

Pregunta 1. Se está estudiando la regulación de la síntesis de tirosina en un eucariota unicelular. Se cree que la enzima Tyr1, que añade el grupo hidroxilo al anillo aromático, puede ser un componente clave regulado de esta vía biosintética. Una actividad enzimática importante de Tyr1 se puede ver únicamente en células cultivadas en un medio **sin** la adición de tirosina. Tras haber identificado el promotor del gen Tyr1, éste se funde con una construcción indicadora para iniciar el estudio de la regulación de Tyr1. Sin embargo, los resultados obtenidos resultan sorprendentes:

	<u>actividad β-Gal</u>	
	<u>-Tyr</u>	<u>+Tyr</u>
Fusión promotor de Tyr1 – gen β-Gal	++++	++++

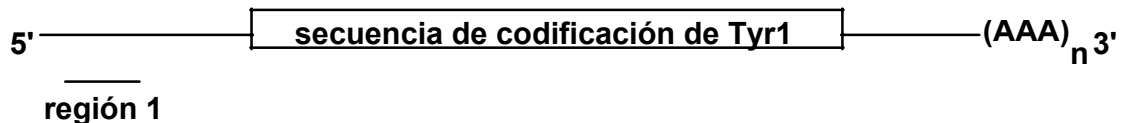
1a. ¿Qué nos indica esto sobre la regulación de la actividad de Tyr1? Describir un experimento sencillo que se podría utilizar para confirmar la hipótesis formulada.

Dado que no se produce ningún cambio en el producto del gen indicador bajo ninguna de las dos condiciones, la regulación de la actividad del gen Tyr1 no tiene lugar a nivel transcripcional.

Un modo de estudiar esto en mayor profundidad sería con una transferencia Northern. Si utilizando una sonda marcada para el gen Tyr1, se observan niveles similares del ARNm de Tyr1 en células cultivadas bajo ambas condiciones, se podría concluir que la regulación ha sido traduccional o postraduccional. (Si se observa un cambio, entonces las diferencias en la estabilidad del ARNm bajo distintas condiciones serían una implicación probable, puesto que la actividad del promotor parece inalterada).

1b. Se sospecha que la estructura del ARN puede tener un papel en la regulación de Tyr1. Un amable **postdoctor** nos ayuda con una serie de ensayos de protección de nucleasa y encontramos una región en el ARNm maduro, purificado de estas células, que parece contener una estructura secundaria importante. Esta región se encuentra aproximadamente a 200 pb por encima del codón de iniciación.

escala: — = 200 pb



¿Cómo podría afectar esta región de la estructura secundaria a la expresión de la proteína Tyr1? ¿Cómo se podría comprobar si este elemento estructural ha participado en la regulación de Tyr1?

Dada la posición de esta región estructural secundaria sobre el codón de iniciación, dicha región puede afectar a la iniciación de la traducción. El eIF4 no podrá facilitar la carga del ribosoma del ARNm adyacente al cap 5' si no se elimina la estructura secundaria del ARN. Aunque el eIF4a y el eIF4b sean capaces de "aplanar" estas estructuras en muchos ARNm, en el caso del ARNm de Tyr1 un factor se podría unir a esta estructura y estabilizarla en presencia de tirosina y bloquear este paso en la iniciación de la traducción.

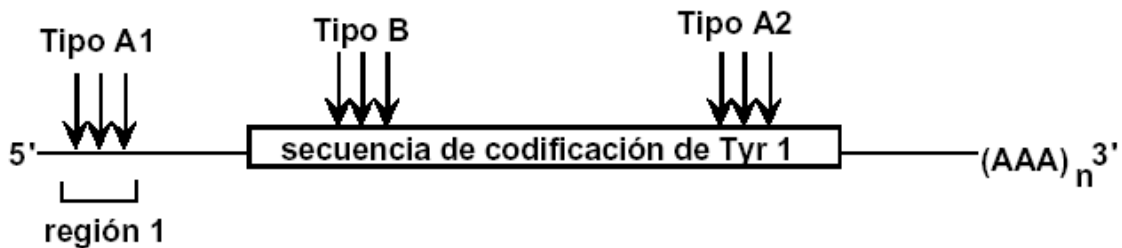
Se podría estudiar el papel de esta región de dos maneras complementarias:

- i. Eliminando esta región del gen y observando si la inhibición dependiente de la tirosina de la actividad de Tyr1 disminuye o desaparece (se comprueba si la región es necesaria para a regulación).
- ii. Insertando esta región en un gen indicador en una posición similar por encima de su codón de iniciación y observando si la actividad del producto del gen indicador se regula ahora a través de la tirosina (se comprueba si la región es suficiente para la regulación).

1c. A continuación, se generan mutaciones que cambian los niveles de actividad de Tyr1. Se identifican una serie de cepas mutantes con mutaciones puntuales que mapean en el interior del gen Tyr1. A continuación, se muestran los fenotipos de tres clases de cepas:

	<u>Actividad de Tyr1</u>	
	<u>-Tyr</u>	<u>+ Tyr</u>
De tipo salvaje	++++	+
Tipo A 1	++++	++++
Tipo A 2	++++	++++
Tipo B	+	+

Las ubicaciones de las mutaciones específicas dentro del gen Tyr1 se muestran a continuación (nota: todas las mutaciones de la secuencia de codificación son sustitutivas):



Un artículo publicado recientemente ha identificado varios dominios en la proteína Tyr1. Ninguna de las mutaciones anteriores entraba en el dominio catalítico de la proteína. Además, las proteínas Tyr1 mutantes purificadas de todas las cepas mutantes muestran una actividad enzimática normal *in vitro*. Las mutaciones en las cepas de tipo A2 se encuentran todas en una región de la proteína que es innecesaria para la función enzimática *in vitro* y que no tiene ninguna función conocida. Las mutaciones en las cepas de tipo B se encuentran en una región que muestra participar en la unión de tirosina.

Utilizando todos estos datos, sugerir una explicación para los defectos que hay en cada una de estas cepas mutantes e indicar cuál es la función normal en las células de tipo salvaje de las regiones del gen Tyr1 en las que se encuentran dichas mutaciones.

Tipo A1: Estos mutantes han alterado o eliminado la estructura de ARN encontrada en la región 1. Normalmente, esta estructura sirve para bloquear la traducción del ARNm de Tyr1 en presencia de tirosina (por medio del mecanismo descrito en el apartado a). En estos mutantes, la ausencia de la estructura de ARN de tipo salvaje permite que la traducción se produzca bajo las dos condiciones.

Tipo A2: Estos mutantes han alterado o eliminado una región de la proteína Tyr1 que participa en la regulación de la traducción de su propio ARNm. Esta parte de la proteína podría interactuar directamente con el ARNm o bien afectar indirectamente al ARNm a través de las interacciones con otras proteínas. En cualquier caso, el efecto final

sería la estabilización, en presencia de tirosina, de la estructura de ARN encontrada en la región 1 y la prevención de la traducción de Tyr1. La ausencia de esta estabilización en las cepas mutantes conlleva a la expresión no regulada de la proteína Tyr1.

Tipo B: La proteína Tyr1 contiene un sitio de unión regulador alostérico para la tirosina, el cual se encuentra alterado en estos mutantes de una de las siguientes formas:

i. La tirosina está enlazada con una afinidad mucho más elevada que en la proteína Tyr1 de tipo salvaje y, por tanto, el sitio permanece ocupado incluso en ausencia de tirosina adicionada externamente.

ii. La conformación del dominio se ve alterada con el fin de quedar permanentemente en la forma "tirosina-enlazada", incluso en ausencia de tirosina.

Este sitio alostérico funciona, normalmente, para percibir los niveles de tirosina en la célula: cuando la tirosina es abundante, el sitio está ocupado y Tyr1 es capaz de eliminar su propia traducción (a través de la acción de la región A2); cuando la tirosina escasea, el sitio está vacío y la proteína Tyr1 adopta entonces una conformación incapaz de eliminar su propia traducción. En los mutantes, este sitio y la proteína Tyr1 se encuentran siempre en la conformación "tirosina-enlazada" que elimina la traducción.

1d. Preparamos todo para identificar los supresores de uno de los mutantes de tipo A1. Nos encontramos con que las mutaciones puntuales ubicadas en dos áreas son capaces de restablecer la actividad de Tyr1, con regulación normal, a estas células: el área definida por los mutantes de tipo A1, así como el área definida por los mutantes de tipo A2. ¿Cómo funcionan estos dos tipos distintos de supresores? ¿Qué implica esto en la regulación de la actividad de Tyr1? Dar un modelo lo más completo posible.

Los supresores ubicados dentro de la región A1 probablemente restablecen la estructura secundaria de ARN de tipo salvaje identificada en el apartado (b) restableciendo las interacciones de los pares de bases con mutaciones complementarias a las mutaciones de A1 originales (véase la pregunta 7 del boletín de problemas nº 3 para más detalles sobre este tipo de supresión).

La existencia de supresores en la región A2 de la proteína Tyr1 implica que el dominio de esta proteína contacta físicamente con la estructura de ARN de la región 5' del ARNm de Tyr1. Los supresores contienen mutaciones que alteran la proteína y le permiten unirse a la estructura de ARN mutante. En este caso, la proteína Tyr1 mutante y el elemento estructural del ARN mutante interactúan de forma similar a como lo hacen la proteína Tyr1 de tipo salvaje y el elemento estructural del ARN de tipo salvaje.

MODELO: Cuando los niveles de tirosina en la célula son elevados, la proteína Tyr1 se une a la molécula de tirosina en su sitio alostérico (identificado por los mutantes B). Cuando la tirosina está enlazada a Tyr1, la proteína puede utilizar un dominio (definido por los mutantes de A2) para unirse al elemento estructural del ARN por encima del codón de iniciación y estabilizarlo. Esto entonces evita que el eIF4 lleve el ribosoma al ARNm y no habrá ninguna otra traducción de Tyr1. De este modo, los niveles de la proteína Tyr1 seguirán siendo bajos en la célula.

Cuando los niveles de tirosina sean bajos, la proteína Tyr1 no tendrá una molécula de tirosina unida y será incapaz de asociarse con el elemento estructural del ARN. Entonces, el eIF4 podrá llevar el ribosoma hasta el ARNm y será capaz de iniciar la traducción del mensaje de Tyr1 e impulsará los niveles de proteína Tyr1.

1e. Describir un experimento que se podría utilizar para probar el modelo del apartado d). Incluir controles que utilicen las formas mutantes del gen Tyr1.

Un experimento de retardo en gel utilizando el ARNm de Tyr1 y la proteína Tyr1 sería de gran utilidad. La proteína Tyr1 sólo se debería unir al ARNm de Tyr1 en presencia de tirosina. En ausencia de ésta, la proteína Tyr1 no debería dar lugar a una alteración en el gel con el ARNm de Tyr1. Además, no debería haber (i) ninguna unión entre la proteína Tyr1 de tipo salvaje y los ARNms mutantes de A1 y (ii) ninguna unión entre la proteína Tyr1 mutante de A2 y los ARNms de tipo salvaje.

Pregunta 2 (12 puntos). Se han identificado una serie de mutaciones en el ARNt de alanina que son defectuosas en la traducción. Interesa determinar qué función es defectuosa en cada mutación.

Describir brevemente cómo se podrían detectar las mutaciones que son defectuosas en las siguientes actividades si se tiene acceso a cualquier proteína purificada, aminoácido o ARN que pueda ser necesario para ello.

2A (3 puntos). Acoplamiento a la alanina.

Se podrían utilizar varios diseños experimentales distintos para detectar si el ARNt de la alanina es defectuoso en la traducción por no poder ser "cargado" con alanina. Lo más sencillo sería combinar el ARNt, la sintetasa del ARNt de la alanina y el ATP con alanina radiomarcada. Introducir los productos de esta reacción en un gel y teñir con EtBr para identificar la ubicación del ARNt. Luego, secar el gel y exponerlo en una película. Si el ARNt mutante se puede cargar, lo lógico es que la señal radioactiva **comigre** con el ARNt. Sin embargo, si el ARNt es defectuoso en la carga, los aminoácidos radioactivos permanecerán en el fondo del gel.

Otras posibilidades incluyen una reacción "de carga" similar *in vitro*, seguida por una unión en filtro en la que el filtro ha sido tratado para unirse al ARN, pero no a las proteínas o aminoácidos libres. Si se observa una señal radioactiva en el filtro, significa que el ARNt ha sido cargado.

2B (3 puntos). Interacción con EF-Tu.

Aquí valdría cualquier experimento que pudiera determinar si Ef-Tu es capaz de unirse al ARNt. Una posibilidad sería un ensayo de unión en filtro en el que el filtro haya sido tratado para unirse sólo al ARN. Habría que combinar el ARNt, el Ef-Tu radiomarcado y GTP; pasar la mezcla a través del filtro, lavarlo y observar si ha quedado radioactividad en el filtro. Si se detecta alguna señal radiactiva, significa que el Ef-Tu se puede unir al ARNt. Otras posibilidades son: ensayo de retardo en gel, IP (tras la unión cruzada), columna de afinidad, etc. Un ensayo de interferencia **por modificación** también valdría, si se supone que la interacción ARNt/Ef-Tu es necesaria para la protección del sitio A.

En este caso, no se otorgaron puntos por centrifugación en gradiente de sacarosa. La resolución de un gradiente de sacarosa no es lo bastante buena como para separar el EF-Tu unido al ARNt del ARNt libre. Ya sean mutantes o de tipo salvaje, el resultado sería el mismo en una separación de gradiente de sacarosa y se podría obtener como resultado un falso negativo.

2C (3 puntos). Interacción con el ribosoma.

Dado que el ribosoma es un complejo bastante voluminoso del ARN y de las proteínas, probablemente lo más sencillo sea utilizar gradientes de densidad de sacarosa para estudiar si el ARNt mutante es capaz de unirse al ribosoma. Se querría combinar el ARNt mutante radiomarcado cargado, Ef-Tu, GTP (o, mejor aún, GMP-PCP) y el ribosoma, para luego añadir esta mezcla a la parte superior de un gradiente de densidad de sacarosa. Después, la centrifugación eliminará las fracciones y realizará transferencias *Northern* (sondando con un fragmento de ADN complementario a la secuencia de ARNr) con el fin de detectar las fracciones que contienen el ribosoma. Emplear un contador de centelleo para identificar la ubicación del ARNt cargado. Si la señal radioactiva coeluye en las mismas fracciones que el ribosoma, sabremos que el ARNt es capaz de interactuar con el ribosoma.

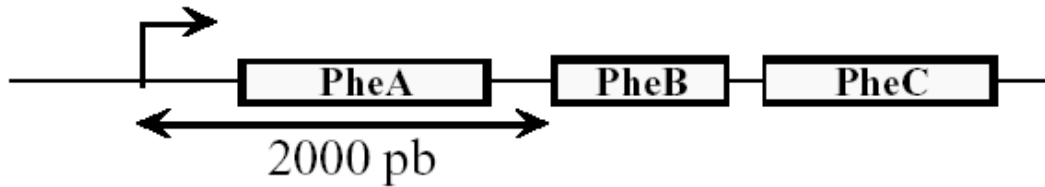
Otra respuesta frecuente ha sido utilizar un ensayo de interferencia por modificación, buscando la protección del sitio A (debido a las interacciones del EF-Tu y el ARNt).

2D (3 puntos). Para cada uno de los tres defectos potenciales, ¿cuáles cabría esperar que estuvieran en las regiones del Ala-ARNt que se conservan en todos o, al menos, en la mayoría de los ARNt? ¿Cuáles se esperaría que estuvieran en regiones del Ala-ARNt que son únicas?

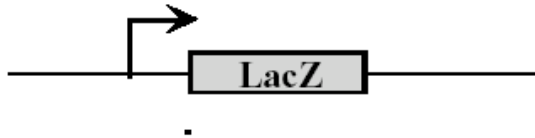
La región del ARNt de alanina necesaria para reconocer la alanina es, probablemente, única para este ARNt. Cada ARNt dispone de una única región que participa en la unión del aminoácido específico correspondiente al anticodón del ARNt. Los dominios del ARNt que interactúan con el Ef-Tu y el ribosoma son, probablemente, frecuentes para todos los ARNt (conservados), dado que todos los ARNt – independientemente del aminoácido que porten—necesitan mantener estas interacciones para ser funcionales. (1 punto cada una).

Mucha gente escribió todas las regiones únicas y conservadas del ARNt, pero eso no es lo que se pedía en la pregunta. En este caso, se otorgó parte de la puntuación, dependiendo de si se conectaban o no estas regiones a los defectos descritos en 3A-3C.

Pregunta 3 (30 puntos). Se está estudiando la regulación del operón de la fenilalanina en *E. coli*. Este operón codifica un ARNm para tres proteínas necesarias para que las células produzcan Phe.



Como un primer paso para caracterizar la regulación del operón, se funde la secuencia de codificación de LacZ al promotor del operón de la fenilalanina con el fin de examinar la regulación en presencia y en ausencia de Phe. Se obtienen los siguientes resultados:

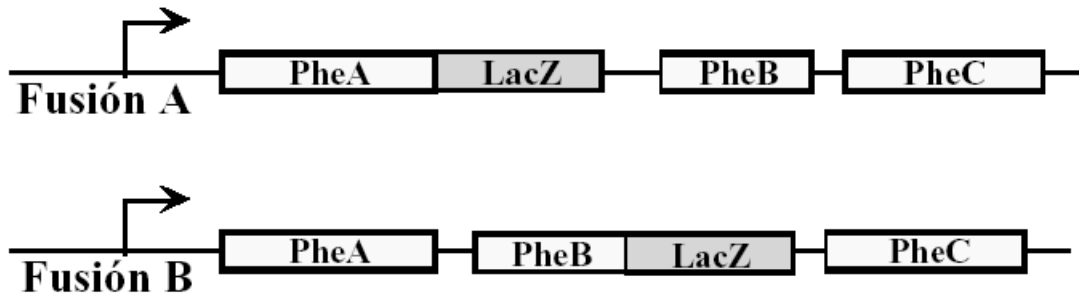


	Prom ^{Phe} -LacZ (Unidades de actividad β-Gal)
+Phe	500 Unidades
-Phe	2500 Unidades

3A (3 puntos). ¿Qué se puede concluir acerca de la regulación del operón a partir de estos resultados? Prestar especial atención a la fase de biosíntesis regulada, así como a cualquier supuesto que se haya adoptado para llegar a dicha conclusión.

Para extraer conclusiones a partir de los niveles de expresión de LacZ, es necesario suponer que LacZ es estable en estas células y que la actividad o estabilidad de LacZ no se ve afectada por la presencia o la ausencia de fenilalanina (1 punto). Dados estos supuestos, los datos indican que la expresión del operón Phe está regulada transcripcionalmente (1 punto) y que la regulación depende de los niveles de fenilalanina en la célula. El operón se induce cuando hay poca fenilalanina y se reprime cuando ésta es abundante (1 punto).

Resulta sorprendente encontrar sólo un cambio de orden 5 en presencia de Phe ya que, generalmente, los estudios de otros operones que participan en el metabolismo de aminoácidos muestran una represión de entre 200 y 1000 en presencia del aminoácido que sintetizan. En busca de una regulación adicional, se funde la región de codificación de LacZ con el terminal C de las regiones de codificación de PheA o de PheB. En cada caso, se observa que la proteína de fusión está activa para la actividad de β-Galactosidasa.



Se estudia la actividad de LacZ en cepas que contienen una u otra construcción en presencia o ausencia de Phe. Los resultados que se obtienen son los siguientes:

	<u>Fusión A</u>	<u>Fusión B</u>
+Phe	500 Unidades	2 Unidades
-Phe	2500 Unidades	2500 Unidades

3B (3 puntos). ¿Qué se puede concluir sobre la regulación de las proteínas de PheA y PheB basándose en estos datos?

Mediante la realización de fusiones de génicas de LacZ con PheA y PheB, se puede observar la regulación traduccional (1 punto) de estos dos genes. Pero siguen siendo necesarios los mismos supuestos generales sobre la actividad LacZ que se emplearon en la pregunta 5a. Estos resultados indican que PheA no está regulado a nivel traduccional, dado que LacZ fundido con PheA presenta la misma actividad que cuando estaba controlado únicamente por el promotor de Phe (1 punto). El gen PheB no solo está regulado transcripcionalmente, sino también traduccionalmente, dado que la actividad de LacZ en ausencia de fenilalanina es incluso más baja en la fusión de la proteína. Así, la traducción de PheB está regulada negativamente por la presencia de fenilalanina (1 punto).

Ante la intriga causada por los experimentos de sustitución de LacZ, se pretenden identificar las mutaciones en el operón Phe que alteran la regulación observada. Para ello, se inducen mutaciones en las células de E. Coli que contienen la construcción **Fusión B**. Se buscan colonias azules (= expresión elevada de LacZ) en presencia de Phe o blancas (=ninguna o baja expresión de LacZ) en su ausencia.

Utilizando estos modelos se identifican **tres clases de mutantes** y se les llama mutantes para el control de la respuesta de fenilalanina (Cpr). Cpr1 y Cpr2 son constitutivamente blancos y Cpr3 es constitutivamente azul.

3C (5 puntos). Describir el modo en el que se podría determinar si cada mutante Cpr actúa en *cis*- o en *trans*- con respecto al operón Phe.

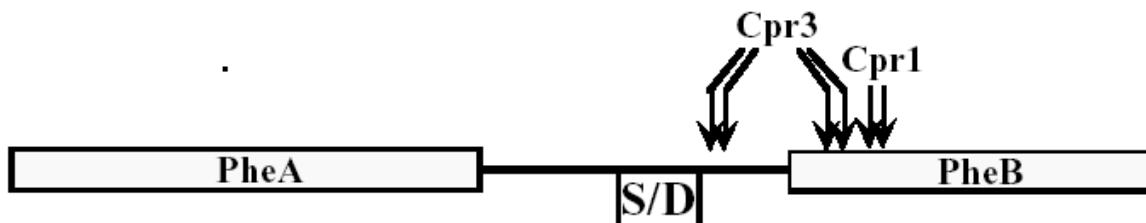
Para determinar si cada uno de los mutantes Cpr está actuando en *cis* o en *trans* se pretende añadir a las células una segunda construcción del gen indicador. Se podría utilizar un plásmido que contenga el promotor de Phe y una fusión PheB-luciferasa (es decir, una construcción Fusión B extra con luciferasa en lugar de LacZ). Nota: dado que estos mutantes se aislaron en el contexto de la construcción Fusión B, son mutaciones que afectan a la regulación transcripcional y traduccional de PheB. Una fusión del promotor (como en el apartado 5A) NO permitirá un estudio de *Cis-Trans*, ya que no permite la observación de la regulación traduccional (2 puntos por cada construcción correcta).

Esta construcción permitirá determinar si los mutantes Cpr afectan a la regulación traduccional o a la transcripcional de PheB en *cis* o *trans*. Si la mutación actúa en *trans*, cabe esperar que la actividad de la luciferasa presente el mismo fenotipo que la actividad de LacZ (es decir, el fenotipo mutante). Si la mutación actúa en *cis*, entonces la actividad de la luciferasa debería presentar una regulación de tipo salvaje (baja en *phe+* y alta en *phe-*) (3 puntos por el análisis de los resultados).

Mediante la prueba *cis-trans* se averigua lo siguiente:

Los mutantes Cpr1 actúan en *cis*
 Los mutantes Cpr2 actúan en *trans*
 Los mutantes Cpr3 actúan en *cis*.

Para determinar dónde se ubican las mutaciones que actúan en *cis*, se secuencian el operón Phe a partir de cepas mutantes Cpr1 y Cpr3 y se encuentran mutaciones en los siguientes sitios cerca del AUG de PheB:



3D (4 puntos). Basándose en las averiguaciones realizadas hasta el momento, ¿cómo pueden estar influenciando las mutaciones Cpr3 la regulación del operón Phe?

Las mutaciones Cpr3 actúan en *cis* y llevan a la expresión constitutiva de PheB. La naturaleza simétrica de las mutaciones Cpr3 sugiere que las mutaciones pueden estar rompiendo la horquilla. La posición de las mutaciones justo a continuación de la secuencia S/D sugiere que se puede estar formando una horquilla para inhibir la traducción de PheB. Sabemos por los datos de la regulación traduccional que la traducción de PheB sufre una fuerte represión en presencia de fenilalanina, por lo que la formación de esta horquilla debe depender de elevados niveles de fenilalanina (2 puntos por la horquilla y otros 2 por reconocer que depende de los niveles de *phe* y que afecta a la TRADUCCIÓN).

Otra respuesta que se dió a esto era que la fenilalanina o un regulador dependiente de *phe+*, se había enlazado a Cpr3, bloqueando la traducción de PheB. Esto es improbable, debido a la naturaleza simétrica de las mutaciones. Sin embargo, se otorgó algo de puntuación por esta respuesta (2 puntos).

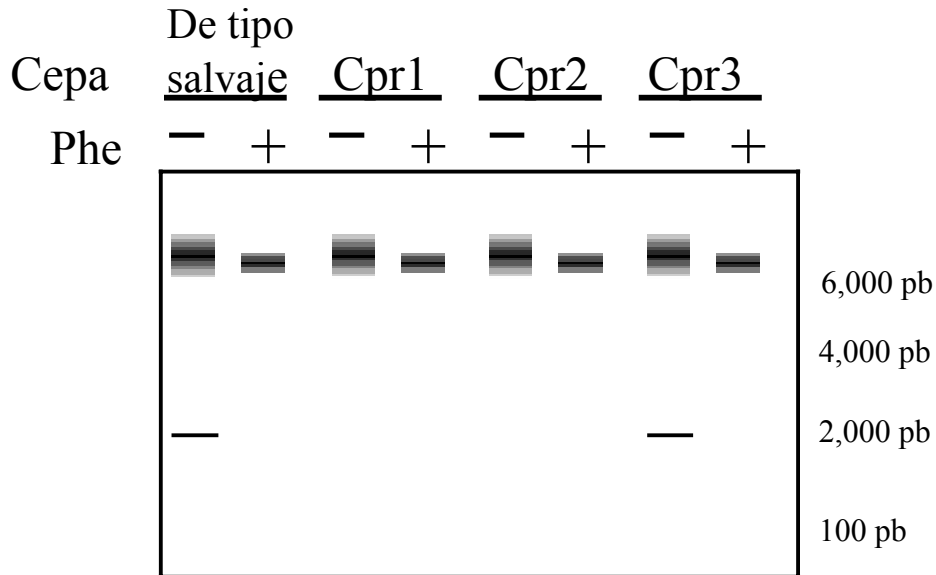
3E (4 puntos). Describir brevemente cómo probar la hipótesis anterior.

Se podría probar utilizando un ensayo genético o uno bioquímico. Se ha demostrado que los supresores de las mutaciones que rompen las horquillas restablecen el apareamiento de bases apropiado. Por ejemplo, si se produjera una mutación de A a G, el supresor estaría junto a ella y se podría ver un cambio de T a C. Este tipo de análisis de los supresores puede proporcionar más datos de que la mutación Cpr3 realmente rompe la horquilla.

Para probar esto bioquímicamente se podría utilizar RNasa S1 y RNasa SV en un ensayo de protección de ARN mutante y de tipo salvaje. Con esto, se esperaría ver el característico tronco de cadena doble de la horquilla en el ARN de tipo salvaje, pero no en los mutantes Cpr3.

Los alumnos que hayan utilizado un “modelo de represión de unión” en el apartado 5D y, en esta sección, dispongan de un buen ensayo, recibirán puntos por ello. Sin embargo, la unión de fenilalanina (la aa) no proporcionará un patrón de protección DNasa o RNasa –simplemente es demasiado pequeña. Sería necesario formular una hipótesis sobre la unión de proteínas para utilizar ese ensayo..

Las mutaciones Cpr1 y Cpr2 continúan siendo desconocidas. Inicialmente, se sospechó un atenuador similar al operón Trp, pero no se encontró **ningún codón de iniciación entre el codón de parada del gen PEA y el ATG del gen PheB** y el **único terminador** en el ARNm se encuentra tras el gen PheC. No obstante, se observa la transcripción del operón Phe mediante una transferencia *Northern* y se obtienen los siguientes resultados:



Después de asegurarnos una vez más de que no hay terminador en el área de 2000 pb del sitio de iniciación de la transcripción, observamos que esta región está cerca del sitio de las mutaciones Cpr1 y Cpr3 que actúan en *cis*.

Puesto que los mutantes Cpr2 tampoco forman el transcrito de 2000 pb en condiciones de poca Phe, nos preguntamos si Cpr2 se une al ARN o al ADN en el sitio de Cpr1.

3F (5 puntos). Describir cómo se podría determinar si es éste el caso utilizando una proteína Cpr2 purificada proporcionada por un generoso compañero de laboratorio. Se puede hacer cualquier sonda de ADN o ARN que se quiera.

Para analizar si Cpr2 se une al ADN o al ARN se podría realizar un ensayo de retardo en gel utilizando el transcrito de ARN purificado del operón Phe o un fragmento de ADN que contenga dicho operón. Estos dos fragmentos estarían marcados en sus respectivos extremos 5' para facilitar la visualización. Luego, se cargarían los fragmentos con y sin Cpr2 purificado y se preguntaría si la banda se ha elevado debido a la unión de Cpr2.

Otra buena respuesta era la de utilizar un ensayo de unión en filtro con proteína Cpr2 no marcada y ARN marcado o ADN de cadena doble marcado que contenga el sitio de Cpr1. El filtro debería retener la proteína y dejar pasar el ARN y el ADN de cadena doble. La radioactividad sólo permanecerá asociada al filtro si la proteína se ha enlazado al ADN o al ARN.

Se observa que la proteína Cpr2 **se une al sitio del ADN de cadena doble** identificado por las mutaciones Cpr1, pero que **no se une a la forma de ARN** del sitio Cpr1. Curiosamente, sólo se hay unión en ausencia de Phe.

3G (6 puntos). Proponer un modelo que explique cómo Cpr2 puede influenciar la traducción del gen PheB uniéndose al ADN de cadena doble.

Cpr2 podría influenciar la traducción de PheB uniéndose al ADN de cadena doble en caso de participar en pausar la transcripción del gen PheB. El paso clave en la regulación traduccional de PheB está en si la horquilla del tronco que bloquea la secuencia S/D es o no capaz de formarse. Puesto que la transcripción y la traducción están ligadas en los procariotas, la formación de la horquilla podría estar controlada por el tiempo de transcripción y, especialmente, si se pausa la transcripción, de modo que el ARN necesario para formar la horquilla no sea liberado por la máquina de transcripción. Las mutaciones Cpr1 y Cpr2 son críticas a la hora de establecer del tiempo adecuado para evitar que se forme la horquilla. Cpr2 probablemente se une al sitio del ADN que las mutaciones Cpr1 han codificado para ello y físicamente bloquea la transcripción en ausencia de Phe. El ARN necesario para formar la horquilla no se libera inmediatamente y la traducción tiene una oportunidad para ponerse al día. Cuando se acaba la pausa, el ARN recién transcrito se traduce inmediatamente originando la producción de PheB. En presencia de Phe, Cpr2 no se puede unir ni bloquear la transcripción, se forma la horquilla y no se produce PheB. El producto de 2000 pb observado mediante un análisis *Northern* es el transcrito del ARN que se crea cuando la ARN Polimerasa está pausada por Cpr1. Esto no se ve en los mutantes Cpr1 o 2, ya que estas mutaciones impiden la pausa.

Para obtener la totalidad de la puntuación era necesario mostrar una detallada comprensión de los procesos que tienen lugar + y - phe (por qué el ARNP se detendría, formación o no de la horquilla, acoplamiento transcripcional y traduccional, etc.). Las respuestas que mostraban una comprensión parcial de los datos, pero no proporcionaban un modelo completo, han recibido parte de la puntuación.

Problema 4. Imaginemos que somos un UROP que trabaja en un nuevo gen de telomerasa en un ciliado poco estudiado. Clonamos el gen, pero no logramos descifrarlo de la secuencia de ADN donde la fase de lectura abierta empieza y acaba. Desconcertados, consultamos nuestros apuntes del 7.28 y recordamos que los ciliados a menudo presentan extraños códigos genéticos. Decidimos entonces que descifrar el código genético del ciliado será un proyecto mucho más interesante que trabajar con telómeros.

4a) Ni siquiera estamos seguros de que el ciliado utilice un código ternario, pero dado que tiene 20 aminoácidos, ¿por qué creemos que es lo más probable? (¿Qué hay de malo en un código binario o cuaternario?)

Un código binario codificaría sólo $4^4=16$ codones diferentes. Un código cuaternario codificaría $4^4 \cdot 4^4=256$ codones, muchos más de los necesarios.

4b) ¿Cuál es el número mínimo de ARNts que una célula necesita para ser capaz de reconocer los 64 codones ternarios posibles?

La primera base del anticodón se puede aparear débilmente con la última base del codón, por lo que tener G o U en la primera posición reconocería, respectivamente, codones con U o C y codones con A o G, en la última posición. Por tanto, en lugar de $4^4 \cdot 4=64$ codones posibles, serían necesarios sólo $2^4 \cdot 4=32$ anticodones. Además, dado que el codón de parada no lo reconoce el ARNt, sino un factor de liberación, podemos extraer un anticodón por cada codón de parada.

4c) Siguiendo los pasos de Ghobind Khorana, realizamos un extracto celular del ciliado y lo programamos con varios polímeros de ARN para ver qué proteínas se forman. ¿Cuáles son los cuatro codones más sencillos de descifrar? ¿y cómo hacerlo?

Hacer los polímeros de cada ribonucleótido y comprobar qué aminoácido se sintetiza. Esto nos indicará lo que codifican UUU, AAA, GGG y CCC.

4d) A continuación decidimos hacer copolímeros aleatorios de G y U mezclando los ribonucleótidos y recuperar los polipéptidos que tengan ocho aminoácidos diferentes. ¿Cómo podemos resolver cuál de los ocho posibles codones codifica a cuál de los ocho aminoácidos recuperados? ¿Qué codones no se podrían distinguir con nuestro método?

Cambiar los promedios de Gs a Us. Eso debería cambiar los promedios de los diferentes codones presentes en nuestros ARNs. Entonces, podremos ver el porcentaje de codones que deberían tener 3 Us, 2 Us y 1 U para, a partir de ahí, asociarlo con el porcentaje de cada uno de los aminoácidos recuperados. Sin embargo, no podemos distinguir entre los tres codones diferentes que tienen 2 Us (UUG, UGU y GUU), ni entre los tres codones distintos que tienen 1 U (UGG, GUG y GGU). Para resolver esto, es necesario hacer copolímeros repetidos de secuencias específicas, tales como (UUG) $_n$.

4e) Hacemos lo mismo con Gs y As, pero recuperamos menos de los 8 aminoácidos esperados. ¿Cuál es el número máximo de aminoácidos que podrían codificar los 8 posibles codones G y A? ¿Por qué?

¡Cuatro! Sólo hay un posible anticodón de ARNt que reconoce a GGA (UCC), y que reconocerá también al codón GGG. Del mismo modo, el anticodón UUC reconocerá a GAA y a GAG, el anticodón UUU reconocerá a AAA y a AAG y el anticodón UCU hará lo mismo con AGA y AGG.

4f) Observamos incluso menos aminoácidos que el número máximo calculado como posible en el apartado e. ¿Qué explicación puede tener esto y cómo podríamos comprobarlo?

Uno de los codones codifica una parada. Introducir los polipéptidos sintetizados en un gel de poliacrilamida SDS y observar si son más cortos que los sintetizados a partir de polímeros aleatorios de Gs y Us (si hay un codón de parada, los polipéptidos deberían tener una media de largo de apenas 8 aminoácidos).

Problema 5. Nos interesa estudiar la iniciación de la traducción con fMet- ARNt en la levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae*. En especial, nos gustaría investigar los componentes específicos del sistema que direcciona la iniciación al primer AUG. Concretamente, estamos intrigados por la habilidad que presenta el sistema para distinguir entre los AUG internos que codifican metionina y el primer codón AUG que inicia con formil-Metionina.

Para investigar, en un principio, cómo distingue el sistema los distintos codones AUG, mutamos el ARNt que se une a la Metionina. En la secuencia del ARNt identificamos tres bases que son responsables de su capacidad para reconocer el primer AUG como el codón de iniciación. A continuación, mutamos estas tres bases, de modo que el ARNt pierde su capacidad para diferenciar el codón de iniciación de los AUG internos, pero presenta su habitual capacidad para ser cargado con la fMetionina y aparearse con la secuencia AUG. Por último, reemplazamos el alelo de tipo salvaje del ARNt de nuestra célula por su versión mutante.

5a) ¿Qué fenotipo cabría esperar de nuestra cepa mutante? Dar una explicación para el origen de este fenotipo.

No esperaríamos que se iniciara la traducción. Un posible método que el fMet-ARNt emplea para distinguir el primer AUG de los AUG internos es su asociación con eIF-2. El eIF-2 puede reconocer una secuencia en el fMet-ARNt. Entonces, puede traer el ARNt hasta el sitio p parcial de la subunidad 40s del ribosoma para la iniciación. Si las tres bases mutadas son responsables de la interacción entre el eIF-2 y el fMet-ARNt, fracasaríamos en el intento de cargar el fMet-ARNt en el sitio p parcial, así como al iniciar.

Al darnos cuenta de nuestro error, construimos una cepa que, en esta ocasión, expresa tanto el alelo de tipo salvaje de la fMetionina unida al ARNt como el alelo mutante.

5b) ¿Qué fenotipo se espera en este caso? Explicar.

Dado que estamos expresando el alelo de tipo salvaje de la fMet unida al ARNt, podemos iniciar la traducción con normalidad. Sin embargo, puesto que estamos expresando también el ARNt mutante, es posible que se inserte un formil-Metionina, en vez de una metionina normal, en un AUG interno. Esto puede suceder si el fMet-ARNt se asocia con EF-Tu en lugar de con eIF-2 y es cargado en el sitio A. Si se inserta una fMet, en vez de una metionina normal, en una cadena polipéptica, el resultado será una terminación aberrante de la traducción. Si visualizáramos los polipéptidos en esta cepa (mediante SDS-PAGE), veríamos polipéptidos de distintos largos, pero la mayoría de ellos serían más cortos que un polipéptido en una cepa de tipo salvaje.

5c) Sospechamos que las tres bases que mutamos en la fMethionine unida al ARNt son responsables de la unión a factores de iniciación como eIF2, eIF3 y eIF4. Describir un ensayo que se podría utilizar para probar esta hipótesis. Suponer que se tiene acceso a los ARNt purificados y a los factores de iniciación.

Podríamos realizar un ensayo de unión en filtro para comprobar si el ARNt en estudio se une a alguno de los factores de iniciación. Para este ensayo, se empleará un filtro que retenga las proteínas y, a la vez, permita que el ácido nucleico lo atraviese. En primer lugar, radiomarcamos el ARNt. Luego, incubamos con los factores de iniciación purificados. Pasar la mezcla de proteína/ARNt a través del filtro. Por último, medir la radioactividad que queda en el filtro. La radioactividad representa el ARNt que se retiene en el filtro debido a su unión con los factores de iniciación.

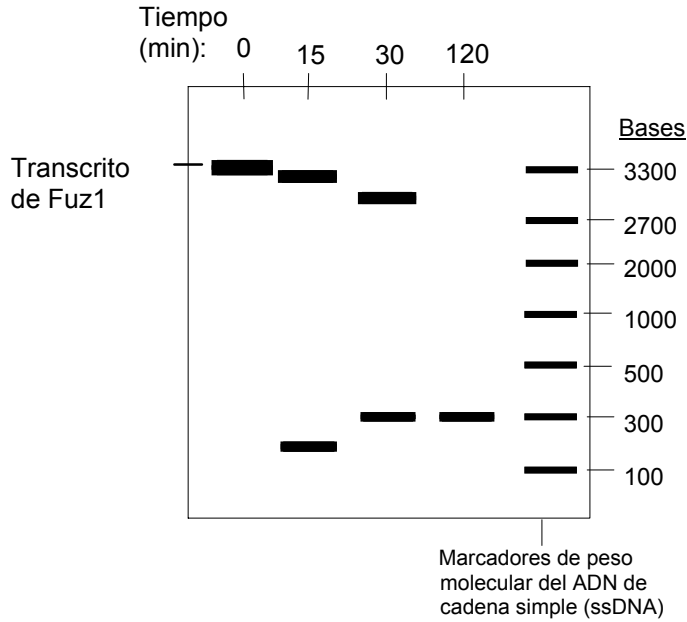
Para comprobar si las tres bases mutadas son responsables de la unión con los factores de iniciación es necesario que, además de nuestro mutante, estudiemos una copia de tipo salvaje del ARNt y que comparemos la radioactividad de los dos alelos.

5d) Decidimos estudiar con más detalle la especificidad del codón del fMet-ARNt. Para ello, mutamos la horquilla del anticodón, de modo que ahora el fMet-ARNt reconoce el codón GUG para la iniciación de la traducción. A continuación, mutamos el codón de iniciación para el gen *HIS* de AUG a GUG. Observamos la traducción del gen *HIS* y nos sorprende ver un polipéptido con un largo inapropiado. Confundidos, hacemos los mismos mutantes del codón y el anticodón, pero esta vez, en el gen *LEU*. Una vez más, obtenemos un polipéptido de longitud inapropiada. Dar una explicación para esto (**nota:** normalmente, hay una fuerte selección en contra de la presencia del codón de iniciación AUG en la región situada entre el 5'-CAP y el primer codón de iniciación).

La expectativa es que la iniciación normal se puede producir al mutar el codón de iniciación para GUG y el anticodón de fMet-ARNt para que reconozca a GUG. Sin embargo, este no es el caso. Es muy probable que el mutante fMet-ARNt reconozca un GUG por encima del codón de iniciación correcto e inicie la síntesis de polipéptidos a partir de ahí. Esto dará como resultado un polipéptido de longitud inapropiada que, además, puede estar fuera del cuadro de lectura correcto. En circunstancias normales, la selección negativa en contra de los AUG situados entre el 5'-CAP y el codón de iniciación correcto previenen esta situación. Sin embargo, esta selección no se da en contra de los codones GUG, por lo que en esta región sí se pueden producir.

Pregunta 6) Para un proyecto UROP de verano decidimos analizar la expresión de genes en un hongo de proliferación elevada aislado de la ducha de nuestro dormitorio. Dado que el organismo parece desarrollarse con tanta eficiencia, deducimos que debe tener una mitocondria excesivamente eficaz y centramos nuestra investigación inicial en genes codificados del ADN mitocondrial. Ilusionados por encontrar un nuevo gen codificado por el genoma mitocondrial, lo llamamos Fuz1.

El transcrito de Fuz1 es muy largo, mucho más de lo que esperábamos para codificar la proteína, más bien pequeña, que pensábamos que sería el producto de Fuz1. Por ello, investigamos si el transcrito es procesado. Para hacerlo, aislamos el ARN largo de Fuz1, marcamos el extremo 5' con ^{32}P y lo incubamos *in vitro* en condiciones de reacción favorables para la autoeliminación de intrones (*self-splicing*) de los grupos de intrones I y II: las reacciones incluyen Mn^{2+} , Mg^{2+} , NaCl, tampón Tris-Cl en pH 6.5 y $^{32}\text{PGTP}$. A continuación se muestra un autoradiograma del curso del tiempo de esta reacción de eliminación de intrones *in vitro*.



6a) Basándose en estos patrones de eliminación de intrones, a qué grupo de intrones pertenece un intrón del ARN de Fuz1, al grupo I o al II? Justificar brevemente esta respuesta.

El ARN de Fuz1 contiene un intrón del grupo I. La clave para averiguar esto está en observar el gel con detenimiento. El ARN de Fuz1 fue marcado únicamente en el extremo 5'. Sin embargo, el autoradiograma muestra que la reacción inicial de eliminación de intrones genera dos productos marcados. Si recordamos los ingredientes que se incluyeron en la reacción, veremos que había GTP marcado. El único modo de detectar tanto el exón1 que ya ha pasado por la eliminación de intrones (y contiene la marca en el extremo 5') como el trozo intrón+exón en 3' sería que la guanina marcada se enlazara de forma covalente al trozo 3' como sucede en los intrones del grupo I. Entonces, el intrón desaparece, porque el intrón del grupo I se circulariza y el trozo de 15 pb cortado, que contiene la guanina marcada, es demasiado pequeño para ser detectado en un gel de agarosa.

6b) Dibujar un diagrama que describa una posible organización del transcrito de Fuz1 antes de su procesamiento, marcando la longitud de todos los intrones y exones.

El exón 1 tiene aproximadamente 200 pb, el intrón unas 3000 pb y el exón 2 aproximadamente unas 100 pb. También es válido proporcionar la estructura compleja de los intrones del grupo I.



6c) Para determinar si el gen Fuz1 es responsable del crecimiento inusualmente rápido del hongo de la ducha, inducimos una mutación en el gen con un mutágeno que da lugar a sustituciones de bases. Una vez más, nuestras sospechas eran correctas; aislamos numerosos mutantes de crecimiento lento de Fuz1. Empezamos a caracterizar estas cepas mutantes, pero el resultado nos decepciona. Estas mutaciones no nos ayudarán mucho a entender la función bioquímica de la proteína de Fuz1, ya que prácticamente todos ellos (al menos un 90%) son totalmente defectivos para expresar la proteína. Tras ver estos resultados, nos enfadamos con nosotros mismos por haber empleado un diseño experimental tan pobre. ¿Por qué son tantas las cepas mutantes totalmente defectivas para la expresión de la proteína de Fuz1?

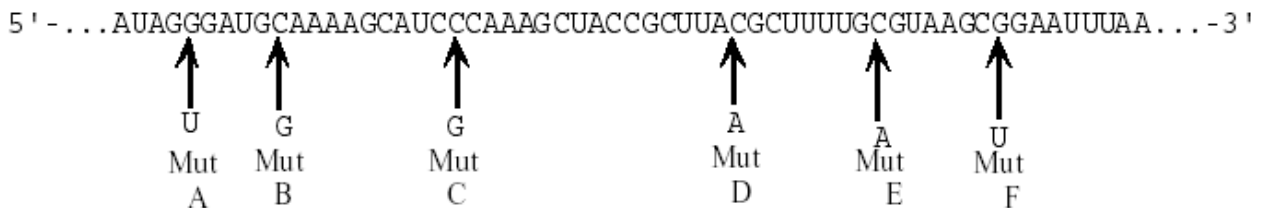
El intrón en el gen Fuz1 es diez veces más largo que los exones. Si se hiciera una mutagénesis aleatoria, la mayoría de las mutaciones generadas recaería dentro de la región no codificante del intrón y no resultaría especialmente informativa acerca de la función de la proteína de Fuz1. Las mutaciones en el intrón romperían las estructuras secundarias complejas, necesarias para formar el centro catalítico del intrón y, como resultado, el gen no sería capaz de llevar a cabo la eliminación de intrones. Sin la eliminación de intrones apropiada, no se haría un producto funcional del gen Fuz1.

6d) En un intento de salvar algunos datos mecanísticos útiles acerca de los mutantes que aislamos en el apartado C, decidimos llevar a cabo un análisis supresor con las cepas de hongos mutantes de crecimiento lento. En esta ocasión, inducimos una mutación en cada una de las cepas de crecimiento lento y seleccionamos mutantes que restablecen el fenotipo de crecimiento rápido. ¿Qué clase de información se espera que revele este experimento acerca de la expresión de Fuz1? Explicar cómo se podrían analizar las cepas mutantes para obtener la información deseada.

Si nuestra hipótesis es correcta, las mutaciones supresoras que hemos aislado deberían restablecer la estructura secundaria del intrón del grupo 1. Como se explicó en clase, cabría esperar mutaciones compensatorias. Por ejemplo, si la mutación original era el cambio de T a C, entonces su supresor estaría al lado y sería un cambio A-G que restablecería el apareamiento de bases apropiado entre estos residuos, así como la estructura secundaria adecuada. Estos tipos de análisis mutacionales nos permitirían definir la estructura secundaria del intrón, así como identificar las estructuras secundarias que son cruciales para la formación del centro catalítico del intrón.

Pregunta 7) Estamos estudiando el hongo patógeno *C. albicans* y al secuenciar uno de sus genes mitocondriales averiguamos que tiene un nuevo intrón. El análisis de su secuencia sugiere que puede estar relacionado con los intrones de la eliminación de intrones del grupo II. El primer paso para estudiar la estructura de los intrones es inducir mutaciones en ellos.

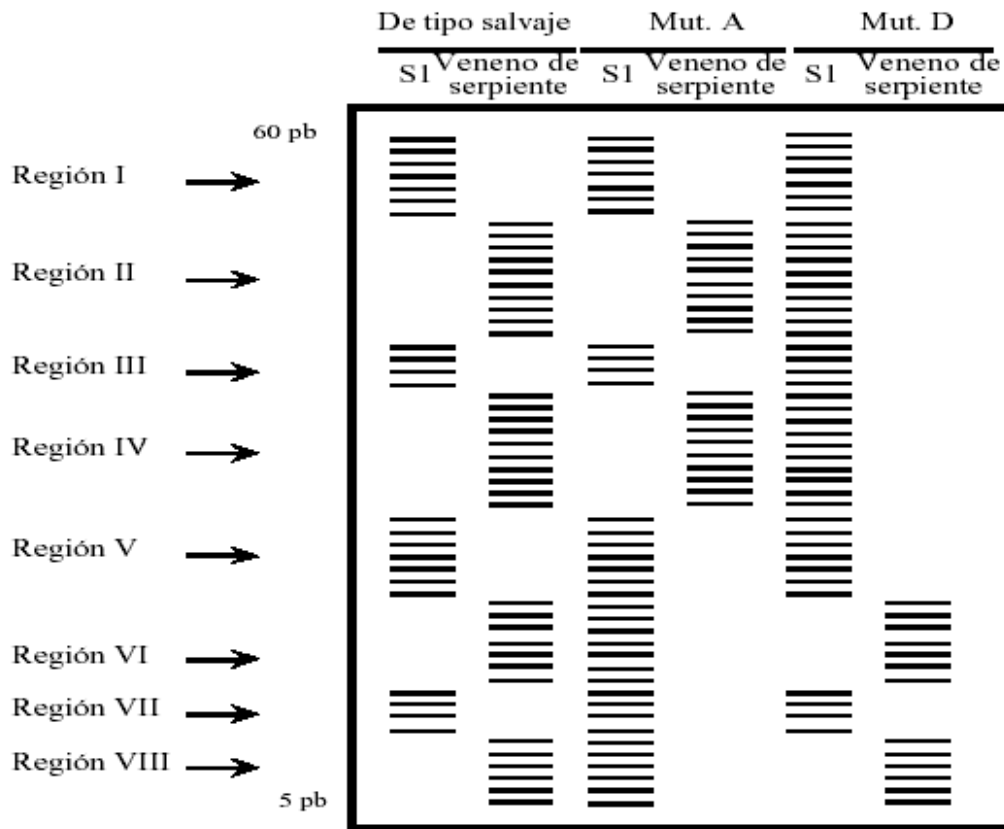
7a) Se identifican una serie de mutantes que ya no pueden tener eliminación de intrones. A continuación, se muestra la secuencia de la región del intrón (NO el intrón completo) que contiene estas mutaciones.



¿Qué explicación puede tener el fracaso de la eliminación de intrones en estas cepas mutantes?

Las mutaciones en las cepas mutantes pueden romper los elementos de la estructura secundaria necesarios para un plegamiento apropiado del intrón en una estructura catalítica activa. La inspección de la secuencia anterior revela varias estructuras de horquillas potenciales en las que se encuentran las mutaciones.

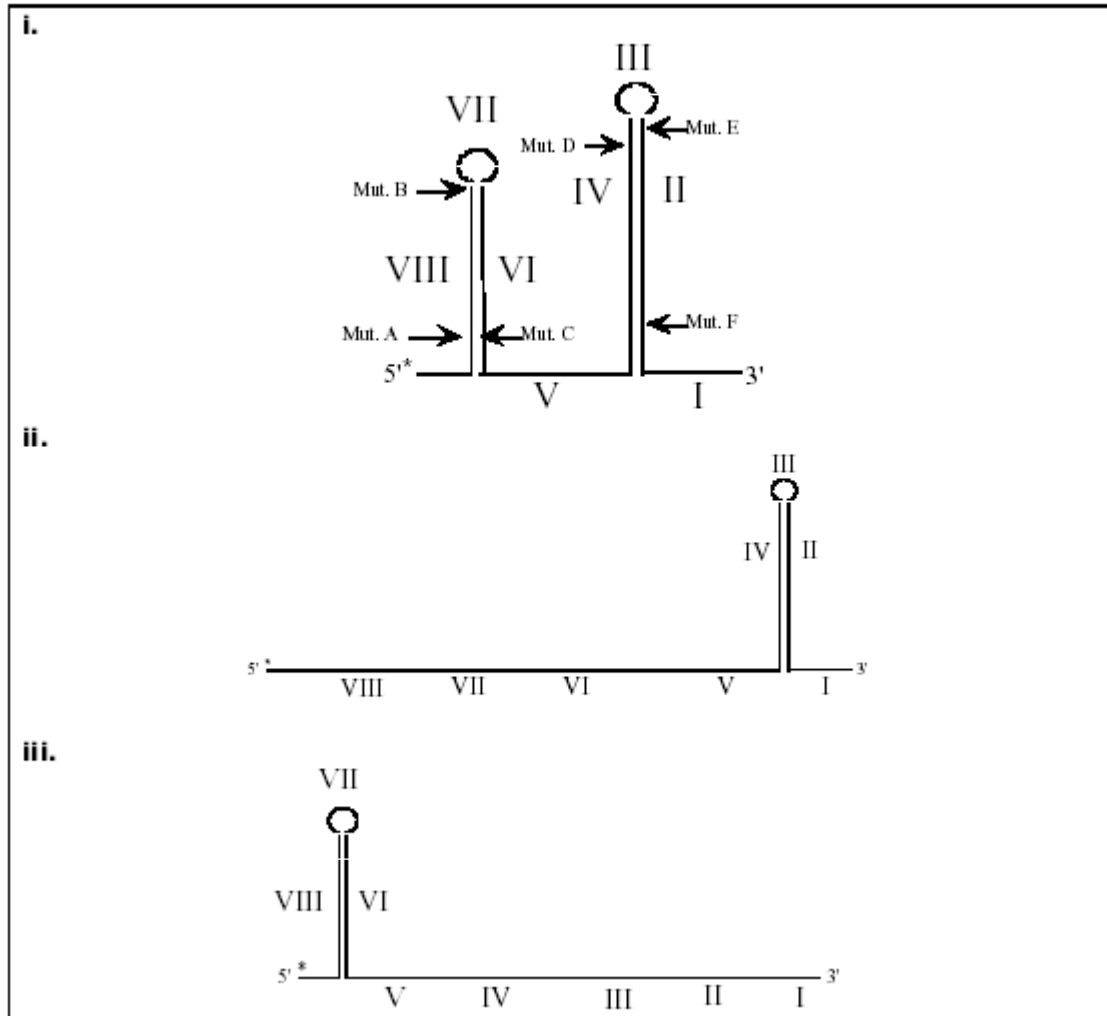
7b) Decidimos analizar más en profundidad estos intrones mutantes tratando con un conjunto de ARN nucleasas algunos fragmentos que contienen esta región. Para ello, empleamos, como sustrato, un fragmento de ARN marcado en su extremo 5', que corresponde a la secuencia del intrón mostrada anteriormente. Mediante una autoradiografía, visualizamos los productos digeridos. El trozo más pequeño que se puede distinguir en el gel tiene 5 bases de largo, según los estándares de control del tamaño.



Averiguamos que los mutantes B y C dan patrones similares a los del mutante A, mientras que los mutantes E y F presentan patrones similares a los del mutante D. A partir de estos datos, dibujar lo siguiente:

- i. La estructura secundaria del intrón de tipo salvaje.
- ii. La estructura secundaria de los intrones mutantes similares al mutante A.
- iii. La estructura secundaria de los intrones mutantes similares al mutante D.

Indicar en cada dibujo las regiones I-VIII. Indicar también en la estructura de tipo salvaje dónde se localizan las mutaciones individuales A-F.



7c) Decidimos generar nuevas mutaciones que supriman los fenotipos mutantes y restablezcan la eliminación normal de intrones. Para ello, aislamos dos supresores distintos, Sup1 y Sup2. Sup1 sólo suprime específicamente a Mut A y Sup2 sólo específicamente a Mut E. Cada supresor se localiza en una ubicación en el intrón, pero ninguno es revertiente. ¿Por qué son tan específicas estas mutaciones de supresión? Averiguar cuáles podrían ser las mutaciones específicas y dónde podrían estar ubicadas.

Las mutaciones de supresión son específicas porque consisten en cambios de base individuales complementarios a las mutaciones originales y restablecen el apareamiento de bases de Watson-Crick entre las dos bases en cuestión. Esto permite la reforma de la estructura secundaria original, aunque con una secuencia diferente. Esto se conoce con el nombre de “covariación”.

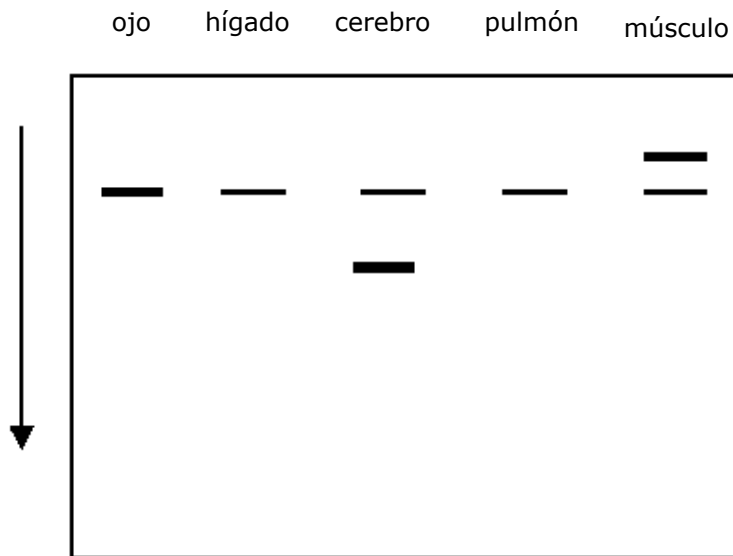
MutA tiene una U en vez de una G en la segunda posición de la región VIII (en la primera estructura del tronco). Sup1 deberá, por tanto, tener una A en vez de una C en la penúltima posición de la región VI.

Mut E cambia una C por una A en la segunda posición de la región II (en el segundo tronco). Sup2 probablemente sea, por tanto, un cambio de G a U en la penúltima posición de la región IV.

7d) ¿Cuáles serían los patrones de digestión si se repitieran los experimentos de protección de nucleasa mostrados anteriormente, con nucleasa S1 y veneno de serpiente, utilizando fragmentos de intrón, marcados de forma similar, de las dos cepas suprimidas (una de ellas contiene las mutaciones Sup1 y Mut A y la otra presenta las mutaciones Sup2 y Mut E)? Explicar el razonamiento seguido para ello.

Es probable que las dos cepas suprimidas contengan intrones que con las nucleasas S1 y veneno de serpiente generan patrones de digestión idénticos a los del tipo salvaje, dado que la actividad de eliminación de intrones en el intrón de tipo salvaje también se ha restablecido.

Pregunta 8) Estamos interesados en estudiar el desarrollo del ojo en ratones y nuestro laboratorio ha descubierto recientemente un gen, el BLG1, que hace que los ratones desarrollen ojos anormalmente grandes. Sospechamos que el BLG1 puede estar involucrado en la proliferación de tejido en otros procesos de desarrollo, por lo que decidimos purificar el BLG1 a partir de una variedad de distintos tejidos de ratones en desarrollo. Separamos estas proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS y, a continuación, realizamos una transferencia *Western* con un anticuerpo primario para BLG1. Utilizamos un anticuerpo secundario radioactivo (éste reconocerá el anticuerpo primario) y exponemos el gel en la película. El ella se observan los siguientes resultados:



8a) ¿En qué tejidos es más probable que BLG1 esté desempeñando un papel importante en el desarrollo? ¿Por qué?

El BLG1 parece estar regulado por encima en los tejidos del ojo, el cerebro y el músculo, sugiriendo que la proteína del BLG1 debe ser importante en dichos tejidos.

8b) Dar dos posibles explicaciones que puedan justificar la diferencia en la movilidad de la proteína de BLG1 purificada a partir de tejidos de **cerebro** (consejo: no hay que preocuparse por los productos de degradación).

MODELO 1:

Se esperaría ver una banda de BLG1 migrando más rápidamente si la proteína se ha procesado proteolíticamente para dar una especie de proteína más pequeña.

MODELO 2:

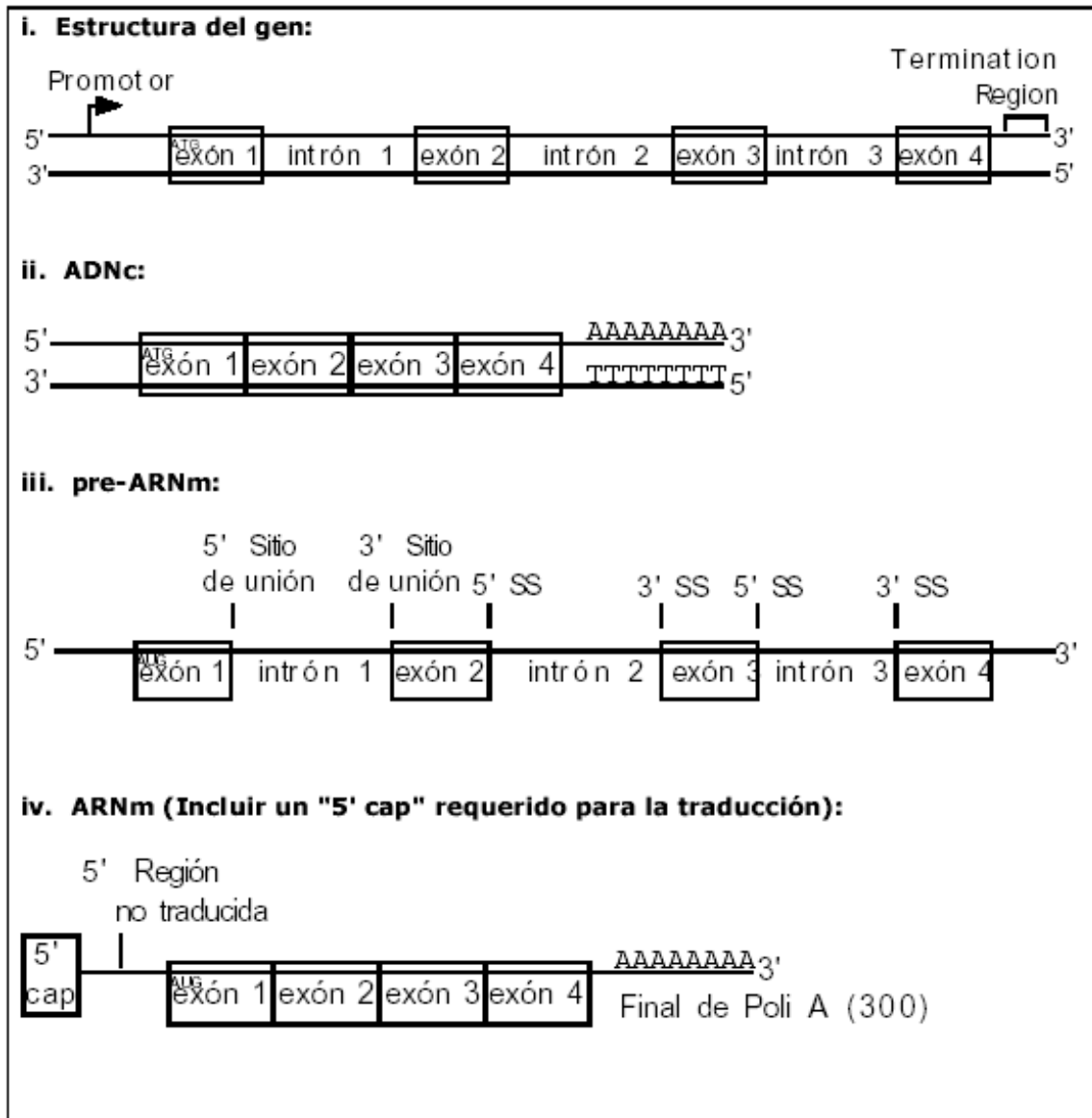
El ARNm del BLG1 podría ser objeto de la eliminación de intrones de distintas formas en diferentes tejidos. En los tejidos del cerebro el BLG1 puede que la eliminación de intrones se realice de tal forma que no se incluyan todos los exones en el ARNm procesado. Esto conllevaría un producto de proteína más pequeño.

8c) Se decide probar la hipótesis comparando el ADNc preparado a partir de tejido de cerebro y de ojo. Se nos entregan lisados celulares de ambos tejidos que contienen todo el ADN, el ARN y las proteínas de estos dos tejidos. Describir con detalle cómo se podría aislar el ADNc del BLG1 de estos dos lisados.

- 1) Aislar el ARNm de los lisados celulares (una posibilidad sería utilizar una columna de afinidad del oligo dT, es decir, pequeñas cuentas con (TTTT)_n unidas a ellas. Al pasar el lisado celular sobre la columna, los ARNm se unirán a las cuentas, debido al apareamiento de las bases del final de poli-A con el oligo dT. Lavar entonces la columna y eluir el ARNm.)**
- 2) Fijar un cebador del oligo dT al ARNm para obtener un 3'-OH que inicie la transcripción inversa. Adicionar dNTPs y transcriptasa inversa.**
- 3) Tratar el híbrido ARN/ADN con base. La base desestabilizará el dúplex ARN/ADN y degradará el ARN.**
- 4) La transcripción inversa del ARNm original creará una pequeña horquilla, un tanto extraña, que puede actuar como cebador para la sintetizar la segunda cadena de ADNc. Utilizar ADN Polimerasa I para hacer un ADNc bicatenario.**
- 5) Tratar el ADNc bicatenario con nucleasa SI para digerir la horquilla y crear una molécula de ADNc bicatenario.**

Pregunta 9) Se está estudiando el mecanismo de eliminación de intrones del pre-ARNm en un raro marsupial hallado en una isla cerca de Australia. Para iniciar el análisis, se aísla un clon del ADNc a partir de un ARNm abundante. Utilizando este clon de ADNc se aísla la secuencia del ADN genómico que codifica este ARN; al gen se le denomina *kanga1*. Como resultado de la comparación del ADNc y las secuencias genómicas, se llega a la conclusión de que *kanga1* tiene 4 exones, de unos 200 nucleótidos de largo cada uno.

9a) Dibujar un esquema de la estructura del gen *kanga1*, el ADNc, el pre-ARNm y el ARNm. Indicar cada uno de los intrones y exones y cada uno de los ácidos nucleicos en los extremos 3' y 5'. Incluir cualquier elemento importante para expresiones o procesamientos posteriores.



9b) Comparando la secuencia con los genes eucarióticos, se encuentran buenas alineaciones para los sitios de unión 5' y 3' de consenso. Sin embargo, no se puede encontrar inmediatamente un sitio de ramificación de consenso. Inspeccionando las secuencias que se muestran a continuación, **rodear con un círculo la secuencia** que es más probable que se utilice como sitio de ramificación para la eliminación de **cada uno** de los intrones. En función de estos datos, escribir un sitio de ramificación de consenso para este marsupial.

Las secuencias del intrón están en letra normal, los sitios de unión 3' están en negrita y las secuencias del exón se han subrayado. Donde hay puntos suspensivos ("...") significa que la secuencia continúa (consejo: el sitio de consenso presenta la misma longitud y separación del sitio de unión 3' que la secuencia de levadura y el nucleótido que participa químicamente en la formación de la de ramificación es el mismo en los marsupiales que en los mamíferos).

```

      Intrón 1                3' sitio de unión  Exón 2
5' ..UCGAGGUAGACAAUUUGGUCAGCUAGGAGGUAGACUACUCAGGCGUAUCGUAI...

      Intrón 2                3' sitio de unión  Exón 3
...UACCGGCGUGCCGAGUUAGCGCGUGGUUGGGUAUGGCUCCUCAGGCCCGUGCGAAA...

      Intrón 3                3' sitio de unión  Exón 4
...UGCCGGGAGUUAGCAUUUCCGGCGCGCUAGUUAGACUGCUCAGGCGUGUGCGUU...3'

```

Secuencia de consenso del sitio de ramificación: GAG^GUAG
U

9c) Para entender el mecanismo de eliminación de intrones en este marsupial preparamos una reacción de eliminación de intrones *in vitro*. Primero intentamos utilizar factores de eliminación de intrones purificados a partir de células de mamíferos. Averiguamos que estos factores no realizan la eliminación de intrones en el pre-ARNm de *kanga1*. Por tanto, añadimos componentes de un extracto nuclear hecho de células marsupiales y nos encontramos con que la actividad de eliminación de intrones se restablece. Fraccionamos este extracto para identificar qué componente(s) debe(n) ser proporcionado(s) por el extracto marsupial. Basándonos en nuestro conocimiento del mecanismo de eliminación de intrones en los mamíferos y en la secuencia del pre-ARNm de *kanga1*, juzgar cada una de las siguientes combinaciones de factores según sea: **improbable**, **posible** o **muy probable** que favorezcan la eliminación de intrones en el pre-ARNm de *kanga1*. En la siguiente tabla, los snRNP se llaman simplemente U1, U2, etc. Suponer que no es necesario ningún factor adicional para la eliminación de intrones en este experimento. Justificar brevemente todas las respuestas.

	Componentes de mamíferos	Componentes de marsupiales	Eliminación de intrones de <i>kanga1</i> ?
1.	U2, U1 y U5	U4/U6 y U2AF	improbable
2.	U4/U6 y U5 y U2AF	U2 y U1	posible
3.	U1, U5 y U2AF	U2 y U4/U6	muy probable
4.	U4/U6, U1 y U5	U2 y U2AF	posible

La base U2 se apareja con el punto de ramificación y el consenso del sitio de ramificación marsupial es diferente del del mamífero. U2 y U6 interactúan para formar el centro catalítico; es mejor si proceden del mismo organismo. En el apartado (b) se establece que el marsupial tiene sitios de unión 5' y 3' que se alinean con el consenso del mamífero, de modo que es probable que los mamíferos U1 y U2AF funcionen.

9d) ¿Qué dos combinaciones de factores de las presentes en la tabla del apartado (c) cabría esperar que fueran las más probables para promover la eliminación de intrones de los pre-ARNm de mamífero? Escribir el número que las combinaciones tienen en la tabla y justificar, brevemente, cada respuesta.

1- El U2 del mamífero se debería unir al sitio de ramificación del pre-ARNm del mamífero.
3- De las opciones restantes, ésta evita la interacción U2-U6 de las mismas especies. El U2 del mamífero puede fracasar en el reconocimiento del sitio de ramificación del marsupial, dado que esta secuencia difiere enormemente del consenso del mamífero.