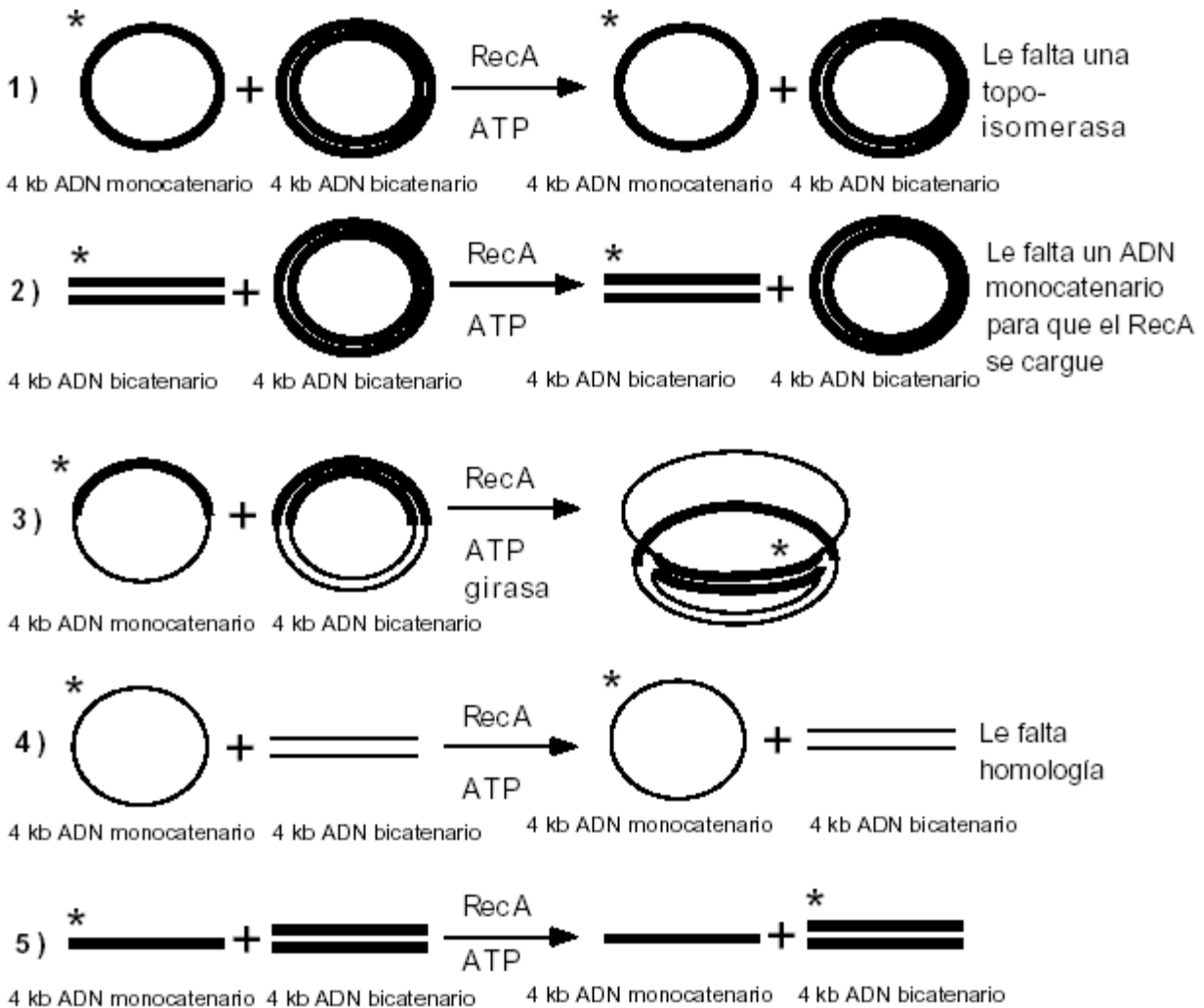
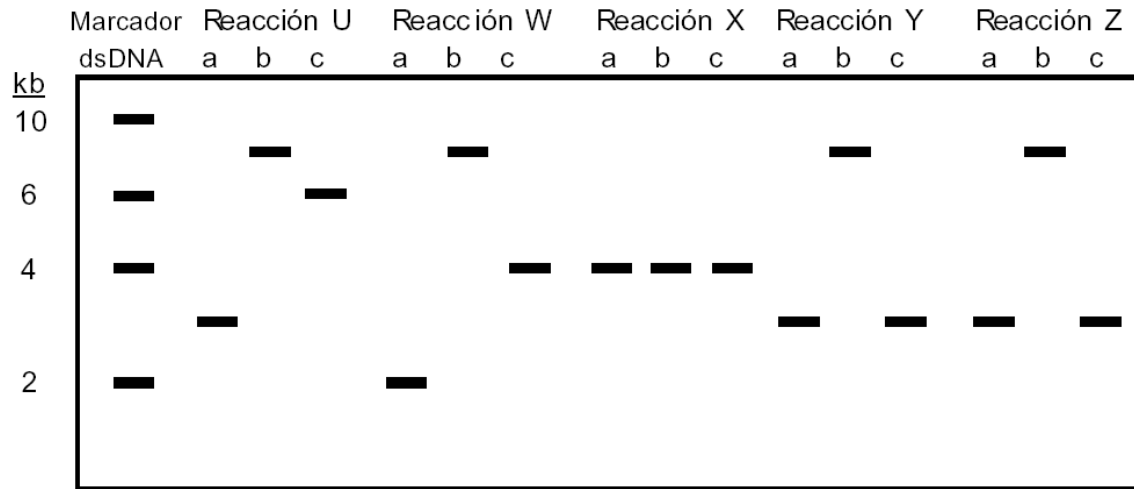


1a) Estamos estudiando la función de RecA *in vitro* junto con un/a compañero/a de prácticas. Llevamos a cabo varias reacciones con el fin de estudiar qué se necesita para la actividad de RecA. Indicar, para cada una de las reacciones que se presentan a continuación, los productos que se esperan conseguir una vez que la RecA ha sido eliminada mediante una extracción de fenol. Las regiones de homología se representan con **líneas gruesas**.



1b) Una vez efectuadas estas reacciones, nuestro/a compañero/a prepara un gel de acrilamina no desnaturizante para analizar los productos. Para cada reacción prepara 3 caminos: el camino (a) es una reacción de control sin RecA, el (b) es la reacción completa cargada directamente en el gel y el (c) es la reacción completa a la que se le ha extraído fenol para eliminar la proteína antes de cargar la reacción en el gel. Nuestro/a compañero/a expone los 15 caminos de reacción resultantes en una película de rayos X. En ese momento él/ella se tiene que ir y, tras revelar la película, nos sentamos a redactar el informe de laboratorio.

Desafortunadamente, nos damos cuenta de que no sabemos el orden en el que él/ella ha ido cargando las reacciones. La película quedó de la siguiente manera:



Qué números de reacción (1-5) se corresponden con las reacciones de la película (U-Z)? Explicar las diferencias entre las columnas a, b y c para cada reacción.

**Reacción U = 3, W = 5, X = 2 e Y ó Z = 1 ó 4 (las mismas bandas en el gel)**

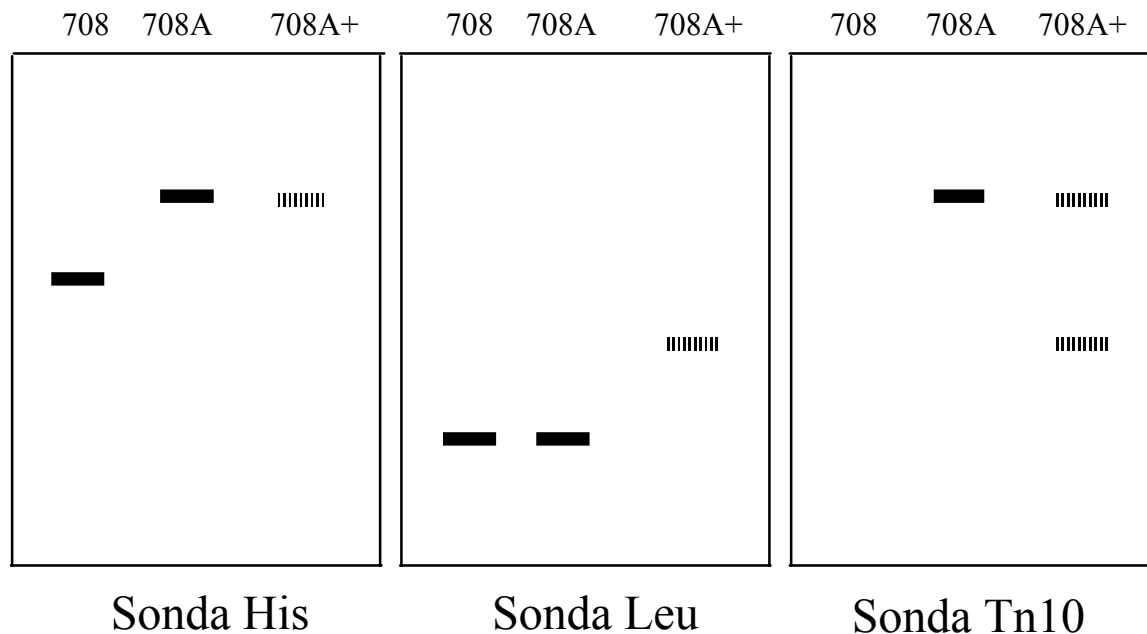
- 1 y 4**
- a: Todas estas tienen el mismo ADN monocatenario circular, que aparentemente mide 3 kb.
  - b: recA se une a ambas moléculas de ADN, coge una banda para 2 ADN + retardos de proteína (8kb).
  - c: Componentes que no están indicados en (a), por lo que no se forma ningún nuevo producto de ADN estable (3 kb).
- 2**
- a: ADN bicatenario lineal caliente de 4 kb.
  - b y c: Sin ADN monocatenario, recA no se puede enlazar, se observa el mismo tamaño (4 kb).
- 3**
- a: La misma molécula de ADN caliente que en los casos 1 y 4 (3 kb).
  - b: recA se enlaza y forma nuevos productos de ADN combinando los dos ADN, se mantiene el enlace (8 kb).
  - c: El producto final estable sin recA combina dos sustratos de ADN (6 kb).
- 5**
- a: el ADN caliente inicial es un ADN monocatenario lineal que aparentemente, va más rápido que el circular (2kb).
  - b: recA se enlaza para formar un nuevo producto de ADN combinando los dos ADN; se mantiene unido (8 kb).
  - c: El producto final caliente es un ADN bicatenario de 4 kb.

**2a)** Algunos elementos transponibles en *E. coli*, por ejemplo Tn10, se transponen a alta frecuencia justo después de que pase una horquilla de replicación. Esta inducción de transposición por replicación tiene un gran efecto, tanto, que la mayoría de las transposiciones ocurren en un periodo muy corto de tiempo, justo después de la replicación. ¿Qué mecanismo podría utilizar Tn10 para asociar la transposición con el paso de la horquilla de replicación? Proponer un experimento sencillo *in vivo* para comprobar si este mecanismo es cierto.

**La transposición se puede asociar a la replicación por el mismo sistema de metilación de ADN dependiente de *dam*, que asocia la reparación de errores en los apareamientos con la replicación. En este caso, la transposición sería provocada en transposones que contendrían secuencias semi-metiladas. [En realidad, la transposasa Tn10 no se une al ADN completamente metilado, pero sí al semi-metilado o no metilado, activando así la transposición tras el paso de la horquilla de replicación].**

**En un experimento *in vivo* se podría comparar la frecuencia de transposición en cepas sobreexpresadas de metilasa *dam*, *dam*<sup>-</sup> y wt. El Tn10 se debería transponer con más frecuencia de lo normal en las células *dam*<sup>-</sup> (donde los sitios deberán estar siempre no metilados) y con menos frecuencia de lo normal en las *dam* sobreexpresadas (donde los sitios se metilan más rápidamente tras la replicación). La frecuencia de la transposición se debería medir por medio de una transferencia Southern con una sonda Tn10, como se describe en el apartado b).**

**2b)** Se posee una cepa de *E. coli* (variedad 708A) que tiene una única copia de Tn10 en el genoma, integrado en el gen *hisB*. Se aísla un derivado de esta cepa (que denominamos 708A+) en el que se ha transpuesto el Tn10, produciendo una mutación en el gen necesario para el crecimiento en ausencia de leucina. A continuación, se muestra la transferencia Southern de ADN sobre una cepa 708, que corresponde a la 708A pero carece de Tn10, 708A y 708A+. La membrana ha sido sometida a tres sondas radioactivas diferentes: (1) el gen *hisB*, (2) el gen *leu* y (3) secuencias Tn10. Dado el patrón que se ha mostrado para las otras cepas, dibujar las bandas que se esperarían ver para la cepa 708A+ en cada una de las películas mostradas a continuación:



2c) En una clase, comentamos que el Tn10 es un transposón replicante. Sin embargo, el profesor nos informa de que basándonos únicamente en el experimento realizado en el apartado b), no es posible demostrar si el Tn10 es un transposón replicante o no-replicante. ¿Por qué no? Explicar brevemente el razonamiento del profesor.

**Una vez que la horquilla de replicación pasa por la secuencia Tn10, hay temporalmente dos copias de Tn10 en la célula, una en el cromosoma padre y otra en el cromosoma hijo, en la misma ubicación (el gen His).**

**(1) Si una copia se transpone por medio de un mecanismo replicativo, la célula progenie resultante llevará dos transposones Tn10 a dos sitios diferentes.**

**(2) Si se elimina una copia de transposón por medio de un proceso no replicativo de “cortar y pegar”, ésta dejará a su paso una rotura bicatenaria. Esta rotura se reparará utilizando la región homóloga del cromosoma opuesto, que contiene la nueva copia replicada de la secuencia Tn10. De este modo, se podrá encontrar también el transposón tanto en el sitio antiguo como en el nuevo sitio objetivo de la célula progenie.**

3a) Se dispone a estudiar el problema de la propagación de la resistencia a los antibióticos en una población bacteriana hospitalaria. Existen motivos para sospechar que la causa del problema subyace en algún fago no caracterizado previamente. Dichos fagos transportan genes de resistencia a los antibióticos, provocando que las células infectadas se hagan resistentes cuando el fago se integra en el ADN cromosómico de la célula.

Como primer paso para prevenir una propagación futura de estos fagos, Ud. caracteriza su mecanismo de integración. Para conseguir comprender los mecanismos que utilizan, Ud. infecta dos de los fagos en diversas cepas de *E. coli* con mutaciones en los genes que actúan en el procesamiento del ADN. A continuación puede ver una tabla de resultados.

<b>Cepa de <i>E. coli</i></b>	<b>Fago A</b>	<b>Fago B</b>
Natural	Se integra	Se integra
<i>polA</i> <sup>-</sup> (gen de ADN polimerasa I)	No se integra	Se integra
<i>lig</i> <sup>-</sup> (gen de ADN ligasa)	No se integra	Se integra
<i>recB</i> <sup>-</sup> (gen de RecB)	No se integra	Se integra

Según estos datos, ¿qué tipo de recombinación (homóloga, específica de sitio o transposición) se usará con mayor probabilidad para la integración mediante el fago A? Explique su respuesta.

**Transposición. El fago A no requiere *recB*, por lo que no se trata de una recombinación homóloga. Sin embargo, requiere polimerasa y ligasa, necesarios ambos para la transposición pero no para la recombinación específica de sitio.**

**3b)** ¿Qué tipo de recombinación (homóloga, específica de sitio o transposición) se utilizará con mayor probabilidad para la integración mediante el fago B? Explique su respuesta.

**La recombinación específica de sitio. El fago B tampoco requiere recB y, por lo tanto, no utiliza la recombinación homóloga. La recombinación específica de sitio no necesita síntesis del nuevo ADN, por lo que no requiere polimerasa. La recombinación une las cepas rotas, por lo que tampoco es necesaria la ligasa.**

**3c)** Usted decide que este método para determinar el mecanismo de integración es demasiado laborioso e indirecto. Sugiera un ensayo más directo que le permita determinar si el fago aislado utiliza la ruta de integración utilizada por el fago A o la utilizada por el fago B. Dispone de una sonda de ADN para los genes de resistencia a los antibióticos transportados por ambos tipos de fagos. Razone el ensayo y lo que espera encontrar con los fagos de cada clase.

**Un ensayo simple consistiría en realizar una transferencia Southern genómica en las cepas de *E. coli* infectadas por cada fago. Aislar el ADN de *E. coli* infectado con cada fago, digerirlo con una enzima de restricción y llevar a cabo una transferencia Southern (en un gel no desnaturizante, desnaturizar el ADN, transferirlo a una membrana, incubar con una sonda y exponerlo en una película). El *E. coli* infectado por el fago B debería siempre dar una banda del mismo tamaño cuando se sondea con el ADN del fago B, ya que la recombinación específica de sitio siempre provoca la integración en el mismo lugar. El *E. coli* infectado con el fago A mostrará multitud de bandas diferentes cuando se sondea con el ADN del fago A, debido a que los transposones se transponen en puntos aleatorios en el genoma.**

**3d)** Para detener la propagación de los fagos de resistencia a los antibióticos, Ud. desea aislar un inhibidor del proceso de integración. En función de los estudios con otros inhibidores de enzimas, Ud. piensa que el mejor objetivo para el inhibidor sería el sitio activo de la enzima de recombinación responsable de la integración. Para identificar el sitio activo en la recombinación para el fago B, Ud. utiliza una aproximación de secuencia de consenso. Primero, identifica una región del genoma del fago B escasamente homóloga al gen de integración del fago  $\lambda$ . Después, secuencia esta región de cinco fagos parientes cercanos todos ellos del fago B. Más abajo aparece una secuencia de aminoácidos (código de 1 letra) de estos seis fagos de tipo B.

Fago B	IFGYARVSYSQE
B-001	LFGYARVSYSQE
B-002	LFGYARVSTSQQ
B-003	IAGWIRVSTFDQ
B-004	IAGYIRVSTFDQ
B-005	IAGYIRVSTFDQ

Según estos datos de alineación, ¿qué amino ácido de esta región es más probable que forme parte del sitio activo? Aporte **dos** razones que justifiquen su respuesta.

**La serina conservada es más probable que forme parte del sitio activo. Está presente en todo pariente del fago B, por lo que debe ser importante. Además, la serina contiene un grupo OH necesario para atacar el fosfato del ADN y formar un intermediario covalente de ADN-proteína.**

**4a)** Un colega está estudiando una enfermedad predominantemente heredada y se encuentra con un paciente sin historial familiar de la enfermedad. Después de determinar que el paciente estaba en lo cierto respecto a la identidad de sus progenitores, su colega se ha puesto en contacto con usted, un experto en transposones. Ud. secuenció el gen de la enfermedad procedente del paciente y encuentra una gran inserción en el gen.

¿Qué características de la secuencia podría esperar que tuviera esta inserción si fuera un transposón?

**Repeticiones directas cortas (duplicación en sitio objetivo), repeticiones invertidas, genes con homología a los transposones.**

**4b)** Ud. decide examinar si realmente ha encontrado un nuevo transposón comprobando si éste puede ser transferido entre diferentes ADNs en una célula bacteriana. (Se supone que los elementos humanos se pueden transponer en bacterias). La estudiante del UROP (*Undergraduate Research Opportunities Programme*) a su cargo inserta un gen  $Amp^R$  en la secuencia de transposones sospechosa y lo clona en un plásmido bacteriano que contiene un gen  $Tet^R$ . A continuación, la estudiante transforma este plásmido en una cepa bacteriana transportando un plásmido  $F'$  con un gen  $Kan^R$ . Después, hace crecer las células donadoras, las empareja con una cepa de receptores  $Amp^S Kan^S Tet^S$ , mata las células donadoras y sitúa las bacterias supervivientes en diversas placas de antibióticos para probar el fenotipo de las células receptoras. El 0,05% de las células  $Kan^R$  que recupera son  $Kan^R Amp^R Tet^S$ , mientras que el restante 99,5% son  $Kan^R Amp^S Tet^S$ . ¿Qué conclusión puede extraer a partir de dichos datos?

**Cortar y pegar el transposón, transponiendo a una tasa baja.**

**4c)** Usted acusa a la estudiante del UROP a su cargo de estropear el ensayo, ya que esperaba un porcentaje mayor de células  $Amp^R$ . Ofendida, ella realiza un duplicado del experimento, esta vez realizando la transformación en una serie de cepas bacterianas con diferentes plásmidos  $F'$ , todos ellos con genes  $Kan^R$ . Esta vez encuentra que una de las cepas produce células receptoras, donde el 40% de los genes  $Kan^R$  son  $Kan^R Amp^R$ . Ud. le indica que secuencie un plásmido  $F'$  que haya obtenido una inserción del transposón y descubre que tiene un gran contenido de GC. Dado que las regiones del genoma humano que contienen secuencias codificadoras poseen un contenido mucho mayor de GC que las regiones que no tienen, ¿por qué resulta extraño que este transposón prefiera integrarse en ADN rico en GC? (¿Por qué se integrarían la mayoría de los transposones en regiones no codificadoras?)

**La mayor parte de los transposones prefieren el ADN no codificador, supuestamente para poder permanecer en el genoma sin matar por accidente al huésped.**

**4d)** ¿Cuál es la explicación para que este transposón pueda preferir integrarse en regiones transcritas activamente con estructuras de cromatina abiertas? (¿De qué tipo de transposón se trataría?)

**Quizá sea un retrotransposón, y necesite transcribirse en ARN antes de la transposición. Los retrotransposones normalmente disponen de sus propios promotores, pero podrían transponerse supuestamente con mayor frecuencia si se encontraran en regiones del genoma con estructuras de cromatina abiertas.**

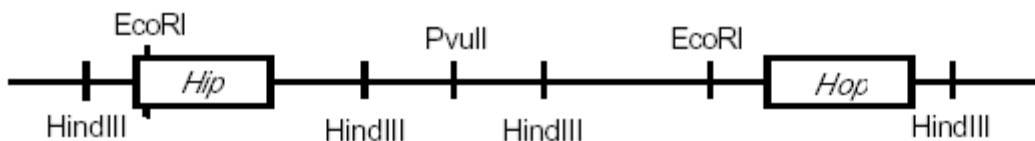
4e) ¿En qué manera cambia esta hipótesis su conclusión acerca de los resultados en la parte b)?

Los retrotransposones se transponen de forma replicativa (dejan una copia en el genoma a partir del cual se transcribió el ARN), pero no forman un cointegrante. Por tanto, en el ensayo bacteriano no llevarían consigo hasta la célula receptora el plásmido completo que contiene el gen TetR. Lo que en el ensayo parecía una transposición de cortar y pegar era en realidad una transposición replicante.

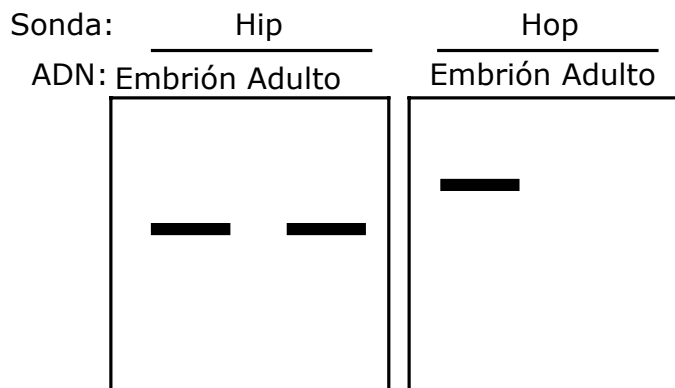
4f) ¿Cómo podría este transposón lograr esta preferencia por el ADN rico en GC?

El transposón podría reconocer específicamente una secuencia corta rica en GC en el ADN objeto de estudio.

5) Está interesado en estudiar la regulación de los genes importantes durante las primeras etapas del desarrollo de los ratones. Su profesor le pide que continúe el trabajo de un antiguo estudiante ya licenciado. Este estudiante estaba trabajando en dos genes nuevos a los que llamó *Hip* y *Hop*. Tanto *Hip* como *Hop* son necesarios en los embriones tempranos, pero no después. El estudiante licenciado consiguió generar el siguiente mapa de restricción para *Hip* y *Hop*:



Ud. decide llevar a cabo una transferencia Southern en *Hip* y *Hop*. Sabiendo que estos genes son importantes durante las primeras etapas del desarrollo, decide aislar el ADN genómico de los primeros embriones, así como el de los jóvenes adultos. Digiere el HindIII obtiene los siguientes resultados:

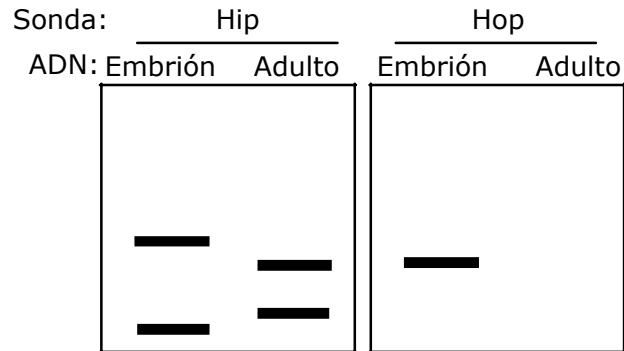


5a) Está sorprendido con los resultados. ¿Cómo explicaría el resultado al utilizar una sonda en la transferencia Southern con *Hop*? Una vez dada su explicación, ¿qué podría comentar sobre la regulación de *Hop* durante el desarrollo del ratón? ¿Resulta necesario *Hop* en un ratón adulto o sólo durante el desarrollo embrionario?

El gen *HOP* únicamente es importante durante el desarrollo embrionario. La falta de una banda al pasar la sonda a un ADN adulto indica que el gen *HOP* ya no está presente en

los ratones adultos. Es probable que se utilice una recombinación específica de sitio para ejercitar este gen una vez que ya no resulta necesario para su desarrollo. Este tipo de regulación solo es posible en aquellas células que están terminalmente diferenciadas.

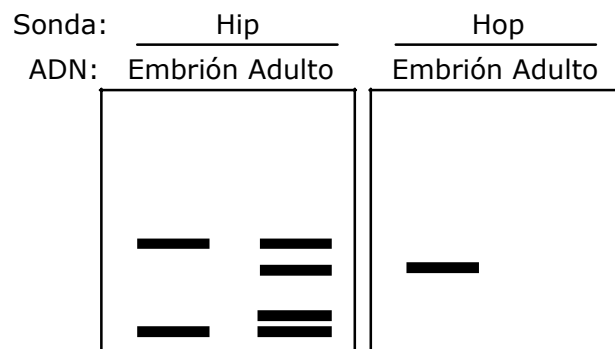
5b) Le gustaría investigar más a fondo la regulación de *Hip*. Para conseguirlo, utiliza el ADN que aisló anteriormente con dos enzimas, HindIII y EcoRI. En esta ocasión, éstos son los resultados obtenidos:



Con estos nuevos datos, ¿cómo cree Ud. que se regulará *Hip* durante el desarrollo del ratón? Dé una explicación valiéndose de los datos anteriores.

En este caso, la recombinación específica de sitio se ha utilizado también para regular el gen *HIP*. Sin embargo, más que una eliminación, lo que ha ocurrido es una inversión. Esto se puede comprobar en el cambio en las dimensiones de los fragmentos de restricción en la transferencia Southern. La situación asimétrica en el sitio del EcoRI produce dos patrones distintos antes y después de la inversión.

5c) Utilizando las mismas cepas de ratón que está estudiando, una compañera de laboratorio cría ratones mutantes que no consiguen desarrollarse correctamente. Uno de los ejemplares mutantes muestra múltiples características embrionarias, aún cuando el ratón ha alcanzado la etapa adulta. Entonces, su compañera le pide que realice la caracterización de la transferencia Southern en sus ratones mutantes para ver si *Hip* o *Hop* son mutantes en la cepa. Usted se presta a ello y digiere el ADN genómico de sus ratones con HindIII y EcoRI. Consigue los siguientes resultados:

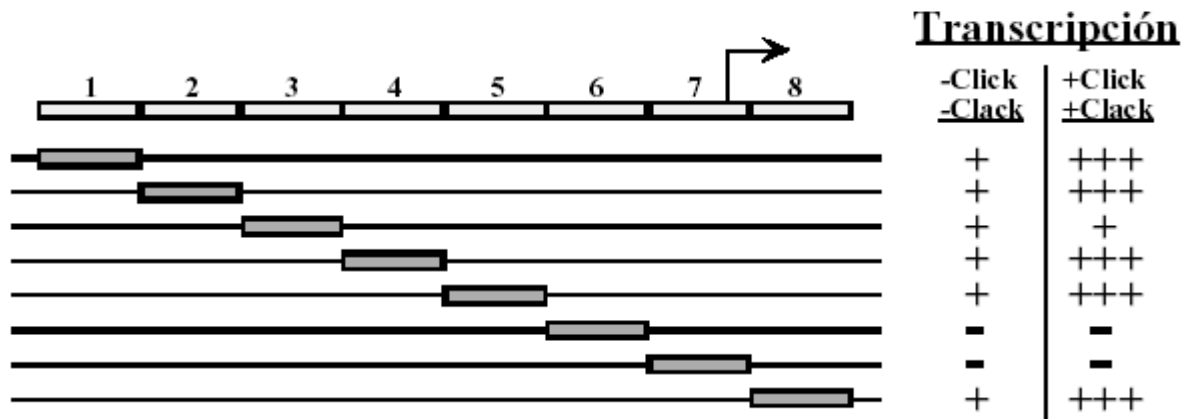


Con los datos que ya tiene, ¿qué gen cree Ud. que está mutado en los ratones de su compañera? ¿Cómo cree que la regulación de este gen muta para revelar las características mutantes anteriormente descritas?

El gen *HIP* parece haber sido mutado en las cepas de su compañera. El gen normalmente se regula por medio de una inversión. El patrón de restricción en el gel anterior sugiere que algunas células no consiguen completar dicha inversión. Las dos bandas del medio son generadas desde células donde el *HIP* se regula de manera correcta, mientras que en las dos bandas de los extremos, se generan de células que no consiguen invertir el gen *HIP*.

6) Ud. ha elaborado un ensayo de transcripción que recapitula la regulación *in vivo* del promotor para el gen Ratchet transcrito ARN Pol II. Al fraccionar este extracto, Ud. ha purificado y clonado dos factores de transcripción específicos que, junto con los factores de transcripción ARN Pol II, son necesarios para una correcta regulación del promotor.

Como primer paso a seguir para comprender la función de estos factores, Ud. realiza una serie de mutantes de deleción del promotor Ratchet y analiza su efecto en la transcripción en presencia y ausencia de los factores Click y Clack. Obtiene los siguientes resultados:



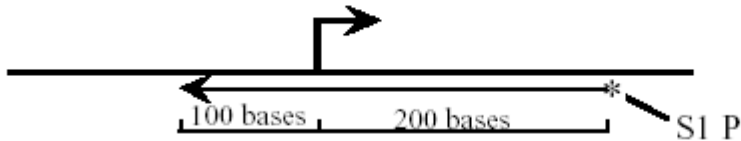
6a) Según estos datos, ¿cuál cree que es la función de los elementos 3, 6 y 7?

Lo más probable es que el elemento 3 sea un sitio de unión activador. Dado que este elemento es necesario para una activación transcripcional de Click y Clack, seguramente será el sitio de unión para una de estas proteínas.

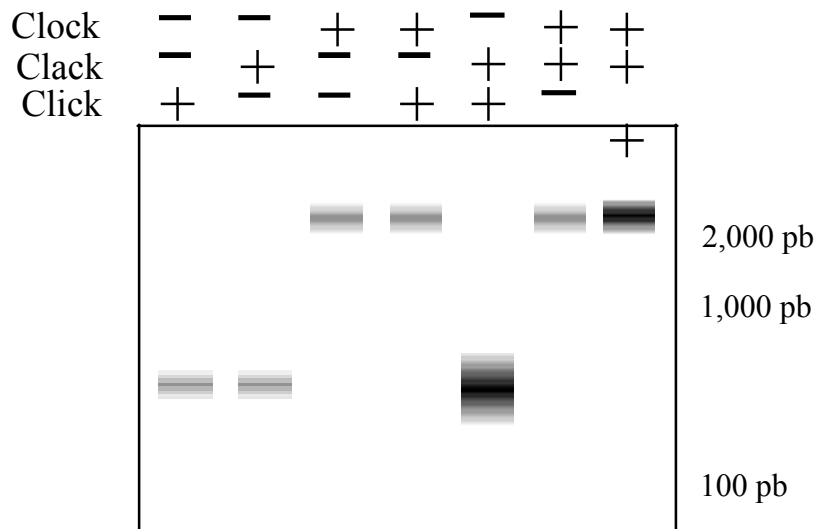
Probablemente, los elementos 6 y 7 forman parte del elemento promotor del núcleo, posiblemente, la caja TATA y la secuencia INR. Esto se puede determinar a partir de sus ubicaciones con respecto al comienzo de la transcripción y del hecho de que la eliminación de esas secuencias genera una pérdida de los niveles basales de transcripción.



Durante su análisis del promotor Ratchet, Ud. no se ha quedado satisfecho al no poder conseguir el efecto de un tercer factor de transcripción, **Clock**, conocido por su capacidad de activar este promotor *in vivo*. Todos sus anteriores ensayos para transcripción se efectuaron utilizando ensayos S1 y una sonda de ADN monocatenario de 300 bases de longitud que coincide en 100 bases con el sitio inicial de Ratchet.



Pensando que quizás haya omitido algo, decide analizar los productos de un conjunto de reacciones de transcripción realizados en presencia de UTP radiomarcado sobre un gel de agarosa desnaturalizante. Para provocar artificialmente una terminación de ARN Pol II, corta una cadena de ADN-molde de 2 kb hacia abajo del promotor con una enzima de restricción. Obtiene los siguientes resultados (ayuda: una depuración de promotor se completa tras las 100 bases de síntesis de ARN).



**6d)** ¿Qué aspecto de la función ARN Pol II queda afectado al añadir Clock? ¿Por qué no detectó ese efecto el ensayo S1 y sí apareció en la prueba de transcripción no iniciada?

**Clock sirve como factor de procesividad para el ARN Pol II. Observe que, cuando se añade Clock, las transcripciones incrementan su longitud de ~300 pb a 2000 pb. Esto no es un efecto en la eliminación del promotor, dado que esta eliminación (y con ella, la iniciación a la transcripción) se completa a 100 pb. Esto afecta a la elongación del nuevo transcrito.**

**Otra respuesta plausible es que Clock actúa como regulador negativo de la terminación de transcripción. Así, cuando está presente Clock, los transcritos son más largos que cuando Clock está ausente.**

En el ensayo S1 una sonda de ADN marcada a 200 pb que se hibrida al transcrito es su lectura para la transcripción. Se observará en el autoradiograma una banda que se corresponde a esta sonda de 200 pb, para ver si el ARN hibridado mide 200 pb o 2000 pb. De este modo, en un ensayo de protección S1, no se dará ninguna información sobre la longitud del ARN, y los resultados tanto con la presencia como con la ausencia de la proteína Clock serán idénticos.

En la prueba de transcripción no iniciada, uno mide la incorporación de los rNTP. Se incorporarán rNTP desde el sitio inicial hasta que ocurra la terminación (que dependerá de la procesividad intrínseca del ARN Pol II sin Clock, y de la prueba de transcripción no iniciada del ADN con Clock). Este ensayo le permitirá determinar la información de la longitud del ARN, y de este modo, podrá ver diferentes productos con y sin la proteína Clock.

7) Su laboratorio lleva a cabo un estudio sobre una cepa especializada de *E. coli* que contiene genes inusuales que ayudan en su crecimiento en condiciones de bajos niveles de nutrientes. Ud. está estudiando un gen producido en condiciones de inanición, el gen funE. Ha utilizado ensayos de protección nucleasa S1 para determinar el sitio inicial de la transcripción para el funE mRNA. La secuencia hacia arriba del sitio inicial incluye regiones -10 y -35 que difieren substancialmente de las secuencias de consenso habituales para *E. coli*. Utilizando un sitio de restricción conveniente, fusiona el promotor funE con un gen indicador de  $\beta$ -galactosidasa en un plásmido para permitir el estudio detallado de la expresión de este promotor.

### FunE Gen:

Región Superior FunE Núcleo Promotor |--FunE secuencia codificadora-->

|     |     |     |  
-35   -10   +1   EcoRI

### Gen indicador:

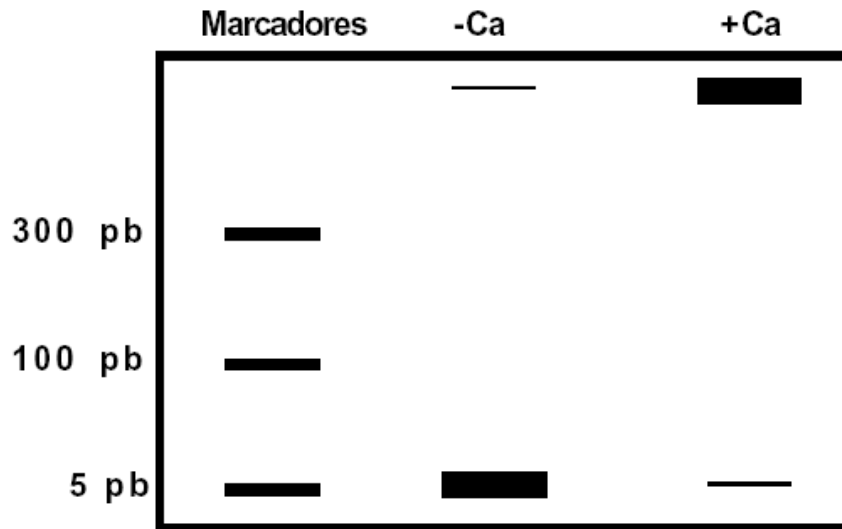
Región Superior FunE Núcleo Promotor |--B-gal secuencia codificadora -->

|     |     |     |  
-35   -10   +1   EcoRI

7a) Ud. mutageniza esta cepa y la transforma con su indicador plásmido para encontrar mutantes que afecten la expresión de  $\beta$ -galactosidasa. Un mutante, el mutante craZ, tiene una pérdida de inducción de actividad  $\beta$ -gal en condiciones de inanición. Ud. examina la expresión de otros genes que han sido producidos en condiciones de inanición en sus estudios de laboratorio y descubre que estos genes ya no se han producido en el mutante craZ. Teniendo en cuenta que estos genes tienen una región -35 similar a la del gen funE, dé una explicación sobre la naturaleza del mutante craZ.

Recuerde que la región -35 está implicada en la especificidad de la unión del ARN polimerasa holoenzima. La mutación craZ es posible que se encuentre en un factor sigma especializado ( $\sigma$ ) que reconoce las regiones -35 inusuales del gen funE y genes relacionados. La expresión o actividad de esta subunidad  $\sigma$  debe ser producida en condiciones de inanición.

**7b)** Estudia una variedad de compuestos para comprobar si incrementan la expresión de la fusión *funE* /  $\beta$ -galactosidasa en células de tipo salvaje. Descubre que si le añade calcio, la señal  $\beta$ -gal se incrementa significativamente. Para examinar este efecto al nivel transcripcional, realiza primero ensayos de incorporación en extractos celulares de tipo salvaje, añadiendo el indicador plásmico y el  $[H^3]$ UTP. Realiza el ensayo con presencia y con ausencia de calcio, luego traslada las reacciones a un gel y expone el gel a una película. La película resultante es la siguiente:



Este resultado sugiere una diferencia en la etapa limitante de velocidad de la iniciación transcripcional, en presencia y ausencia de calcio. ¿Cuál es la etapa limitante de velocidad modificada?

**Para el ensayo de incorporación en ausencia de calcio, observará que la mayoría de los productos son fragmentos cortos (~5 pb). Esto indica que se han formado complejos ternarios pero que no ha tenido lugar una eliminación del promotor. Para un ensayo de incorporación en presencia de calcio, observa que la mayoría de los productos son grandes (>300 pb), presumiblemente transcritos completos. Por ello, en ausencia de calcio, la liberación del promotor debe ser la etapa limitante de velocidad, pero en presencia de calcio, este paso se hace de manera más eficiente y ya no limita la transcripción.**

**7c)** Utilizando el fraccionamiento bioquímico y un ensayo de retardo en gel, su compañero de laboratorio aísla una proteína que se une sobre la región -35 de *funE*. Su compañero determina la secuencia del gen y se da cuenta de que la proteína tiene dos dominios, un dominio de unión al ADN y un dominio de unión al calcio. Los dos llegan a la conclusión de que esta proteína puede estar transmitiendo los efectos estudiados en (b). Proponga DOS mecanismos posibles para explicar cómo podría traducirse este factor en una transcripción dependiente  $Ca^{++}$ . ¿Qué experimento genético podría realizar para diferenciarlos?

**Esta proteína podría estar actuando bien como un represor de la transcripción que se desactiva por la unión al calcio, bien como un activador de la transcripción que se activa por la unión al calcio.**

$Ca^{++}$  --| Represor --| *FunE*    OR     $Ca^{++}$  → Activador → *FunE*

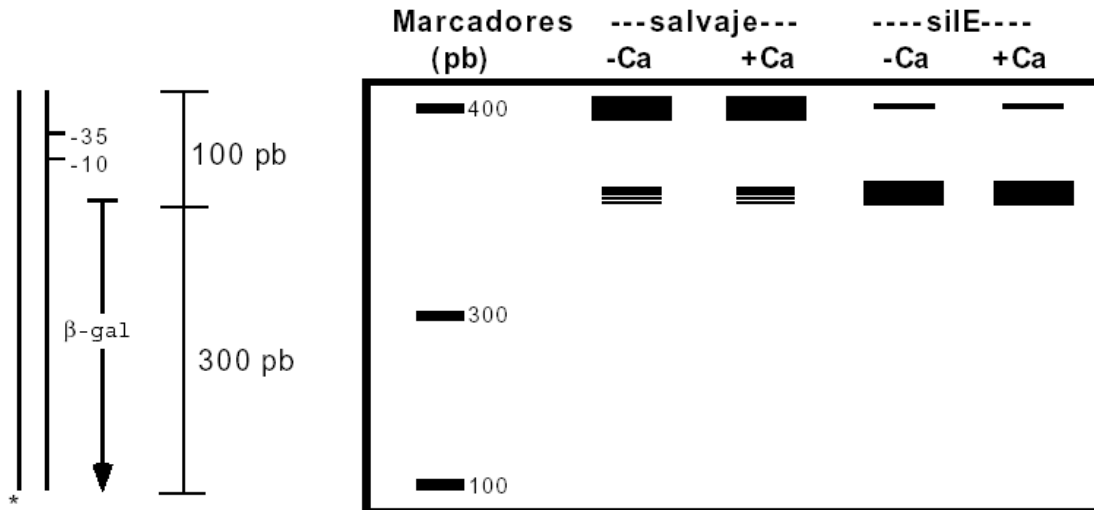
**Para distinguir entre estas posibilidades, podría eliminar el gen. Si la proteína es un represor, el gen eliminado será insensible al calcio y constitutivamente expresará el *FunE* a un alto nivel (el**

nivel causado por el calcio natural). Si la Proteína es un activador, el gen eliminado será insensible al calcio y expresará el FunE a un nivel bajo (el nivel sin calcio natural).

7d) Para estudiar más a fondo la transcripción de este promotor, Ud. mutagena la región promotora de su indicador plásmido y observa sus efectos sobre la expresión β-gal en presencia de calcio. Consigue una mutación en la región -10 llamada silE, que incrementa la expresión β-gal en presencia de calcio. Por el contrario, esta mutación no tiene efecto en la expresión β-gal en ausencia de calcio.

β-gal Actividad	---Natural---		-----silE-----	
	-Ca	+Ca	-Ca	+Ca
	+	+++	+	+++++

Utiliza KMnO<sub>4</sub> Para examinar el ADN que se desenrolla en las reacciones de transcripción realizadas *in vitro* con un fragmento de ADN bicatenario lineal, marcado por el extremo que porta el promotor funE promoter / β-gal fusión. El substrato de ADN y la película resultante se muestran a continuación:

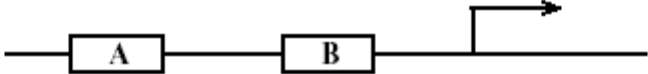


¿Qué indican estos resultados sobre la naturaleza de la mutación del silE? ¿Por qué la mutación del silE sólo afecta a la expresión de β-gal en presencia del calcio? (Ayuda: tenga en cuenta también los datos del apartado (b)).

La mutación del silE incrementa la extensión del desenrollamiento del ADN y la formación de complejos abiertos, quizás debido a que acerca la inusual secuencia -10 de funE a la región -10 del consenso de E. coli.

La expresión de β-gal del gen de fusión viene determinada por la etapa limitante de velocidad de la iniciación. En la ausencia de calcio, la liberación del promotor es la etapa limitante de velocidad. Por ello, el incremento del desenrollamiento del ADN y de la formación de complejos abiertos en ausencia de calcio no tendrá efecto alguno en la expresión de β-gal. En presencia de calcio, la liberación del promotor ya no es limitante de la velocidad. La formación de complejos abiertos parece ser la etapa limitante de velocidad bajo esas condiciones, por lo que la mutación silE, que incrementa la extensión del desenrollamiento del ADN (y por tanto, la formación de complejos abiertos), incrementa también la expresión de β-gal.

8) Está estudiando un par de factores de transcripción que regulan el promotor de bombeo (relacionado con la producción de proteínas específicas de los músculos). Ha purificado ambos factores y estudiado su capacidad para regular la transcripción del promotor de bombeo tanto con, como sin mutaciones en varios elementos claves del promotor.



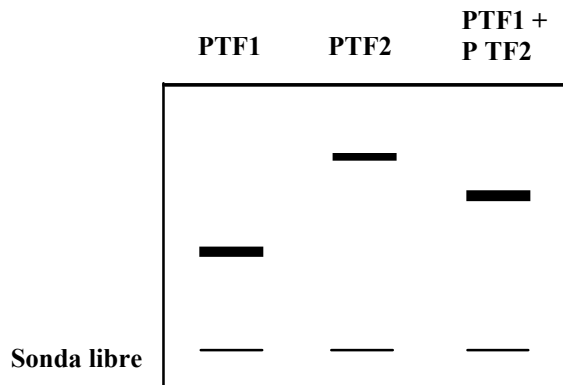
<b>Factor añadido</b>	<b>Transcripción</b>		
	<b>natural</b>	<b>No A-Box</b>	<b>No B-Box</b>
Ninguno	+	+	-
PTF1	++++	+	-
PTF2	+	+	-
PTF1 y PTF2	-	+	-

8a) Basándose en los datos de transcripción anteriores, asigne roles para los elementos A y B del promotor de bombeo. Sea breve.

El elemento A es necesario únicamente para transcripciones activadas. Es probable que contenga una secuencia (UAS) reconocida por un activador transcripcional de unión al ADN con secuencia específica.

El elemento B se necesita para transcripciones basales y activadas. Es posible que contenga secuencias TATA y/o elementos de iniciador reconocidos por los factores de transcripción generales.

8b) Está intrigado con los resultados del ensayo de transcripción en los que tanto el PTF1 como el PTF2 se añadieron al mismo tiempo. Ud. considera que PTF2 puede inhibir la función de PTF1 alterando sus propiedades de unión al ADN. Para confirmarlo realiza un ensayo de retardo en gel utilizando el promotor de bomba.



Experimentos previos sostienen que tanto PTF1 como PTF2 son dímeros cuando se unen al ADN. Teniendo eso en cuenta ¿cómo explicaría los resultados de este ensayo de retardo en gel?

PTF2 es una proteína más grande que PTF1, y el complejo ADN-proteína, que contiene un dímero de



9) A continuación se muestra un borrador de la región del promotor *lac*. Complete la información que falta en la siguiente tabla:

Condiciones de crecimiento	Actividad de Lac Z	Explicación, si es inferior a la actividad máxima	Proteínas enlazadas al promotor y a la posición de cada una de ellas.
Glucosa + IPTG -	-	<b>reprimido por LacI</b>	<b>LacI unido al operador</b>
Glucosa + IPTG +	-	<b>no activado por CAP-cAMP</b>	<b>~ nada</b>
Glucosa - IPTG -	-	<b>CAP-cAMP promueve la formación de complejos cerrados y LacI promueve la formación de complejos cerrados, pero bloquea la formación de complejos abiertos.</b>	<b>CAP-cAMP unido al sitio CAP, RNAP-sigma70 unido a -35 y -10, y LacI unido al operador.</b>
Glucosa - IPTG +	+	<b>¡adelante!</b>	<b>CAP-cAMP unido en el sitio CAP activa el promotor, RNAP sigma 70 se unirá y vaciará rápidamente la región del promotor.</b>
<i>cya</i> - IPTG +	-	<b>Ningún cAMP se une a CAP, por lo que CAP no se unirá al sitio CAP y el promotor no está activado.</b>	<b>~ nada</b>

*cya*- = un mutante en el gen adenilato ciclasa.

**CAP-cAMP** la activación del promotor *lac* incrementa la transcripción en ~50 veces, por lo que se asume que la actividad LacZ se refiere a su actividad altamente activada (activada por CAP y no reprimida por LacI).

10) Está estudiando un operón bacteriano de reciente identificación llamado *ygo*. Parece estar regulado transcripcionalmente por YGP y por el producto de una pequeña molécula llamada del operón, YGO. Está transcrito por el ARNP plus sigma 70.

a) A continuación se muestran los resultados de un análisis genético de la regulación del promotor utilizando una fusión de promotor a *lacZ*. Interprete cada resultado rellenando la columna de defecto molecular y señale si la mutación es cis o trans. Asuma que en todos los casos el indicador *lacZ* no ha mutado.

genotipo	YGO +	YGO -	wt YGP + + YGO -	wt Pygo + + YGO -	defecto molecular	tipo de mutación
wt	-	+++	na	na	ninguno	
mutante 1	+++	+++	+++ / +++	+++ / +++	<b>Defecto del operador (no se puede unir al represor YGP) (El segundo operón que ha añadido para comprobar cis contra trans está reprimido, pero también fusionado a LacZ, que se acaba de crear. Habría estado más claro si se hubiera fusionado a un gen diferente como el luciferasa, como ya se vio en clase.)</b>	<b>Constitutivo (cis)</b>
mutante 2	-	-	- / -	- / +++	<b>Defecto del promotor</b>	<b>No-inducible (cis)</b>
mutante 3	+++	+++	- / +++	+++ / +++	<b>El represor YGP no se une al operador +/- inductor YGO</b>	<b>Constitutivo (trans recesivo)</b>
mutante 4	+++	+++	+++ / +++	+++ / +++	<b>Mutante represor YGP no reprime y bloquea la represión wt</b>	<b>Constitutivo- no represivo, dominante negativo (trans)</b>
mutante 5	-	-	- / -	- / -	<b>El represor YGP une el operador independiente del inductor YGO y no lo libera.</b>	<b>No inducible (trans dominante)</b>

Obsérvese que los mutantes 1 y 4 tienen los mismos fenotipos, pero también hay otras dos mutaciones posibles que podrían causarlos.

b) Ud. aísla una sexta mutación que tiene un fenotipo como el del mutante 3, con la excepción de que si sobreexpresa la proteína 6 mutante (una trans-mutación) la represión se observaría ahora en presencia de YGO. ¿Cómo podría explicar este hecho? ¿Qué ensayo podría realizar para probar su tesis y cuál es el resultado que esperaría?

Cuando YGO de tipo salvaje (YGOwt) se une a YGP, podría unirse también al operador de manera cooperativa y la mutación 6 elimina esta unión cooperativa. La sobreexpresión podría entonces suprimir el efecto de pérdida de cooperatividad y restaurar la represión. Para verificar esta hipótesis utilice un ensayo de retardo en gel del promotor del operón de *ygo*, con concentraciones en aumento de YGPwt o del mutante 6 en presencia de YGO. A continuación se muestra el resultado de la unión de YGPwt con el operador cooperativamente cuando está activado por el YGO y el mutante 6.

