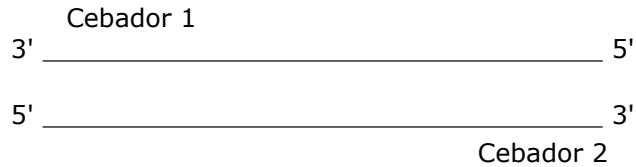


1. Se dispone de un molde o plantilla de ADN bicatenario lineal de 2000 bases, del que se quiere amplificar una región de 1000 bases mediante el uso de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además del molde, se añaden los oligonucleótidos o "cebadores" adecuados (véase el siguiente diagrama), una ADN polimerasa termorresistente (Taq) y el resto de los componentes necesarios para la reacción.



Se prepara la máquina para el siguiente ciclo:

- 1) 92 °C durante 30 seg. (desnaturalización).
- 2) 56 °C durante 30 seg. (alineamiento o fijado del cebador al molde).
- 3) 72 °C durante 30 seg. (elongación).

Para completar la reacción PCR, esta secuencia de variaciones de temperatura se repite 20 veces.

a) A la enzima Taq polimerasa le lleva 1 segundo encontrar un cebador unido a un molde monocatenario, pero tarda tan sólo 1 milisegundo en añadir una base. Si esta enzima tiene una procesividad de 10-20 pares de bases (pb), ¿será capaz de sintetizar suficiente ADN para que se produzca una reacción PCR productiva en el tiempo establecido (paso 3 = 30 seg.)? Y, ¿qué sucedería si la Taq polimerasa tuviera una procesividad de 100 pb?

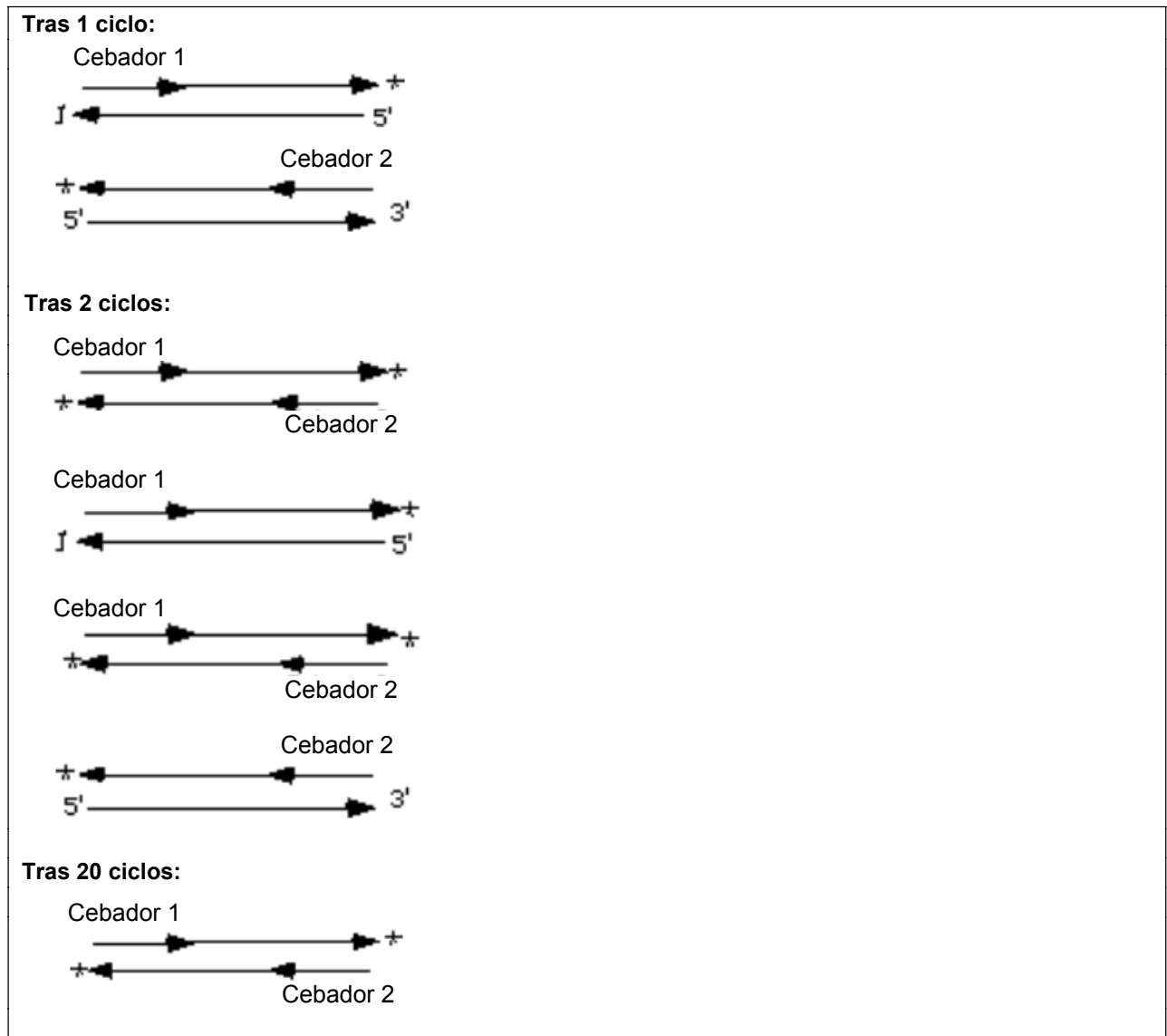
Si la Taq polimerasa tuviera una procesividad de 10-20 pb, se desprendería del molde cada 10-20 bases y tardaría alrededor de 1 segundo en encontrar otra vez la unión del cebador al molde. Utilicemos una procesividad de 20 pb. El molde tiene 1000 pb de largo. $1000/20=50$. De este modo, sería necesario que se produjeran aproximadamente 50 uniones, que tardarían unos 50 segundos, más el segundo necesario para sintetizar 1000 bases. Si la Taq tiene una procesividad de 10-20 pb, los 30 segundos establecidos para la elongación (paso 3) no son suficientes para sintetizar una nueva cadena de ADN.

Si la Taq polimerasa tuviera una procesividad de 100 pb: $1000/100=10$. Según el promedio, la enzima Taq sólo tendría que encontrar la unión del cebador al molde 10 veces, lo que supondría 10 segundos, más el segundo necesario para añadir las 1000 bases; en total, 11 segundos. En este caso, los 30 segundos dados son suficientes para que se produzca una reacción PCR productiva.

b) ¿Es necesario añadir una helicasa a la mezcla de reacción? ¿Hace falta una topoisomerasa? ¿Por qué?

No es necesario añadir una helicasa, puesto que el ADN se desnatura (se separa en dos cadenas simples) al calentarlo a 92 °C (paso 1). Tampoco es necesaria una topoisomerasa, ya que el molde es lineal y, por tanto, no puede acumular torsiones en la cadena.

c) Una vez completado un ciclo (pasos 1-3), realizar un diagrama de las cadenas de ADN presentes en el tubo de la reacción. Indicar en dónde se encuentran los cebadores 1 y 2. Dibujar los productos después de dos ciclos y, una vez más, indicar la localización de los cebadores. ¿Qué aspecto tendrán la mayoría de los productos tras 20 ciclos? Dibujar un diagrama de un ejemplo representativo.

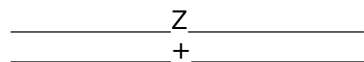


d) ¿Qué habría sucedido si se hubieran añadido nucleótidos radiomarcados al comienzo de la reacción PCR? Revisar los diagramas anteriores e indicar con un asterisco las cadenas de ADN que habrían incorporado nucleótidos radiomarcados.

Véase el diagrama anterior.

2. Se monta todo lo necesario para llevar a cabo el experimento *in vivo* de la reparación de mal apareamiento dirigida por metilo que fue descrito en clase utilizando un heterodúplex del ADN del fago lambda.

a) Dibujar los productos que se espera obtener de cada una de las cepas tras un solo ciclo de replicación de ADN de un heterodúplex del ADN del lambda si la cadena mutante (Z) está metilada y la cadena salvaje (+) no. Obsérvese que *dam* codifica la enzima que realiza la metilación de la A de una secuencia GATC de E. Coli.



E. coli salvaje

(reparación basada en la cadena metilada)

_____ Z _____
 _____ Z _____

E. coli mutS⁻(sin reparación, sólo replicación. Los dos tipos de fagos liberados forman una única célula de *E. coli*)

_____ Z _____
 _____ Z _____

y

_____ + _____
 _____ + _____

E. coli dam⁻

(como la salvaje, puesto que se añade ADN metilado)

_____ Z _____
 _____ Z _____

b) ¿Cambiaría la respuesta del apartado a) si ninguna de las cadenas estuviese metilada? En caso afirmativo, explicar en qué cambiaría.

(Si ninguna de las cadenas estuviera metilada, la reparación sería aleatoria. Cada célula de *E. Coli* liberaría O BIEN fagos mutantes O BIEN fagos salvajes, pero no los dos)

_____ Z _____
 _____ Z _____

O

_____ + _____
 _____ + _____

c) ¿Cómo afectarían las siguientes mutaciones a la velocidad de mutación de *E. coli*? Explicar.Mutación que anula el gen *dam*.

La reparación será aleatoria; de este modo, la velocidad de mutación aumentará, debido a que la célula no tiene ningún modo de hacer un seguimiento para saber cuál es la cadena recién replicada.

Sobreexpresión de *dam*

No habrá reparación y la velocidad de mutación aumentará.

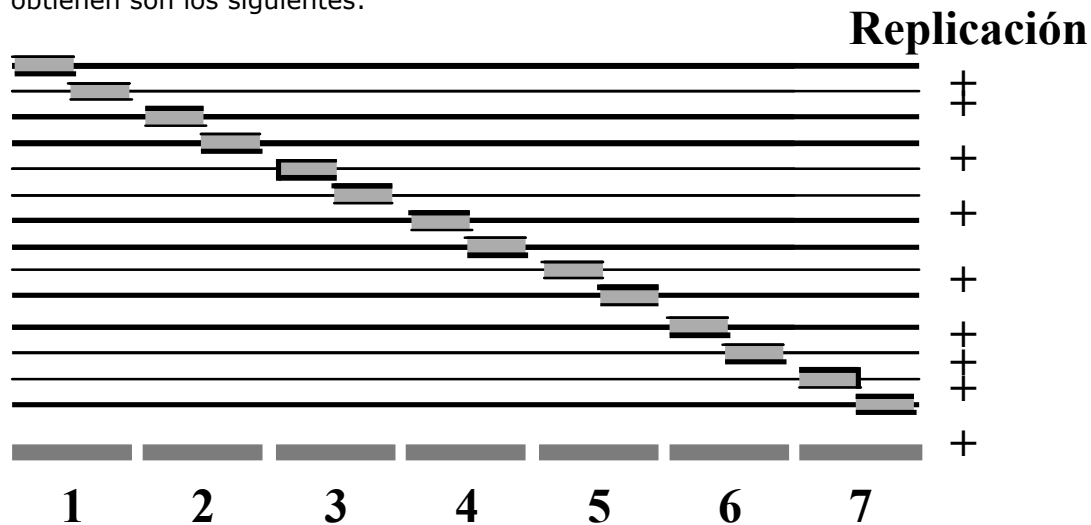
3. Se está llevando a cabo el mapeo de los replicadores del cromosoma 13 de la levadura. Para ello, se ha obtenido un conjunto de 220 plásmidos de levadura con insertos que cubren la totalidad del cromosoma 13.

a) ¿Cómo se podrían determinar los fragmentos que contienen orígenes de replicación? Describir los atributos del esqueleto del plásmido que serían necesarios para determinarlos (se recomienda realizar un diagrama).

Esto fue pregunta de examen; puntuaba del modo siguiente:

3 Pts.: Diagrama del vector y mención de 3 de éstos 4 elementos:
centrómero, inserto, no es origen de replicación y marcador seleccionable.
1 Pt.: Transformar cepas de levadura mediante plásmidos.
1 Pt.: Seleccionar un marcador con los medios adecuados.

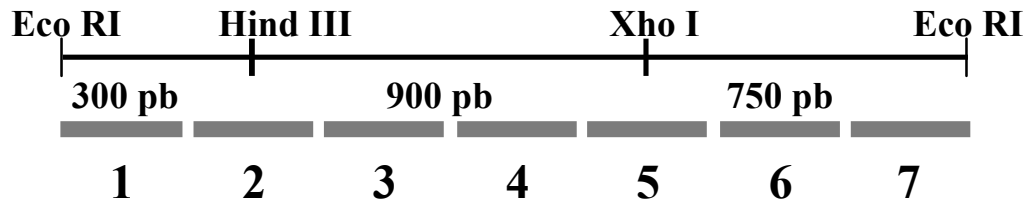
b) Se identifican 12 plásmidos de los que se cree contienen replicadores. Mediante un análisis de delección de cada inserto, se determina que la mayoría de ellos se pueden estrechar y reducir a una región de menos de 200 pb sin que por ello pierdan su función de replicación. La excepción es el clon 728, que requiere más de 2000 pb para funcionar en el ensayo. Ante la intriga producida por esta atípica estructura, se construyen, en esta región, una serie de mutaciones de sustitución y se analizan en el ensayo de replicación. Los resultados que se obtienen son los siguientes:



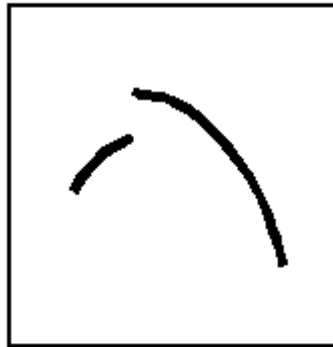
Según los datos obtenidos, ¿qué regiones son necesarias y cuáles bastan para la función de replicación?

3 Pts.: las regiones 2, 4 y 6 son todas necesarias para la función de replicación.
2 Pts.: las regiones 1-7 son las únicas que se ha demostrado que son suficientes según este experimento.
-1 Pt.: las regiones 2, 4 y 6 son suficientes. Eso no se ha demostrado en este experimento. Para ello, habría que demostrar que se pueden cambiar todas las secuencias que intervienen y dejar las regiones 2, 4 y 6.

c) Se quiere identificar el origen de replicación del clon 728. El análisis de restricción digiere la región y determina el mapa que se muestra a continuación:



Se prueba la función del origen mediante un ensayo de gel bidimensional. En el primer experimento, se digiere con Eco RI el ADN de células de levadura en activo crecimiento. La sonda para la transferencia Southern es un fragmento de ADN radiomarcado de HindIII a XhoI. Se obtiene el siguiente resultado (es un autoradiograma):



¿Qué conclusiones se pueden extraer acerca de la localización del origen de replicación en función de estos datos y de los obtenidos en los apartados 3a y 3b?

- | | |
|----------------|--|
| 3 Pts.: | El fragmento RI a RI tiene un origen. |
| 3 Pts.: | El origen de la replicación se encuentra ubicado fuera del centro. |
| 4 Pts.: | El origen se encuentra en cualquiera de las regiones 2 ó 6. Los datos son ambiguos con respecto a esto. |

d) Un colega señala que el experimento realizado no demuestra de forma definitiva dónde se encuentra el origen de replicación. ¿Qué otro análisis de gel bidimensional se podría realizar para averiguar sin lugar a duda la ubicación del origen de replicación? Describir, para cada uno de los experimentos, la digestión de restricción del ADN de levadura utilizado, el fragmento de ADN que se ha radiomarcado para utilizar como sonda y el patrón que se espera para cada uno de los posibles sitios de origen.

- | | |
|--|---|
| Ensayo en el que el origen se encuentra en la región 2: | |
| (2 Pts.) | Cortar el ADN con Xho I y RI. |
| (1 Pt.) | Sondar con HindIII y Xho I. |
| (2 Pts.) | Explicación de la respuesta/diseño del autoradiograma. |

Experimento en el que el origen se encuentra en la región 6:

(2 Pts.) Cortar el ADN con Xho I y RI.

(1 Pt.) Sondar con HIII y Xho I.

(2 Pts.) Explicación de la respuesta/diseño del autoradiograma.

Hay otras posibilidades de digestión y de sonda; todas ellas se han puntuado de forma similar.

En las partes C y D muchos alumnos no estaban seguros de si el patrón lo determinaba la digestión o la sonda. Es la digestión la que determina siempre el patrón observado. La sonda tan sólo ha de estar dentro de la región de la digestión adecuada.

4) Se está realizando un estudio del mecanismo de replicación del ADN en el patógeno *T. Assistantus*, recientemente identificado. Se pretenden encontrar las proteínas que participan específicamente en la replicación del ADN del patógeno, con el fin de utilizarlas en las pruebas de fármacos. Finalmente, se decide que las candidatas más probables a proteínas divergentes son las encargadas de iniciar la replicación en el origen *T. assistantus*, ya identificado. Para ello, se sigue un enfoque bioquímico, fraccionando extractos de células y buscando fracciones de proteínas que se puedan unir al origen.

4a) ¿Qué experimento se podría utilizar para comprobar rápidamente si las fracciones contienen o no proteínas que se unen a una secuencia que contiene el ADN origen? Describir el experimento y los resultados esperados para una fracción de proteína que se une al ADN y para otra que no.

Ensayo de retardo en gel (*gel shift*).

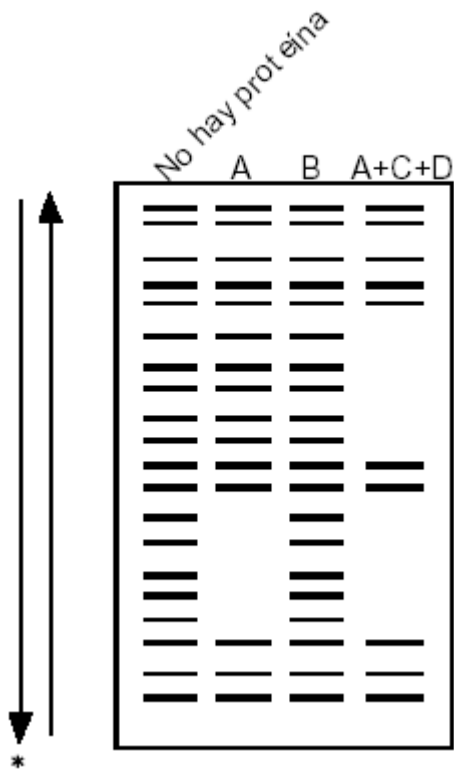
Para que se considerara completa, la respuesta debía incluir la siguiente información:

- Sonda marcada correspondiente al origen.
- Fracciones de proteína.
- Introducir los productos en un gel no desnaturizante y exponerlos en la película.

Explicación/descripción de los resultados (redactada o con esquemas):

La movilidad de la sonda marcada se debería alterar en función de la incubación de la sonda con las fracciones de proteína que contienen proteínas de unión al origen. El ADN no marcado debería competir por la proteína; el resultado de esto es la eliminación del cambio de movilidad. Puesto que se desconoce la estructura del origen, no se puede competir por la señal específicamente.

4b) Se encuentran múltiples fracciones que se unen al ADN del origen y se decide utilizar la técnica de "footprinting" con DNAsaI para averiguar a qué lugar del origen se unen las proteínas. A continuación, se muestran los resultados:



4b i) Indicar en la molécula de ADN dónde está marcada (al final o en su totalidad; y en qué cadena).

Ver el diagrama. El ADN ha de estar marcado al final y sólo en una cadena. Para coincidir con el gel mostrado, debe estar marcado al final del 3' de la cadena izquierda, como se puede ver en el diagrama, o al final del 5' de la cadena derecha.

4b ii) La fracción B se unía al ADN en el primer experimento, pero en él no se utilizaba la técnica "footprinting". Suponiendo que las proteínas de esta fracción se pueden unir con fuerza al ADN, ¿qué diferencia entre los dos experimentos puede explicar esto?

Puesto los ensayos de retardo en gel (*gel shift*) pueden detectar las uniones de proteínas que se producen donde sólo el 10% del ADN está enlazado, mientras que el "footprinting" detecta únicamente las uniones muy específicas donde está enlazado el 90% del ADN, una posibilidad sería que las proteínas de la fracción B presentaran una unión débil. Sin embargo, la pregunta afirma que se trata de uniones sólidas. Por tanto, deben estar unidas de forma no específica a diferentes sitios en cada trozo de ADN.

Se decide que la fracción B podría contener histonas. ¿Qué experimento se podría utilizar para comprobarlo?

Digerir ADN no marcado con MnasA y observar la tinción de EtBr en una escala de 160 pb. Obsérvese que simplemente digerir la sonda marcada en el final con MnasA en lugar de con DNAsA y mirar la radiografía no funcionaría, ya que la información anterior indica que no están unidos de forma específica a un sitio.

En caso de pensar que pudiera haber otras proteínas de interés en esta fracción, ¿qué tipo de columna se podría utilizar para separar los histones de las otras proteínas?

Dado que los histones poseen una carga extremadamente positiva, se podría emplear una columna cargada. Si se eligiera, por ejemplo, una columna con carga positiva, los histones deberían salir sin problemas del flujo (sin pegarse en absoluto a la columna).

4c) A continuación, se quiere saber si alguna de las proteínas que se han fraccionado está desenrollando la región rica en AT del ADN origen al unirse a éste.

4ci) ¿Qué ensayo se podría utilizar? (Obsérvese que un ensayo de helicasa no detectaría las partes desenrolladas). Describir el experimento y los resultados esperados tanto si el ADN ha sido desenrollado como si no.

Experimento para comprobar si el ADN ha sido desenrollado. Similar a la técnica de "footprinting", pero utilizando una enzima que corte el ssDNA, como la nucleasa P1. Así, incubar la misma sonda marcada al final en la cadena utilizada para el "footprinting" con las fracciones de proteínas, tratarla con nucleasa P1, someterla a un gel desnaturizante y exponer el gel seco en la radiografía. Si el ADN está desenrollado (cadena simple), se cortará en esa región; de lo contrario, permanecerá sobre el gel como una gran banda.

4cii) Se realiza el experimento y se descubre que cuando se añaden las fracciones A, C y D, el ADN se desenrolla en una cadena, pero no en la otra. ¿Cómo es posible esto?

Puede que una cadena del ADN desenrollado esté protegida de la nucleasa por una proteína enlazada a ella (esto no resulta sorprendente, puesto que cuando todas estas fracciones fueron sometidas al "footprinting" de la DNAsal mencionada anteriormente, se vió una huella sobre esta región).

4d) Con el fin de entender cuáles de estas fracciones de proteínas purificadas son necesarias para formar el complejo de orden elevado en el origen del que se ven pruebas mediante el "footprinting" de la DNAsaI, se llevan a cabo experimentos de filtración en gel con un plásmido que contiene el origen y las fracciones de proteína A, C y D. Dibuja un diagrama de los siguientes resultados: A se une al origen independientemente de qué otras proteínas estén presentes; C se une si están presentes A y D; y D nunca se une. La primera que se ve es la curva que representa las fracciones en las que el ADN solo elude las uniones:

ADN solo:



Se marca la proteína A:



Se marca la proteína C:



Se marca la proteína D:

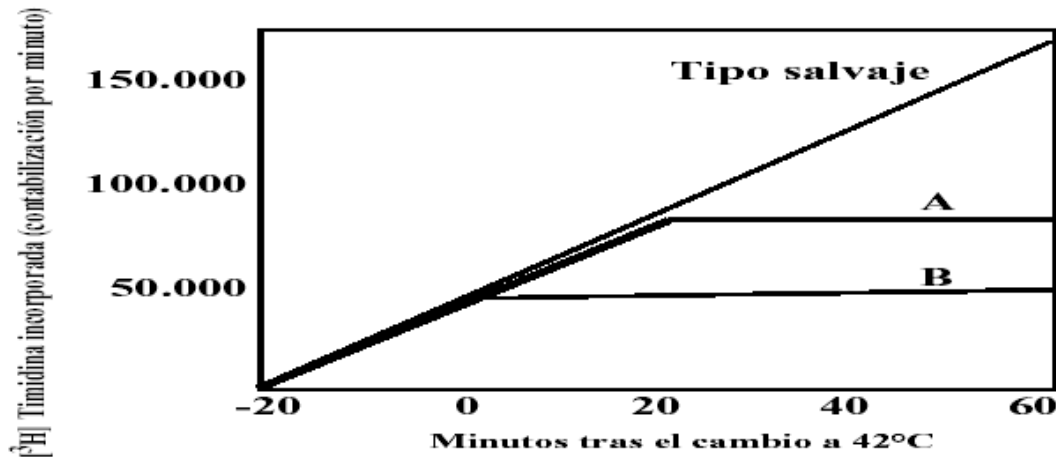


e) Ante la intriga producida por el hecho de que la proteína D parece importante y, sin embargo, nunca se asocia con el complejo, se realiza una valoración de las cantidades de proteína D y se averigua que dicha proteína actúa incluso cuando se añade en una proporción de 1/1000 la concentración de las otras proteínas presentes en la reacción. ¿Qué puede estar haciendo la proteína D?

Una posibilidad es que las cantidades catalíticas de proteína D lleven a la proteína C hacia el origen, quizá produciendo un cambio en la conformación de la proteína C.

5. Se está realizando un estudio de la helicasa dnaB de *E. coli* con el fin de definir las regiones de esta proteína que intervienen en sus interacciones con otros factores de replicación. Con este fin, se aíslan múltiples mutaciones de la proteína dnaB sensibles a la temperatura. Para empezar a clasificar los distintos mutantes de dnaB, se determina la incorporación de [³H]

timidina en células que contienen cada uno de los mutantes. Se identifican dos tipos de mutantes. A continuación, se muestran los resultados del experimento:



a) Sorprendentemente, se comprueba que se han aislado tanto las mutaciones de parada rápida como las de parada lenta de la proteína dnaB. ¿Qué aspecto de la función de dnaB de la replicación de ADN en *E. coli* podría ser defectuosa en los mutantes de tipo A? Explicar brevemente en términos moleculares el motivo por el cual un defecto en esta función produciría un fenotipo de parada lenta.

Los mutantes de tipo "A" de dnaB no pueden interactuar adecuadamente con dnaC, la chaperona helicasa. Una vez que se produce el cambio de temperatura, la replicación en curso no se verá afectada. No se producirá una nueva iniciación de la replicación sin que dnaC reúna y cargue la proteína dnaB en el origen. Esto da lugar a un fenotipo de parada lenta.

b) Con el fin de observar con mayor detenimiento la función de las proteínas mutantes de la clase B se purifican varias de las proteínas dnaB mutantes. Se realiza un análisis de su actividad helicasa y se averigua que los mutantes **B1 y B2 presentan una actividad helicasa normal, mientras que el mutante B3 no presenta actividad helicasa**. Dichas proteínas mutantes se someten también a un ensayo de replicación del ADN reconstituido dependiente de oriC y se analiza la incorporación de [³H] timidina. **Todos los ensayos se realizan a 42°C (la temperatura no permisiva)**. Se obtienen los siguientes resultados:



¿Qué actividades de dnaB se puede sospechar que estarán incompletas en las actividades de B1 y B2? Explicar el razonamiento seguido en cada caso.

Los mutantes “B1” de dnaB no pueden interactuar con la subunidad τ de la holoenzima Pol III y no son estimulados a un índice elevado de actividad helicasa. Esto ralentiza considerablemente el movimiento de la horquilla de replicación y la velocidad de polimerización del ADN en el sistema reconstituido *in vitro*, y da lugar a un fenotipo de parada rápida *in vivo*.

Los mutantes “B2” de dnaB han perdido por completo la interacción con dnaG (primasa). Sin que se reúna primasa en el origen, no puede haber polimerización en el ensayo de replicación *in vitro*. Hay un fenotipo de parada rápida *in vivo* porque la cadena retrasada requiere continuamente una actividad primasa.

OBSÉRVESE: Los mutantes “B1” no pueden presentar una afinidad “reducida” por la primasa, debido a que (como se explicó en clase) estas mutaciones no tienen ningún efecto sobre la velocidad de replicación *in vivo*, salvo aumentando el tamaño de los fragmentos de Okazaki.

c) Diseñar un experimento para probar una de las dos hipótesis anteriores. Dar por hecho que se tiene acceso a todas las proteínas purificadas que participan en la replicación de ADN de *E. coli*, un oriC que contiene plásmido, [³H] timidina y [³H] uridina. Indicar todos los sustratos necesarios, el modo en el que se detectarán los productos y los resultados que se esperan obtener para proteínas mutantes y de tipo salvaje.

Para probar los mutantes B2 con relación a una pérdida de la interacción de la primasa, realizar un ensayo de actividad primasa:

1. Mezclar un molde monocatenario con una “horquilla” artificial, creada por un oligonucleótido fijado con primasa y helicasa mutante B2 o helicasa wt como control.

Si se emplea como molde un plásmido bicatenario que contiene un oriC, será necesario añadir otras proteínas, como dnaA y dnaC o utilizar extractos de células wt o mutantes B2 con el fin de crear una horquilla de replicación.

2. Incluir [³H] UTP y otras rNTPs (para hacer ARN) en el *buffer* adecuado.

3. Incubar la reacción a 42°C durante varios minutos.

4. Echar los productos de la reacción sobre un filtro y lavar para eliminar los nucleótidos libres. En un contador de centelleo, medir la radioactividad que queda.

O BIEN: Separar los productos de la reacción en un gel de acrilamida desnaturalizante y visualizarlos en una autoradiografía.

5. Con una helicasa wt, se debería observar la retención de los cebadores radiomarcados, mientras que con una helicasa mutante B2, no se debería observar ninguna radioactividad retenida en el filtro.

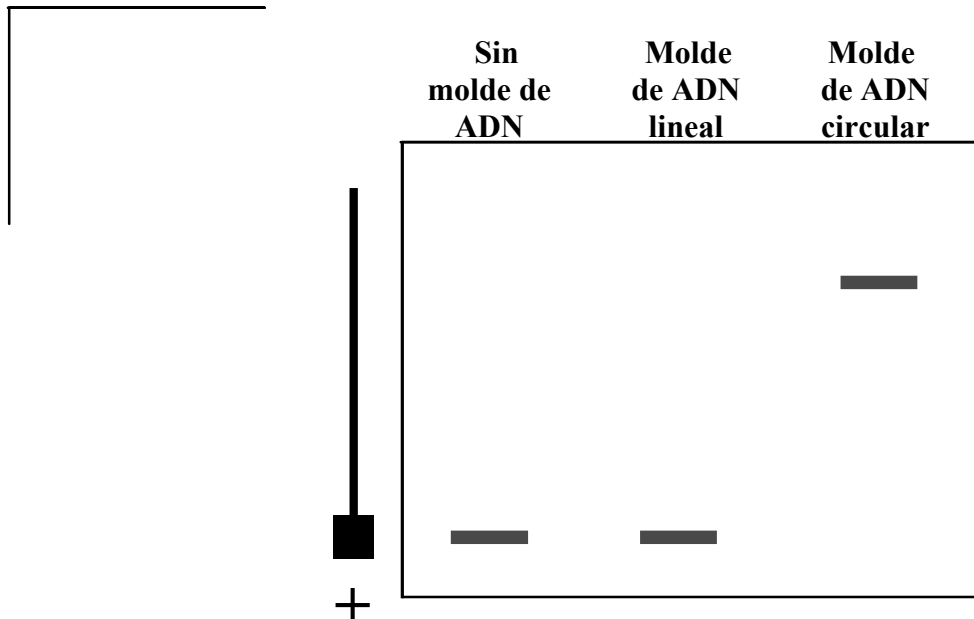
O BIEN: Para la helicasa wt, se deberían observar, en la película, cebadores

cortos de ARN radiomarcados de unas 10 bases de largo; para la helicasa mutante B2, no se debería observar ninguna formación de cebadores.

NOTA: otros ensayos utilizados para probar distintas hipótesis han sido evaluados de forma similar (es decir, descripción de sustratos, detección de productos y resultados de wt y mut) siempre y cuando el procedimiento seguido haya demostrado con éxito la hipótesis.

6. Para determinar el mecanismo que hay tras la procesividad del ensamblaje de la cromatina, se buscan proteínas asociadas a CAF1. Una de las proteínas que intervienen, CIP1, es especialmente interesante para ello. Con el fin de estudiarla en mayor profundidad, se realiza una forma radiomarcada de la proteína.

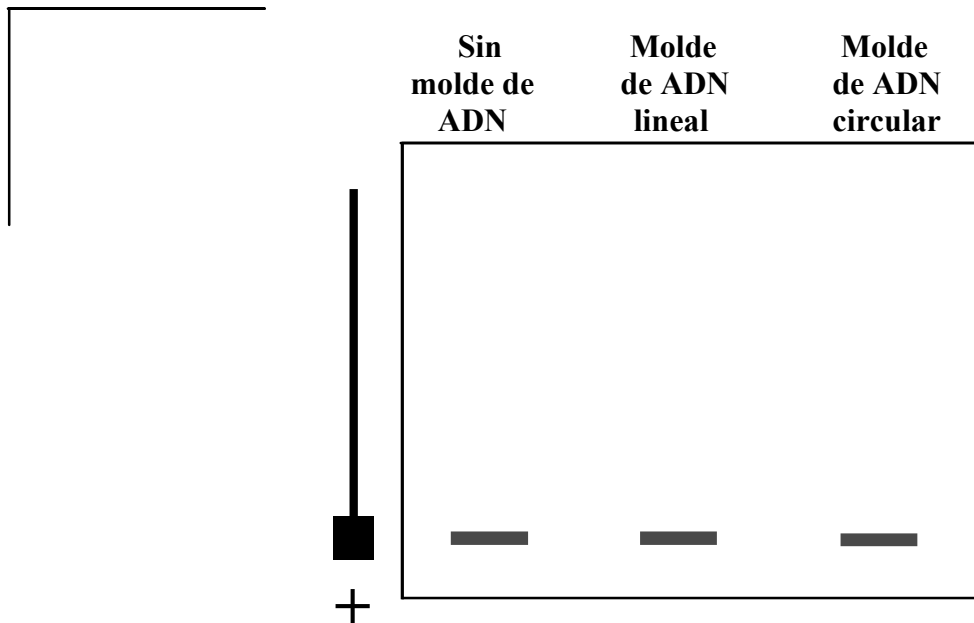
a) Ante la sospecha de que CIP1 pueda ser una proteína de unión al ADN, se añaden CIP1 radiomarcado y CAF1 a un ADN circular, al mismo ADN linearizado con una enzima de restricción (corte romo) y a ningún ADN. Tras una incubación de 15 minutos, se separa la reacción de unión en un gel de acrilamida no desnaturalizante y se expone dicho gel en una película de rayos X para ver en qué lugar del mismo ha migrado el CIP1 radiomarcado.



Dado que CIP1 forma un complejo estable con el ADN circular, pero no con el ADN lineal de la misma secuencia de ADN, ¿es CIP1 una proteína de unión al ADN específica de una secuencia? ¿Cuál puede ser la explicación de que se obtengan distintos resultados al emplear ADN lineal y circular? (Pista: el resultado obtenido es el mismo si el ADN es superhelicoidal o relajado).

No, CIP1 no reconoce la secuencia del ADN. En cambio, sí reconoce su estructura. Puede interactuar con ADN circular, pero no con el ADN lineal de la misma secuencia. Una explicación para esto es que la proteína está unida topológicamente al ADN y se desprende del extremo de una molécula de ADN lineal. (Obsérvese que, en teoría, cabría la posibilidad de que la proteína reconociera el sitio de unión específico en el que se encuentra el sitio de la enzima de restricción con la que se linearizó justo en el medio. Es muy poco probable, pero se podría comprobar realizando el corte con otra enzima). (Esta fue pregunta de examen en ediciones anteriores).

b) Se lleva a cabo el mismo experimento, pero en esta ocasión se deja fuera CAF1. Los resultados que se obtienen son los siguientes:



¿Qué papel crees que desempeña CAF1?

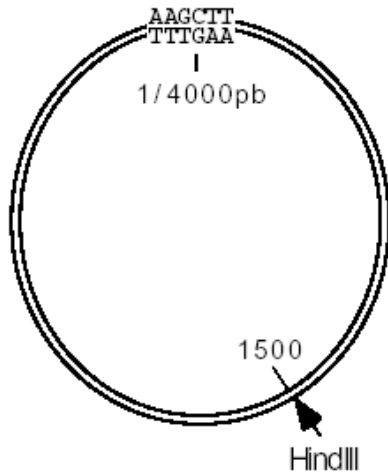
CIP1 no se asocia con el ADN sin la presencia de CAF1, por lo que CAF1 debe ser un factor de carga para CIP1. Esto es similar al caso en el que el complejo gamma carga la *b-clamp* en *E. coli* o en el que el RFC (factor de replicación C) carga el PCNA (antígeno de proliferación celular nuclear) en los eucariotas.

c) ¿De qué modo las propiedades de unión al ADN de CIP1 ayudan a explicar su papel en la procesividad del ensamblaje de la cromatina?

Al unir topológicamente CAF1 al ADN, CIP1 puede evitar que CAF1 se desprenda, aumentando por ello su procesividad. Así, es como la *b-clamp* en *E. coli*, el PCNA en los eucariotas y la tirdoxina en el fago T7 incrementan la procesividad de la polimerasa.

7. La mayoría de las células codifican múltiples mecanismos para reparar los errores de apareamiento del ADN y otros daños sufridos por el mismo. Se aísla una cepa bacteriana sin caracterizarla previamente, con el fin de determinar qué mecanismos de reparación son funcionales en este organismo. Para ello, se realiza un extracto de la célula y se caracteriza la reparación del sustrato de ADN representado en el diagrama que se muestra a continuación. Nota: la enzima de restricción HindIII corta la secuencia: AAGCTT

TTCGAA



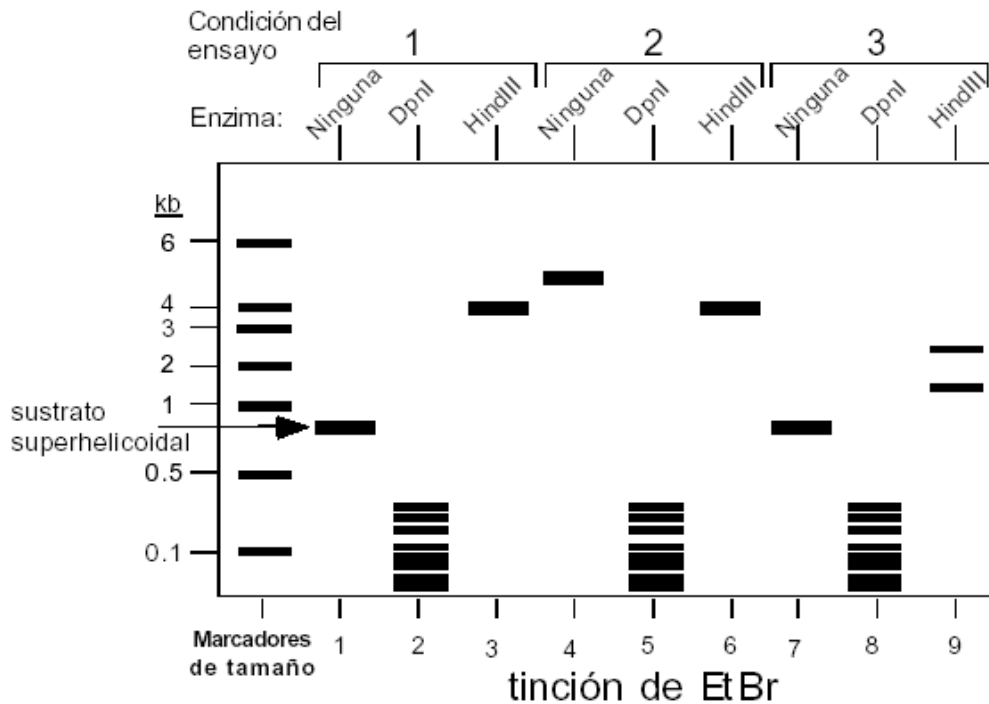
Para ensayar la reparación por medio del extracto, se incubó el sustrato bajo tres condiciones:

(1) ADN, sin extracto celular, + ATP, + dCTP.

(2) ADN, + extracto celular, + ATP

(3) ADN, + extracto celular, + ATP, + dCTP.

Tras estas incubaciones, se recupera el ADN, se le somete a una digestión de restricción (con enzimas marcadas sobre las bandas de gel) y se separan los productos en un gel de agarosa nativo. Antes de la electroforesis se eliminan del ADN todos los factores de proteínas. A continuación puede ver un diagrama del gel resultante:



a) Según los resultados de este experimento, ¿qué tipo de reparación del ADN parece estar teniendo lugar en el extracto celular? Hacer dos observaciones concretas que puedan conducir a esta conclusión.

Los datos proporcionados indican que:

- El sustrato del plásmido utilizado está totalmente metilado (DpnI es capaz de cortar el plásmido).
- En la segunda condición (cuando no hay disponible ningún dNTP), el ADN del plásmido está cortado. El ADN del plásmido se encuentra mucho más arriba que el ADN superhelicoidal y el linearizado. Existen dos explicaciones para esto: o se ha cortado el plásmido o los factores de proteínas están asociados al ADN. Dado que en el enunciado del problema se indica que todos los factores de proteínas han sido eliminados del ADN, se puede concluir que el salto se debe a que el plásmido está cortado.
- En la tercera condición (cuando se añade dCTP), tiene lugar una reparación directa mediante la sustitución de un único nucleótido, dCTP. El patrón de corte producido

por digestión con HindIII da como resultado bandas de 1500pb y 2500pb, lo que indica que la cadena interna del plásmido se repara de forma selectiva. La reparación no es arbitraria, puesto que en caso de serlo se esperarían observar tres fragmentos: fragmentos de 1500pb y 2500pb de ADN lineal.

Estas dos últimas observaciones nos deberían llevar a la conclusión de que el ADN se reparó mediante una reparación por escisión de bases. En este tipo de reparación, se retira la base dañada con una glicosilasa específica. En este caso, lo más probable es que la T del mal apareamiento G-T haya sido eliminada por la glicosilasa timidina que retira específicamente la T en los errores de apareamiento G-T, generando un sitio AP. Una vez eliminada la base, la endonucleasa AP rompe el 5' del sitio AP, cortando de este modo el esqueleto. Entonces, la exonucleasa del ADN monocatenario puede eliminar la mitad del azúcar. Cuando dCTP está disponible, la ADN Polimerasa añadirá un nucleótido para rellenar el hueco. En la segunda condición, dado que no hay ningún dCTP disponible, el ADN permanece cortado, ya que la Polimerasa no puede rellenar el agujero. Cuando se proporciona dCTP en la tercera condición, se rellena el hueco y, por tanto, se elimina el corte y se devuelve la sensibilidad a HindIII.

b) Se desea comprobar también si estas células presentan un sistema de reparación de emergencia o propensa a error (SOS). A continuación, dibujar un diagrama de un sustrato que se pueda emplear para comprobar la presencia de un sistema enzimático de estas características. Representar (y etiquetar de forma clara) los productos que se esperan observar (por ejemplo, en un autoradiograma de un gel desnaturizante) tanto si el extracto celular presenta este sistema de reparación como si no.

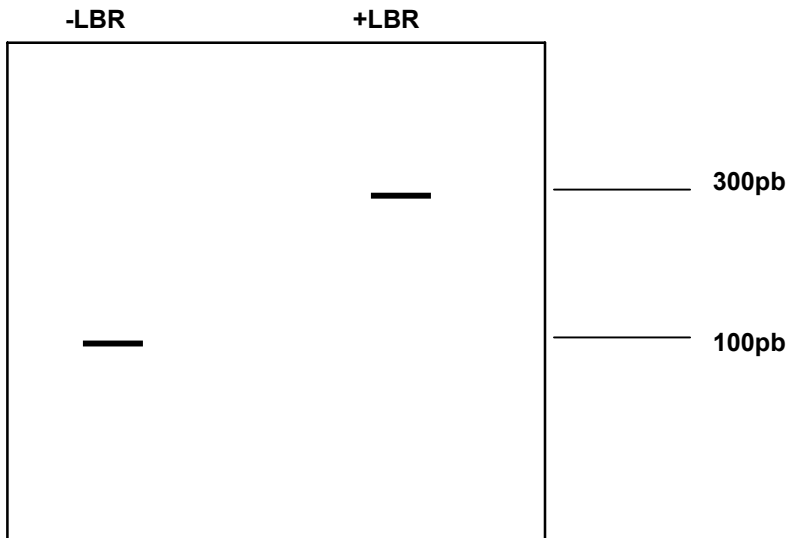
Se describieron experimentos muy diferentes e incluso creativos que permitían probar si las células presentaban o no un sistema de reparación propensa a error. Los factores clave que conviene recordar son los siguientes:

- 1) Para lograr una reparación de este tipo, se necesita la transcripción. La reparación propensa a error tiene lugar cuando la polimerasa se encuentra con una lesión que no puede leer durante la transcripción. En lugar de abandonar la transcripción (lo que sería letal) la célula emplea este tipo de reparación para replicarse sobre el ADN ilegible mediante la adición de adeninas.
- 2) El sustrato elegido debería contener una lesión que necesite este tipo de reparación. La mejor opción sería un dímero de pirimidina, un sitioapurínico, o un sitioapirimidínico. Una mutación de mal apareamiento no es una buena elección, pues no bloquearía la polimerasa durante la replicación, al no poderse replicar ambas cadenas. Un trozo de ADN con una sola cadena rota tampoco es buena elección, ya que durante la replicación, la polimerasa se desprendería de la cadena rota.

Un ejemplo de respuesta correcta sería hacer un ensayo de extensión del cebador usando un molde con un dímero de pirimidina.



Se marca el cebador con radioactividad y luego se añade el extracto de células, dNTP no marcado y se deja que ocurra la transcripción. A continuación, se preparan los productos de transcripción en un gel desnaturante y se expone dicho gel a una radiografía para detectar radioactividad. Si se ha aplicado la reparación propensa a error, se replicará toda la cadena molde (200pb), de lo contrario, la replicación se atascará en el dímero de pirimidina (100pb).



c) Utilizando la prueba del apartado 5b, se descubre que el extracto de célula utilizado no soporta la reparación propensa a error. Sin embargo, un extracto preparado con células *E. coli* salvajes tampoco presentó actividad, pese a que se sabe que esta cepa codifica las enzimas necesarias para evitar la lesión. Visto este resultado, ¿cómo se debe cambiar el modo de preparación de los extractos de células para aumentar las posibilidades de encontrar actividad de reparación propensa a error?

La explicación más probable para el hecho de no haber detectado este tipo de actividad en los extractos de las células es que las células de tipo salvaje a partir de las que se prepararon los extractos no estaban expresando las proteínas de reparación propensa a error. Las proteínas implicadas en la reparación propensa a error se estimulan al dañarse el ADN; por tanto, se podría aumentar la actividad de reparación propensa a error tratando las células con irradiación UV antes de la lisis. Otra posibilidad sería iniciar una línea celular mutante, como una fotoliasa mutante o un *uvrA* mutante que aumentaría el daño en el ADN, estimulando así el sistema de reparación propensa a error (o LBR, en su sigla inglesa).

Muchos sugieren el fraccionamiento y purificación de la actividad LBR. Es una posibilidad, y un enfoque razonable, pero no funcionará si no hay actividad en los extractos originales por falta de expresión de la proteína LBR.

8. En el curso de introducción a las prácticas se preparó un experimento con la prueba Ames para que lo realizasen los alumnos. Se proporcionaron dos cepas para su estudio: la cepa A tiene una única substitución de base, mientras que la cepa B muestra dos mutaciones del

marco de lectura. Las mutaciones de ambas cepas se encuentran en los genes necesarios para sintetizar la histidina. Por lo tanto, las cepas mutantes no crecen en medios que carezcan de este aminoácido. Se colocan células de cada cepa en placas de medio de cultivo mínimo sin histidina y se exponen a los mutágenos indicados.

Mutágeno	Media de colonias por placa	
	Cepa A	Cepa B
Control (sin mutágeno)	35	~5
UV (1 s)	45	30
UV (5 s)	500	2000
UV (10 s)	1000	2000+
MMS	350	12
9-aminoacridina	40	150

a) En este experimento se exponen las células a mutágenos, aunque el ensayo cuenta las colonias que crecen y, para crecer, las células no pueden ser mutantes. Explicar esta aparente contradicción.

Se usan los mutágenos para hacer mutaciones que inviertan las mutaciones originales de las cepas A y B. El recuento de las colonias que crecen es lo que indica cuántas mutaciones se han realizado, pues son éstas las que RESTABLECEN los genes a sus secuencias de tipo salvaje. Por eso las células pueden crecer y se pueden contar.

NOTA: la reversión no tiene por qué restablecer la secuencia exacta de tipo salvaje. Una mutación compensatoria también puede restablecer la vía de la histidina y proporcionar el fenotipo de crecimiento.

b) ¿Por qué se ven aparecer colonias en las placas de control? Proponer una explicación para la diferencia observada entre las frecuencias de control de las cepas A y B.

Estas colonias surgen de reversiones espontáneas. La cepa A tenía una única sustitución de base, mientras que la B tenía dos mutaciones del marco de lectura. Esto explica la mayor incidencia de reversiones espontáneas en la cepa A.

c) Un producto químico se clasifica como mutágeno si produce el doble de mutantes de los que se producen de manera espontánea. A partir de los datos anteriores, sugerir si la luz UV, MMS y la 9-aminoacridina actúan como mutágenos efectivos para cada cepa. ¿Qué indican estos resultados sobre los tipos de mutaciones inducidas por cada uno de estos tratamientos?

Para la cepa A, +5 segundos de luz UV y MMS, ambos actúan como mutágenos efectivos. Para la cepa B, +1 segundo de luz UV y 9-aminoacridina, ambos son buenos mutágenos, mientras que MMS es marginal. Esto indica que, probablemente, MMS induce las sustituciones de base, mientras que la 9-aminoacridina induce los marcos de lectura. Aparentemente, la luz UV es capaz de inducir ambos tipos de mutaciones.

d) Ante la pregunta de por qué no se empezó desde el principio con células de tipo salvaje (His+), se las mutagenizó, y se buscaron células His-, ¿cómo se justifica el uso de estudios de reversión mutante en lugar de el enfoque sugerido? Identificar un par de ventajas específicas del enfoque del análisis de reversión. ¿Qué limitaciones tiene el determinar las especificidades mutagénicas (es decir, decidir si algo es un mutágeno o no) mediante estudios de reversión?

El enfoque de la pregunta es mucho más difícil y menos cuantitativo. Si se empezase con un campo de células que fuesen todas de tipo salvaje, al aplicar el mutágeno algunas morirían por sus mutaciones, pero ¿cómo encontrar esas células? Los estudios de reversión permiten identificar una mutación en base al hecho de que la célula puede producir una colonia de células grande y visible, lo que indica un suceso de reversión.

Con frecuencia, los estudios de reversión son más sensitivos porque ofrecen una selección genética de mutantes en un gen objetivo específico más sencilla (por ejemplo, en el test Ames, la selección es para His+). También permiten hacer pruebas de tipos específicos de mutaciones (en las primeras partes de la pregunta se diferenciaba entre mutágenos que producen mutaciones en el marco de lectura y los que producen sustituciones de base, por ejemplo). Otra limitación para los estudios de reversión puede ser que cualquier tipo de mutación particular sólo se invertirá mediante unas determinadas clases de mutágenos. Por lo tanto, es necesario probar varios tipos diferentes de alelos mutantes.

9. Un colega de California solicita consejo sobre la reparación de ADN. Está estudiando dos nuevas cepas de bacterias, *P. Outrageous* y *B. outus*, cuyos genomas son similares en tamaño al de *E. Coli*. Ha podido aseverar que el índice de mutación es igual al observado en mutaciones / ronda de replicación *E. coli*, $\sim 1 \times 10^{-10}$. Sin embargo, el problema es que ahora las cepas están acumulando mutaciones a un ritmo elevado. El colega indica que el problema está causado por mutaciones en genes que codifican exonucleasas. Envía sus cepas mutantes además de sus exonucleasas purificadas de tipo salvaje.

a) Se decide examinar el índice de mutación de dichas cepas realizando un seguimiento de la reversión espontánea de una mutación puntual en un gen necesario para la biosíntesis de la histidina. Se colocan varios cultivos independientes de cada cepa en placas y se calcula el número de mutaciones / rondas de replicación como sigue:

	<i>P. outrageous</i>	<i>B. outus</i>
n.º de mutaciones / rondas de replicación:	1×10^{-7}	3×10^{-9}

I) Dado estos datos, ¿la exonucleasa defectuosa de cada cepa está implicada en la replicación del ADN o en la reparación de escisiones? ¿Por qué?

Los datos anteriores sugieren que la exonucleasa mutante de *P. outrageous* es necesaria para la reparación de mal apareamiento durante la replicación de ADN, mientras que la exonucleasa de *B. outus* es necesaria para la reparación por escisión. La replicación de ADN en ausencia de reparación por escisión implicará aproximadamente 1 error por 10^7 nucleótidos. La reparación de mal apareamiento aumenta la fidelidad durante la replicación de ADN a aproximadamente 1 error por 10^{10} nucleótidos. Dado que se están controlando las mutaciones espontáneas, la frecuencia observada en las mutaciones de *B. outus* es baja, pero más alta que en las cepas de tipo salvaje.

II) *E. coli* posee tres exonucleasas (ExoI, ExoVII, y RecJ) que pueden proporcionar redundancia cuando una de las otras dos muta. En función de los datos anteriores, ¿es probable que *P. outrageous* posea un sistema de redundancia similar?

No es probable que *P. outrageous* posea más de una única exonucleasa para la reparación de apareamientos incorrectos. Se supone que la cepa con la que se trabaja contiene una única mutación. El cambio observado en la frecuencia de mutación debido a esta única mutación indica que no hay otras exonucleasas que puedan complementar la actividad de la exonucleasa mutante.

III) ¿En *E. coli*, qué frecuencia de mutación (n.º de mutaciones / ronda de replicación) se puede predecir para la mutación de los siguientes genes?:

mutS 1×10^{-7} , *mutS* es responsable de los enlaces de mal apareamiento que se presentan durante la replicación del ADN. Así, una mutación en este gen causará una frecuencia de mutación de 1×10^{-7} mutaciones / ronda de replicación por las razones dadas anteriormente.

uvrA 3×10^{-9} , *uvrA* está implicada en la reparación por escisión y causará una frecuencia de mutación de 3×10^{-9} por las razones dadas en la parte I).

b) Antes de empezar a caracterizar las proteínas, se decide volver a comprobar que las proteínas purificadas recibidas son exonucleasas. Para hacerlo, hay que realizar una prueba de la actividad adecuada para cada proteína. Diseñar un experimento para probar cada proteína para actividad de exonucleasa en un substrato de ADN de doble cadena.

1. En un buffer con Mg^{2+} , mezclar una de las exonucleasas purificadas con un ADN marcado uniformemente con radioactividad (>300pb). Como control, preparar otra reacción del mismo modo, sin la adicción de la exonucleasa.

2. Incubar durante 5 minutos a 37° C.

3. Sedimentar el ADN no digerido y retirar el sobrenadante que contiene los nucleótidos radioactivos libres. Medir la radioactividad del sobrenadante y comparar con el experimento de control. Si la proteína purificada es una exonucleasa, debería detectarse radioactividad en el sobrenadante.

c) Dado que una de las exonucleasas es importante durante la replicación del ADN, mientras que la otra es importante para la reparación por escisión, se sospecha que ambas nucleasas también difieren en procesividad. Se decide probar esta hipótesis midiendo la procesividad de las exonucleasas de tipo salvaje purificadas. Describir el experimento para probar la procesividad de estas proteínas.

1. En un buffer sin Mg^{2+} , mezclar una exonucleasa purificada con un sustrato de ADN marcado uniformemente con radioactividad (>300pb). La ausencia de Mg^{2+} en este paso, evita que la reacción continúe.
2. Incubar durante 5 minutos para que la exonucleasa se puede enlazar al sustrato.
3. Añadir Mg^{2+} mas 1000x sustrato sin marcar. Incubar durante otros 5 min. a 37° C.
4. En este punto, se puede probar la procesividad observando la longitud del sustrato marcado con radioactividad. Preparar el producto de la reacción en un gel. Secar el gel en un papel y exponerlo a una radiografía para hacer un autoradiograma. Comparar esta banda con la observada de las reacciones que contenían las exonucleasas del experimento. Una exonucleasa con baja procesividad debería generar una banda cercana a 300pb de longitud. Sin embargo, la banda de una exonucleasa altamente procesiva será mucho menor.

d) Por último, se quiere estudiar el estado de metilación del ADN en las cepas. Tras el ADN genómico de cada cepa, se digiere el ADN con bromuro de etidio. Los sorprendentes resultados son los siguientes:

<i>P. outageous</i>	<i>B. outus</i>		
-	+	-	+
			Tratamiento MboI



Columna: 1 2 3 4

l) ¿Cuál es el tamaño medio de los trozos de ADN en la segunda columna? (MboI se corta en la secuencia 'GATC').

La secuencia GATC aparecerá aproximadamente una vez cada 4^4 nucleótidos. Por lo tanto, el tamaño medio de los fragmentos de ADN será de 4^4 ó 256 nucleótidos.

II) Según los datos mencionados, ¿son estas cepas dependientes de la metilación del ADN para conseguir una reparación de ADN exacta? Si no es así, nombrar dos posibilidades que la célula puede utilizar para determinar qué cadena de ADN es la que se ha sintetizado de nuevo y, por tanto, la que se debe reparar.

Mbol digiere específicamente el ADN no metilado. El ADN genómico de *P. outageous* fue digerido, pero el de *B. Outus*, no. Por ello, la reparación del ADN no es dependiente de la metilación en *P. outageous*, pero podría serlo en *B. outus*. Las células cuyo ADN no es metilado puede usar fragmentos de Okazaki o proteínas similares a la PCNA para determinar cuál es la cadena nueva.