

Nombre \_\_\_\_\_ Grupo \_\_\_\_\_

## 7.012 Serie de ejercicios 4

### 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, todas estas enzimas 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 sintetizaran incluso en presencia de triptófano?
  
  - II) ¿Qué cambio en la secuencia operadora haría que las enzimas se sintetizaran incluso en presencia de triptófano?
  
  - III) ¿Qué cambio en la proteína represora causaría la inhibición de la síntesis de las enzimas incluso en ausencia de triptófano?
  
- 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?
  
  - II) ¿Qué cambio en la proteína activadora impediría la síntesis de las enzimas, incluso en ausencia de triptófano?

III) ¿Qué cambio en la secuencia operadora impediría la síntesis de enzimas, incluso en ausencia de triptófano?

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 bacterianas con diferentes genotipos en los loci *trpR* y *trpO* arroja los siguientes resultados:

Cepa	Medios de crecimiento	Niveles ARNm de <i>trpA</i> , <i>trpB</i> <i>trpC</i> , <i>trpD</i> y <i>trpE</i>
<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 proteína producida a partir de un gen *trpR*, ¿es activadora o represora?

- 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
<b>Nivel TrpC</b>	con triptófano	-	-	-	-	-	+
	Sin triptófano	+	-	+	+	-	+
<b>Nivel TrpD</b>	con triptófano	-	-	-	-	-	+
	Sin triptófano	+	+	-	+	-	+
<b>Nivel TrpE</b>	con triptófano	-	-	-	-	-	+
	Sin triptófano	+	+	+	+	-	+
<b>Nivel AroH</b>	con triptófano	-	-	-	-	-	+
	Sin triptófano	+	+	+	-	+	+

- I) Enumere todos los mutantes cuyas mutaciones afectan a la producción de cualquier TrpC funcional.
- II) Enumere todos los mutantes cuyas mutaciones afectan a la producción de cualquier TrpD funcional.
- III) Enumere todos los mutantes cuyas mutaciones afectan a la producción de cualquier AroH funcional.

### Pregunta 1 (continuación)

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

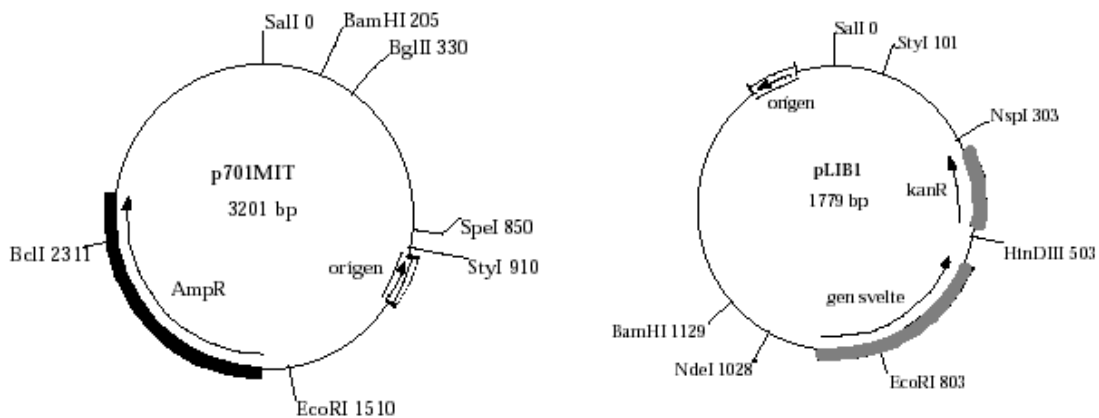
## Pregunta 2

Trabajando con ratones dentro del programa de oportunidades de investigación para universitarios descubre una enzima catabólica muy importante. Usted realiza mutaciones en el gen codificador de esa enzima de forma que la enzima mutante esté siempre activa. Los ratones portadores de dicho gen 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 bacterias. Incluya los términos: ADN genómico, enzima de restricción, plásmido, ligación, transformación, placas de Petri, sonda e hibridar.

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 *esbelto*. Ahora, desea expresar muchas enzimas humanas para poder completar un estudio bioquímico de la proteína. Para ello, debe convertir el gen *esbelto* 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 únicos sitios 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?

II) ¿Qué enzima o enzimas utilizaría para cortar *plib1*? ¿Qué tamaño tendrían los fragmentos obtenidos?

c) Después de la ligación, transforma su nuevo vector *p701MIT*, que contiene el gen *esbelto* y el gen resistente 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

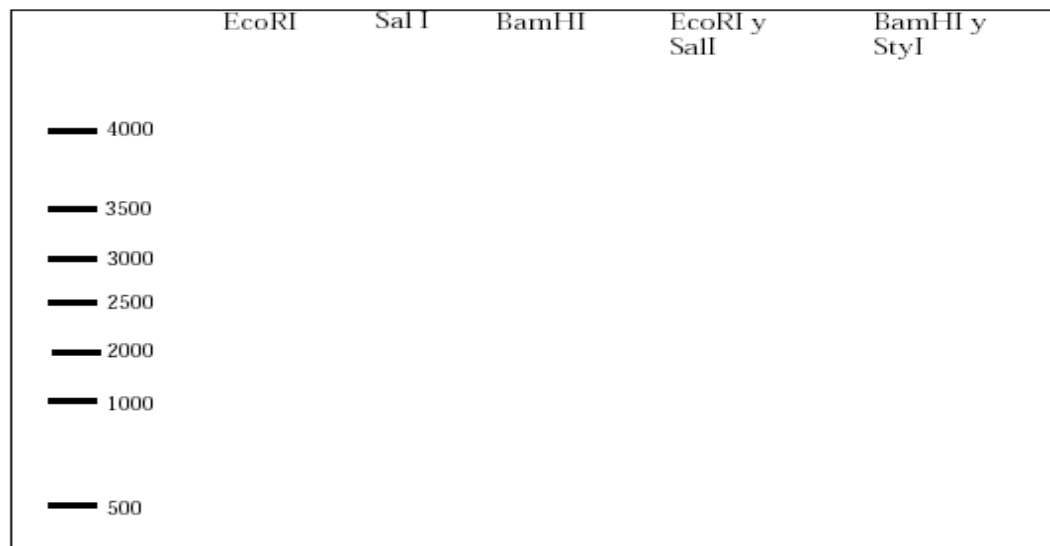
Sensible a la ampicilina  
Sensible a la kanamicina

II) ¿Cómo detectaría las células que poseen un vector que contiene a su vez el gen *esbelto*?

III) ¿Qué ventaja hay al incluir el gen *kan R* en el fragmento que clonó en un *p701MIT*?

### Pregunta 3

a) Aísle las células que se comportan según lo previsto. Del mismo modo, aísle el vector contenido en dichas células. Para confirmar que ese vector es el *p701MIT* que contiene el gen *esbelto*, usted lleva a cabo una serie de restricciones de digestión. 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.



Ahora que ha conseguido clonar la versión humana del gen *esbelto* y puede expresar la proteína, la revista *Science* y varias empresas de biotecnología están llamando a su puerta insistentemente. ¡Podría hacerse de oro antes de licenciarse en la MIT! Sin embargo, un licenciado escéptico y resentido le explica que siempre es una buena idea secuenciar genes recién clonados para asegurarse de que tiene lo que cree que tiene. Así que usted decide secuenciar el gen *esbelto*.

b) En el siguiente fragmento de ADN de una sola hebra, obtenga la secuencia en base 10 cebador que se podría usar para secuenciar el fragmento. Marque los extremos 5' y 3' del cebador. Este cebador debe hibridar las primeras 10 bases por un extremo y alargarse en la reacción de secuenciación.

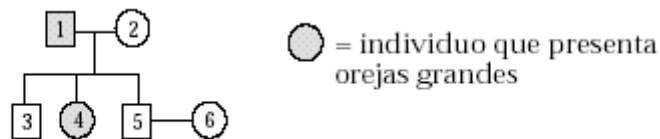
5' ATGCTGGGCGTAAAGGCCCGCTACTGATACTC 3'

cebador:

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

#### 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 causa las orejas grandes. A continuación se muestra la región que rodea el gen regulador del tamaño de las orejas.

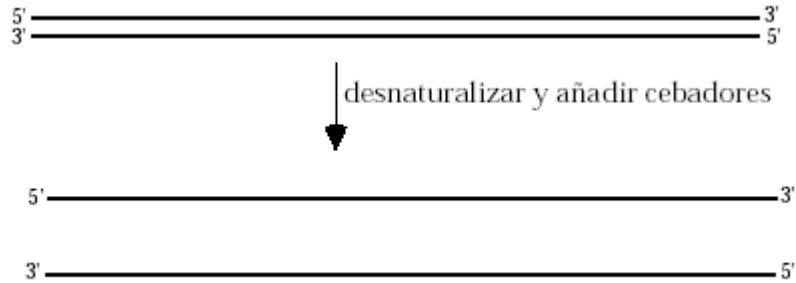
5' GTCCTGATTTAAAGGC **Gen que determina el tamaño de la oreja** GGGTCTAATGCCTAGTAGGTCCAAT3'  
 3' CAGGACTAAATTTCCG **Gen que determina el tamaño de la oreja** CCCAGATTACGGATCATCCAGGTTA5'

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. Marque los extremos 5' y 3'.

cebador A:

cebador B:

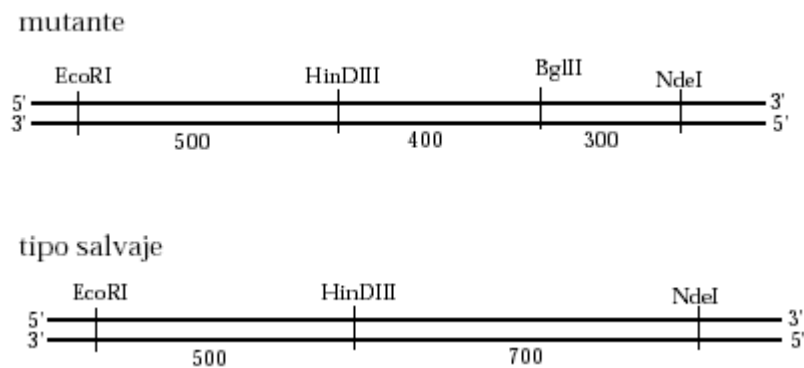
b) A continuación encontrará un esquema de la misma región. Dibuje en el diagrama de debajo dónde debería unirse cada cebador.



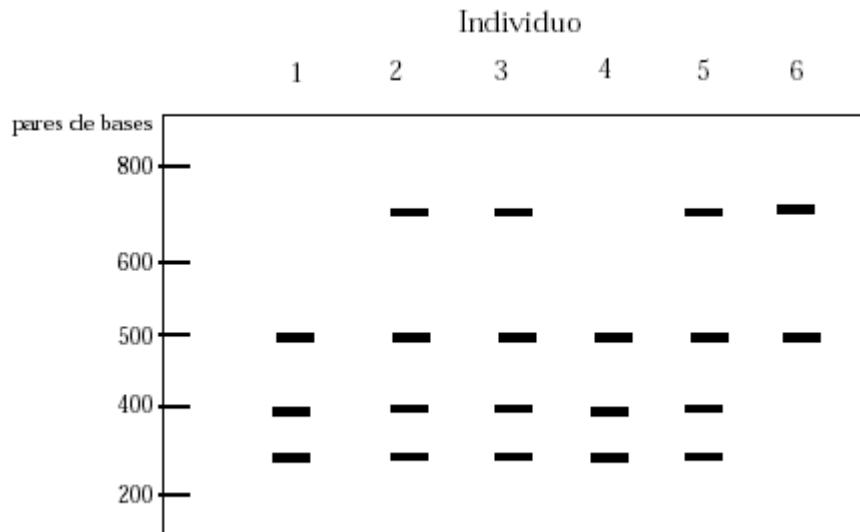
c) En un esquema como el anterior (b), dibuje las hebras de ADN que estarían presentes después de 2 series de reacción en cadena de la polimerasa. Incluya los cebadores en cada hebra donde sea necesario.

#### Pregunta 4

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



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?

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.