

Nombre _____
Grupo _____

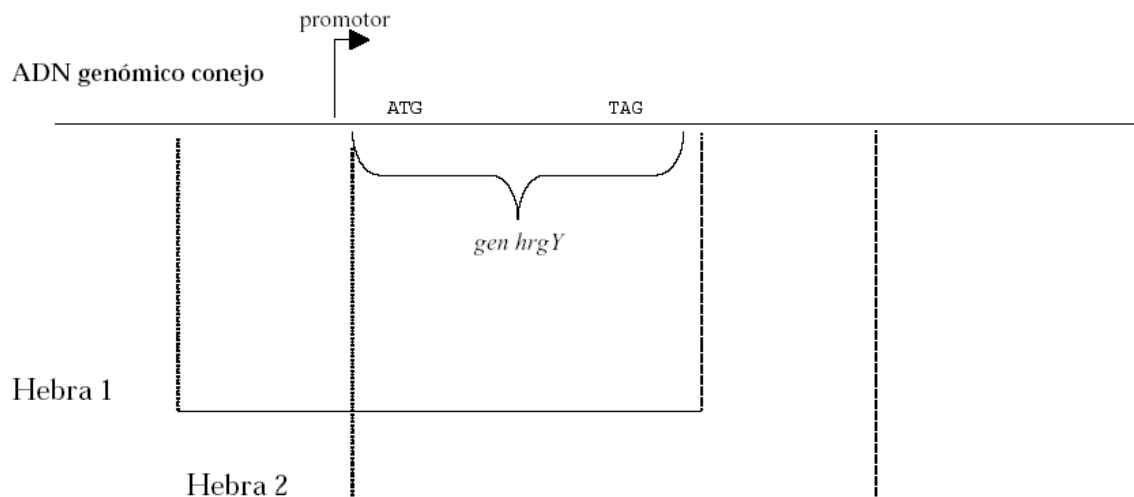
Soluciones de la serie de ejercicios 57.012

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 fragmentos de ADN genómico de ratón escogería para inyectar en un ratón? ¿Por qué?

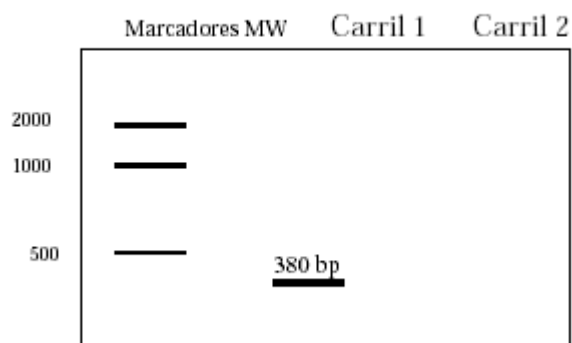


La hebra 1 incluye un promotor adyacente con otros sitios potenciales reguladores que pueden reconocerse en el sistema

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 por la polimerasa (PCR), encuentra un ratón portador del DNA *hrgY* del conejo. ¿Es esto suficiente para saber si el gen está expresado? Si no, ¿qué otras moléculas se deberían buscar y por qué?

No. La sola presencia de ADN no asegura que el gen sea transcrito o traducido. Para medir la expresión del gen, debe buscar el ARNm o la proteína codificada por el gen.

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*?

*Un activador transcripcional que reconoce el promotor *hrgY* que está presente sólo en las células de los testículos.*

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? Incluye el tipo de aminoácidos que se pueden encontrar en dicha membrana.
Las zonas transmembranales están compuestas aproximadamente por 30 aminoácidos hidrofóbicos contiguos, que a menudo forman una estructura secundaria en alfa hélica a través de la membrana. En las proteínas transmembranales que forman canales y por tanto tiene múltiples segmentos de membrana, es frecuente que la zona del alfa hélica que da al canal (o poro hidrofóbico) tenga residuos hidrofílicos mientras que la zona que da a los lípidos en la membrana de doble capa esté compuesta por residuos hidrofóbicos. Esta doble naturaleza del alfa hélica se denomina “anfipática”.
- II) ¿Dónde se localizan las proteínas con zonas transmembranales?
En las membranas: nucleares, plasmáticas, retículo endoplasmático, de Golgi, mitocondrias, etc
- III) Nombre dos formas en que las proteínas de la membrana funcionan en una célula.
Proteínas estructurales, poros, canales de ión, receptores.
- IV) ¿Qué es la glicosilación?
Adicción de residuo de azúcar.
- V) ¿En qué organela tiene lugar la glicosilación?
En el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi.

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?	SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
---	--	----	--

2	las proteínas transmembrana estuviese totalmente traducidas?	<input checked="" type="checkbox"/> SI	NO
---	--	--	----

3	los genes que codifican las proteínas transmembrana fuesen transcritos?	<input type="checkbox"/>	NO
---	---	--------------------------	----

4	estuviesen rotas las secuencias de señal ?	SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
---	--	----	--

5	se exportasen las proteínas secretadas ?	SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
---	--	----	--

Pregunta 3

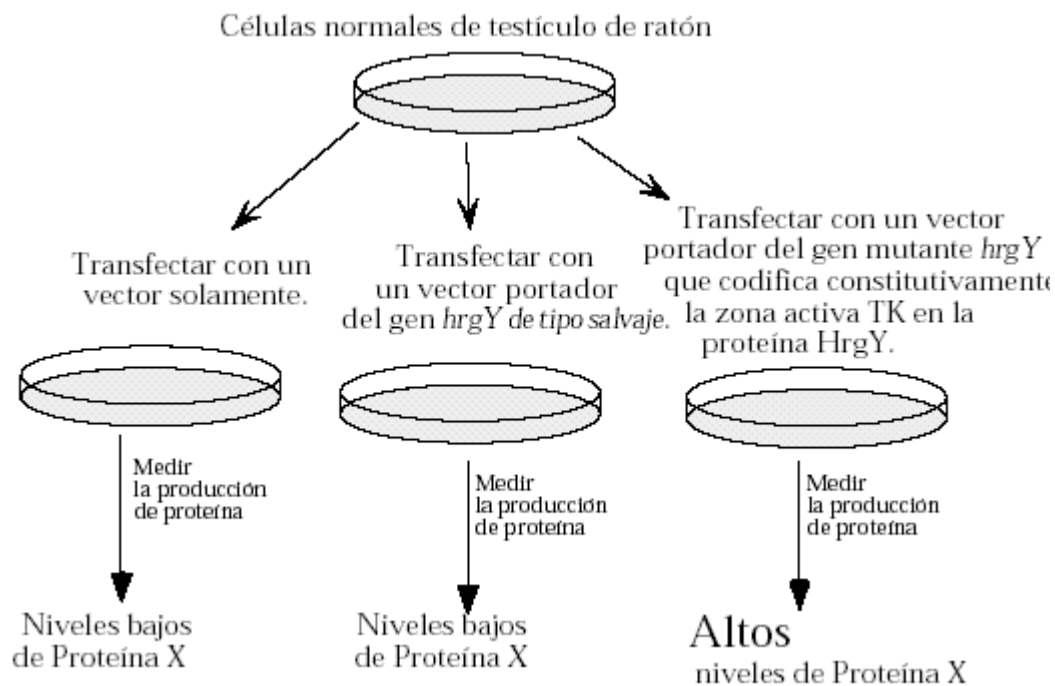
Comparando la secuencia de aminoácido de hrgY con otras proteínas conocidas, observa que la proteína comparte muchas características con otros receptores de tirosinas quinasas.

- a) ¿Cuál es la función de una zona de tirosina quinasa (TK)?
Fosforilar las cadenas laterales del aminoácido tirosina en las proteínas utilizando el fosfato γ del ATP.
- 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 mutante *hrgY* con el grupo de control de las células del ratón que fueron transfectadas por un solo 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 mutante *hrgY* muestran un aumento sorprendente en los niveles de otra proteína, a la que llamaremos “proteína X”.



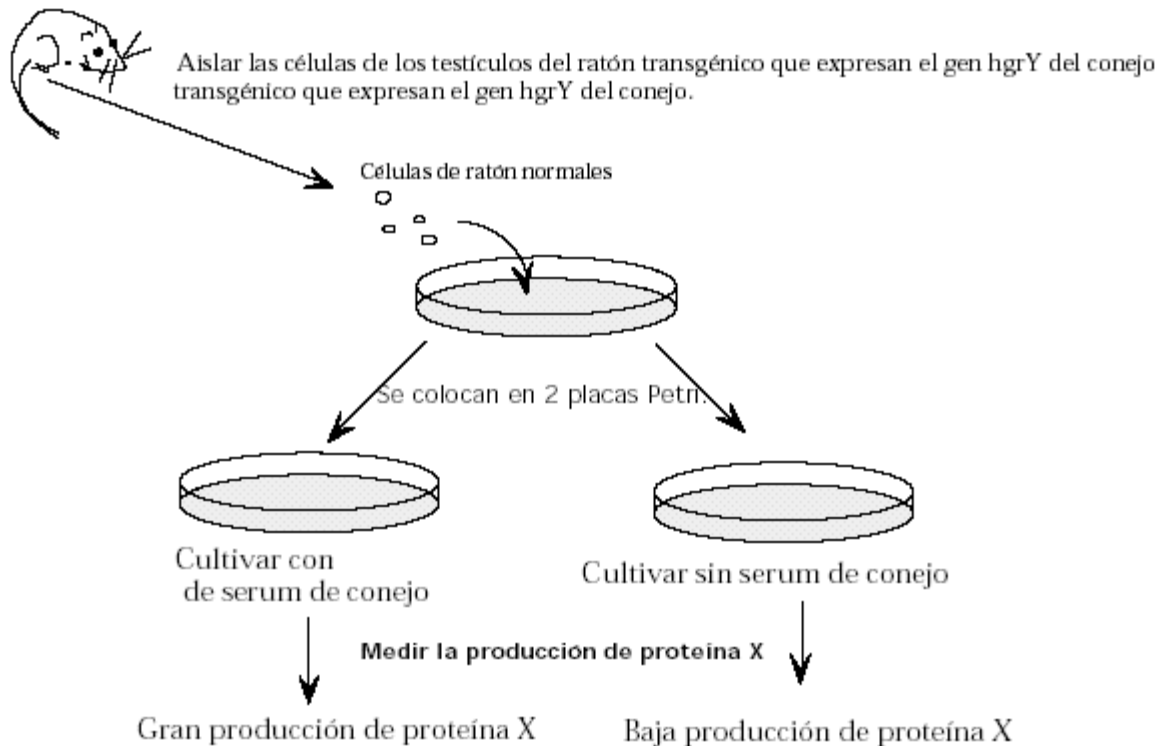
- c) Explique, en términos generales, cómo una tirosina quinasa constitutivamente activa en la membrana plasmática podría causar el aumento de la proteína X en la célula. Emplee la palabra “transcripción” en su respuesta.

El receptor de la membrana activado señala una cascada de proteínas en dirección 3'. Puede fosforilar otras proteínas o interactuar a través de otros mensajeros. El resultado final es que una de estas proteínas modificadas penetra en el núcleo y activa directamente la transcripción o bien activa otros factores de transcripción para que se conviertan en genes.

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.)



¿Cómo explicaría esto?

*Algo en el serum del ratón interactúa con la proteína *hrgY* expresada. El resultado son altos niveles de proteína X.*

- a) 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

Por sí solo, el HrgY no tiene ningún efecto. Quizá su ligando esté presente en el serum del conejo y por tanto sólo se activa en presencia de dicho ligando.

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.

- b) ¿Tendría la proteína SecC purificada del serum una secuencia de señal agregada? ¿Por qué?

No. Si ha sido secretada en el serum, su secuencia de señal habrá sido cortada.

- c) ¿Cree que la proteína SecC tendrá una secuencia de señal en alguna etapa de la síntesis? Si es así, ¿cuándo?

Sí, durante la traducción inicial. La péptida naciente tendrá una secuencia de señal reconocida por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) que llevará este complejo de ribosoma / mensaje / péptida naciente a la proteína de unión al SRP en la membrana RER. En este punto, la traducción de la membrana continúa y la SecC se trasloca a través de la membrana RER.

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.

- d) ¿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.

No. Si la SecC es una proteína secretada, será secretada de cualquier célula en la que esté expresada y se moverá por la linfa o serum hasta que llegue a su receptor, HrgY en los testículos. (los pares receptor / ligando son muy específicos)