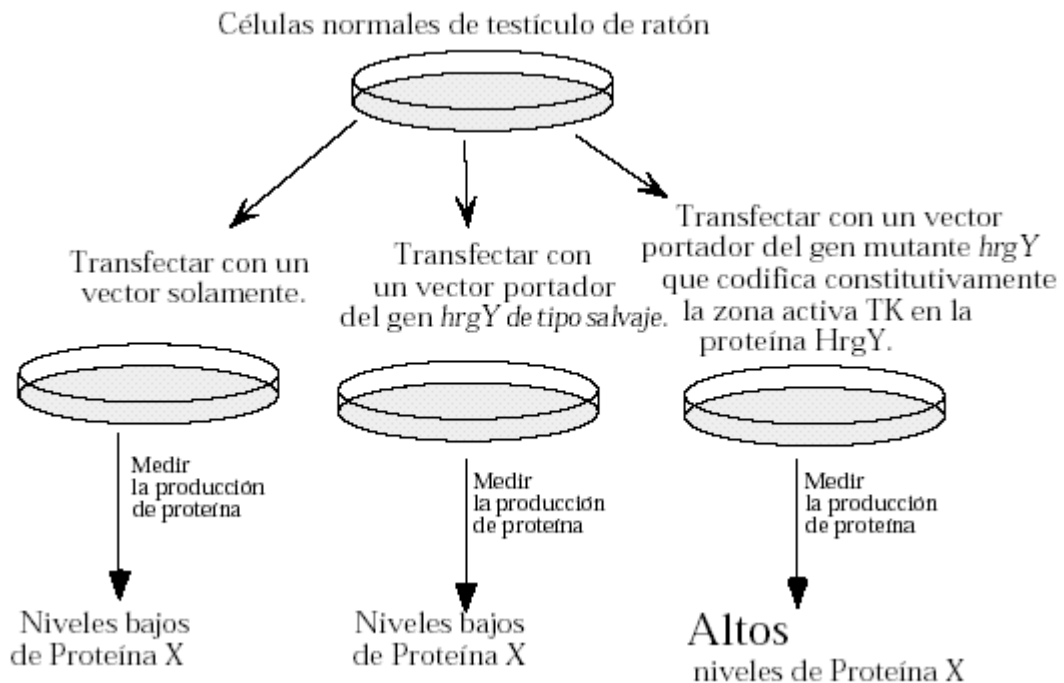
a) ¿Cuál es la función de una zona de tirosina quinasa (TK)?

b) Para determinar si la zona TK tiene importancia para la proteína hrgY, usted crea una versión mutante del gen hrgY que codifica una zona de tirosina quinasa constitutivamente activa dentro de la proteína hrgY. Las fosfatasas ya no tiene acceso a esta proteína mutante. ¿Dónde se encontrará la proteína mutante?

¿ En un estado fosforilado o no fosforilado? (Rodee con un círculo)

Para establecer qué efecto puede tener la proteína hrgY constitutivamente activa, usted clona el gen mutado hrgY en una expresión vectorial de los mamíferos (un plásmido que se reproduce en las células de los mamíferos). Usted “transfecta” (similar a la “transformación” en las bacterias) las células del testículo de un ratón normal en un cultivo de tejidos con su constructo vectorial.

A continuación, compara las células de su ratón transfectado que contienen el vector portador del gen mutado hrgY con el grupo de control de las células del ratón que fueron transfectadas sólo por el vector o el vector portador del gen hrgY de tipo salvaje. (Véase el diagrama de abajo.) Observe que las células del ratón que sintetizan la proteína mutada hrgY muestran un aumento sorprendente en los niveles de otra proteína, a la que llamaremos “proteína X”.

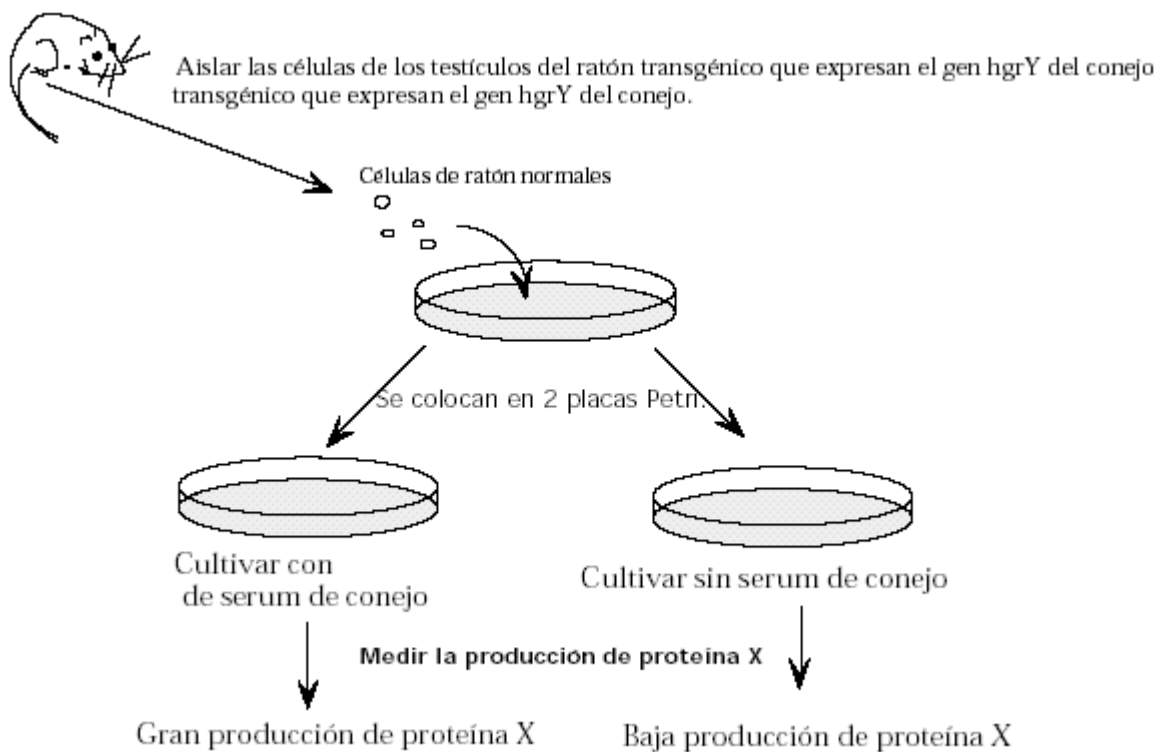


- c) Explique, en términos generales, cómo una tirosina quinasa constitutivamente activa en la membrana plasmática podría causar el aumento de la proteína X en la célula. Emplee la palabra “transcripción” en su respuesta.

Pregunta 4

Finalmente, usted determina que el gen *hrgY* introducido no tiene efecto alguno en la fertilidad del ratón. Aunque no ha sacado muchas conclusiones sobre el *hrgY* con el experimento con ratones transgénicos, decide seguir estudiándolo porque ya ha invertido un año de investigación de este gen y se resiste a comenzar un proyecto completamente nuevo.

En un medio, cultiva células que aisló de los testículos de un ratón transgénico portador del gen *hrgY* de conejo de tipo salvaje y mide la síntesis de la proteína X. En estas células la producción de proteína X es muy, muy baja. Sin embargo, al cultivar esas células en un medio complementado con serum para ratones, se observa que el nivel de expresión de la proteína X aumenta enormemente. (Véase el dibujo de abajo.) Nota: las células de los testículos de ratones normales cultivadas en serum para conejos no muestran un aumento en los niveles de proteína X. (Estos datos no se muestran aquí.)



a) ¿Cómo explicaría esto?

- b) Anteriormente ha determinado que el gen *hrgY* se expresa en los testículos del ratón. Considerando el experimento previamente descrito, ¿existe alguna razón por la que pudiera no alterarse la fertilidad del ratón?

Después de muchas investigaciones (ya está usted en su cuarto año del programa de oportunidades de investigación para universitarios), consigue purificar un componente del serum del conejo capaz de inducir la expresión de la proteína X en las células transgénicas. Usted determina que dicho componente es una proteína segregada. La denomina proteína serum secretada, es decir, SecC.

- c) ¿Tendría la proteína SecC purificada del serum una secuencia de señal agregada? ¿Por qué?
- d) ¿Cree que la proteína SecC tendrá una secuencia de señal en alguna etapa de la síntesis? Si es así, ¿cuándo?

Movido por la curiosidad de conocer el efecto de la proteína SecC en ratones transgénicos vivos con *hrgY*, usted introduce el gen que codifica la proteína SecC en el genoma de un virus. Infecta a los ratones transgénicos con dicho virus que integrará su ADN (incluido el gen *secC*) al genoma de cualquier célula de ratón que infecte.

Curiosamente, sus ratones transgénicos infectados por el virus portador del gen *secC* muestran una mayor fertilidad.

- e) ¿Deberá el virus portador del gen *secC* infectar las células de los testículos del ratón transgénico para causar este aumento de la fertilidad? Explique su respuesta.