

Nombre _____

Pregunta 1 _____ / 24 puntos

Pregunta 2 _____ / 34 puntos

Pregunta 3 _____ / 22 puntos

Pregunta 4 _____ / 20 puntos

Total _____ / 100 puntos

Nombre _____

Pregunta 1 (24 puntos). Se está estudiando la iniciación de la replicación del ADN cromosómico en una bacteria nueva que crece a 75°C. Para ello, se han aislado mutantes de replicación sensibles a la temperatura en **doce proteínas/genes diferentes** derivados de esta cepa. A estas mutaciones se las denomina hot1-hot12. Se espera poder usarlas para identificar las proteínas que actúan en **la iniciación de la replicación del ADN**.

1A (5 puntos). ¿Cómo se podría reducir el número de mutantes que habrá que investigar? Describir el experimento que se llevaría a cabo para centrarse en los factores de iniciación y el tipo de mutantes que se elegirían para continuar la investigación.

(3 Pts.) Medir la incorporación de ^3H dTTP en un análisis para observar los mutantes de parada rápida y de parada lenta. Cultivar los mutantes a temperatura permisiva (75° C) y controlar la incorporación de ^3H dTTP después de cambiar a una temperatura no permisiva.

(2 Pts.) Las mutaciones de parada lenta son aquellas que siguen incorporando ^3H dTTP durante un periodo corto de tiempo después de que la temperatura no permisiva varíe. Se trata de células que presentan mutaciones en los genes necesarios para que se inicie la replicación de ADN.

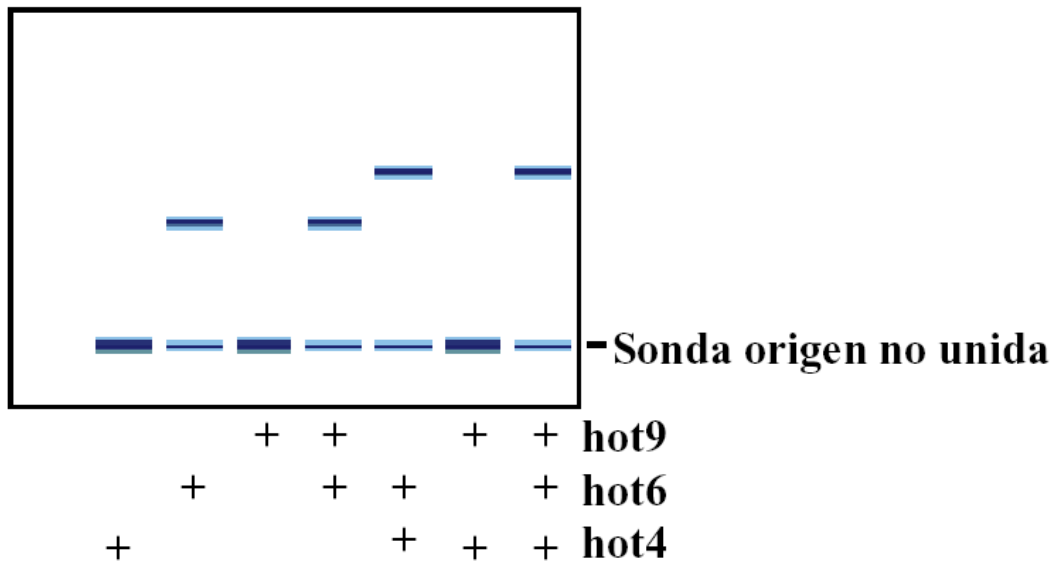
Los mutantes de parada rápida son necesarios para la elongación.

Siguiendo el método descrito anteriormente, se van desechando candidatos y, finalmente, se escogen 3 mutaciones (hot4, hot6 y hot9). Se decide abordar de dos formas distintas el estudio de las proteínas codificadas por estas mutaciones.

- (1) Se clonarán los genes mutados y se sobreexpresarán las proteínas que éstos codifican.
- (2) Nuestro técnico empleará complementos bioquímicos para purificar la actividad que complementa la capacidad de los extractos celulares derivados de las células mutantes para replicar un plásmido que contiene el origen cromosómico.

Rápidamente, se clonan los genes que complementan las cepas mutantes y se purifican las proteínas que codifican. En primer lugar, se decide comprobar, mediante un ensayo de retardo en gel, si una o varias de las proteínas se asocian al origen. Los resultados que se obtienen son los siguientes:

Nombre _____

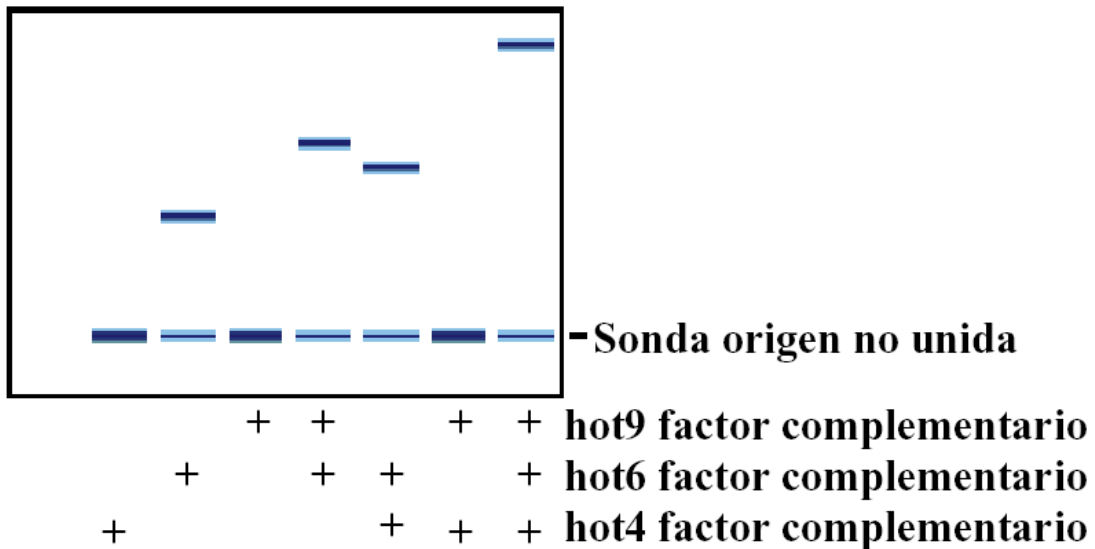


1B (5 puntos). Basándose en los resultados anteriores, ¿qué se puede concluir acerca de la asociación de los tres factores con el origen?

(1 Pt.) **hot6 se une al origen.**
 (2 Pts.) **hot4 se une si hot6 está presente.**
 (2 Pts.) **hot9 nunca se une.**

Después de varios meses de investigación bioquímica, nuestro técnico nos asegura que ha purificado los factores que complementan cada uno de los tres extractos mutantes. Al analizar cada una de las fracciones con el mismo ensayo, obtiene los siguientes resultados:

Nombre _____



1C (5 puntos). ¿Cómo se explicaría la diferencia existente entre los resultados de nuestro técnico y los obtenidos por nosotros con las proteínas que purificamos?

(2 Pts.) Ahora, **hot9** se une si **hot6** está presente y formará un complejo con **hot6** y **hot4** para unirse al origen.

(3 Pts.) Una explicación para que ahora se una **hot9** podría ser que el técnico haya purificado un complejo de proteínas que complementan a los mutantes de **hot9**. Este complejo de proteínas incluiría otra proteína responsable de la unión de **hot9** al origen (o a **hot6**). La otra proteína de este complejo podría haber sido codificada por un segundo gen *y*, por tanto, no haber sido purificada mediante la técnica de clonado.

Nombre _____

Basándonos en nuestras ideas con respecto a los diferentes resultados obtenidos, decidimos pedir a nuestro técnico que examine si el factor complementario de hot 4 también complementa los defectos observados en los extractos procedentes de cualquier otro extracto.

Él descubre que el factor complementario de hot 4 **también** complementa los defectos de los extractos procedentes de hot8 y hot12, dos mutaciones que habíamos eliminado en nuestro análisis inicial de mutantes (pregunta 1A).

1D (5 puntos) ¿Cómo se explicaría la capacidad del factor que complementa a hot4 para complementar la replicación en los extractos derivados de las mutaciones determinadas para efectuar la iniciación (hot4) o la elongación (hot8 y hot12)?

(2 Pts.) El técnico purificó un complejo de multisubunidades.

(3 Pts.) Un componente de este complejo podría ser el responsable de la iniciación y otro componente lo sería de la elongación.

(Nota: Se aceptan otras interpretaciones, incluida la de que una sola proteína hot4 presente actividades de elongación e iniciación, siempre que se dé una explicación de cómo hot4 podría sufrir mutaciones para ambas actividades. (Ej.: hot4, hot8 y hot12 eran, en realidad, un solo gen mutado en diferentes regiones responsables de la elongación y la iniciación).

1E (4 puntos). Partiendo del hecho de que nuestro técnico ha purificado el factor complementario de hot4 a la homogeneidad, describir brevemente cómo se podría probar nuestra hipótesis experimentalmente.

(2 Pts.) Partiendo de un complejo de multisubunidades, se pueden separar en un gel desnaturalizante las proteínas purificadas bioquímicamente o por clonación.

(2 Pts.) Un complejo de multisubunidades produciría una banda >1 en este gel, mientras que una única proteína daría lugar a una sola banda.

Nombre _____

Pregunta 2 (34 puntos en total). Estamos estudiando qué limita la velocidad de movimiento de la horquilla de replicación de E.coli. Decidimos probar la hipótesis de que la velocidad con la que el complejo γ carga la pinza deslizante (proteína β) es lo que limita la velocidad. Para probar esta hipótesis, pretendemos impedir que el complejo γ se disperse alejándose de la horquilla de replicación.

Decidimos probar nuestra hipótesis mediante la fusión del gen que codifica la mayor subunidad del complejo γ (dnaX) con el gen que codifica la subunidad catalítica de ADN polimerasa III (dnaE), de modo que la ADN polimerasa y el complejo γ estén unidos de forma covalente.

Ante la preocupación de que la fusión de las proteínas dnaX y dnaE pueda inhibir la actividad enzimática de la polimerasa, queremos analizar ambas actividades y compararlas con la Holoenzima de la ADN Pol III normal, sin proteínas fusionadas.

2ª (4 puntos). Describir el ensayo que se podría utilizar para determinar si la actividad de la ADN polimerasa de la Holoenzima de la ADN Pol III modificada está alterada. Suponer que se tiene acceso a cualquier dNTP o ADN radiomarcado que sea necesario.

Dado que en la pregunta se pide un ensayo de la actividad de la polimerasa, serían válidos tanto un ensayo de incorporación de dNTP como uno de extensión del cebador. No se pide un ensayo de procesividad, por lo que un reto del molde sería innecesario, pero válido. Una respuesta completa incluiría:

- Una unión cebador / molde
- Cebador radiomarcado o dNTPs también radiomarcados.
- Mg^{++}
- Unión de filtración o electroforesis en gel para detectar los productos radiomarcados.

NOTA: las polimerasas NO requieren ATP. No se han restado puntos por esto, ya que la presencia de ATP no produce ningún daño, pero es innecesaria.

También nos preocupa que la fusión pueda alterar la capacidad del complejo γ para funcionar dentro de la Holoenzima de ADN Pol III. Para estudiar esta posibilidad, pretendemos realizar una ensayo de carga de la pinza deslizante basado en el ensayo de asociación de moldes descrito en clase.

2B (3 puntos). ¿Qué molécula habría que radiomarcarse para realizar este ensayo?

La pinza deslizante beta (queremos examinar si el cargador de la pinza gamma está cargando la pinza beta, no si el propio cargador de la pinza gamma se está asociando. Se otorgarán algunos puntos por mencionar que se quiere marcar la proteína en cuestión, ya que es pequeña y se dividirá en diferentes fracciones dependiendo de si se asocia o no con el ADN grande.

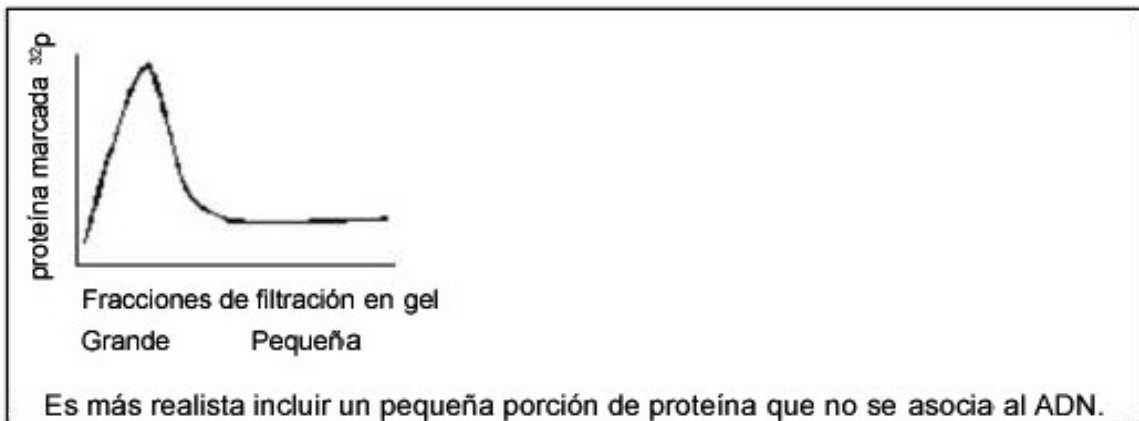
Nombre _____

2C (3 puntos). Dado que el cargador de la pinza requiere una unión molde-cebador para cargar la pinza deslizante en el ADN, dibujar la estructura del molde de ADN que se emplearía en el ensayo.

Un ADN de cadena simple, grande y circular, con un cebador hibridado para que la pinza lo reconozca. Se ha otorgado parte de la puntuación por dibujar simplemente una unión cebador-molde, pero la máxima puntuación de esta prueba se obtiene al afirmar que el ADN circular grande no marcado se aleja de la columna de filtración en gel en distinto sitio que la proteína pequeña marcada por sí sola. Muchos alumnos intentaron también dibujar la horquilla tal y como es en vivo. Sin embargo, esto no es un molde que se pueda hacer ni utilizar en un ensayo.

2D (6 puntos). Dibujar el resultado que se espera obtener del ensayo según el cargador de la pinza esté activo o inactivo. Es importante asegurarse de marcar los ejes de la gráfica.

Activo



Inactivo



Nombre _____

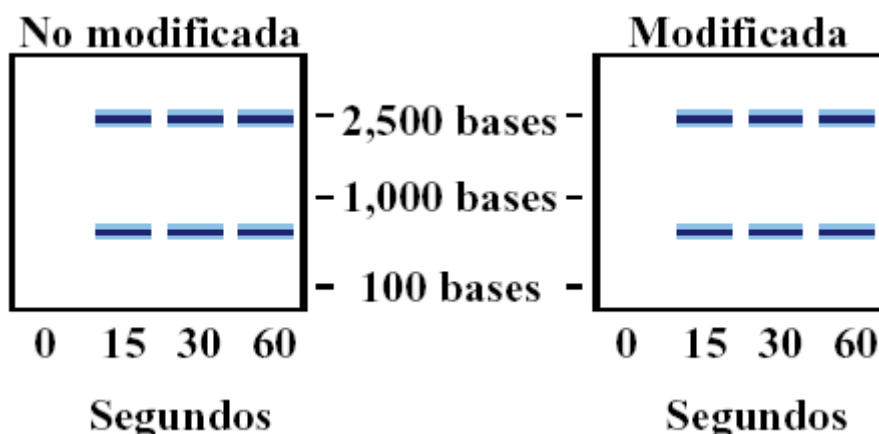
Nos alegra descubrir que tanto la ADN polimerasa como las actividades de carga de la pinza de la Holoenzima de ADN Pol III modificada son las mismas que en la Holoenzima no modificada, cuando se investigan por separado. Para determinar si la unión covalente de estas enzimas permite que las actividades funcionen bien juntas, se pretende estudiar la **velocidad de movimiento de la horquilla de replicación** (donde ambas actividades deben actuar de forma simultánea, al contrario que en las preguntas 2A-D, en las que se habían examinado las actividades por separado).

En primer lugar, se realiza una prueba *in vitro*, empleando un plásmido con OriC como molde para la reacción de replicación del ADN.

2E (6 puntos) Nuestro supervisor ve que estamos utilizando el plásmido OriC y, sin pararse a pensar, nos indica que deberíamos usar el molde de ADN de cadena simple –más sencillo– y un cebador hibridado. ¿Por qué es necesario realizar este ensayo con un molde de ADN que contiene OriC, en lugar de emplear un molde ADN de una sola hebra con un cebador simple? Ilustrar al supervisor.

Para disponer de una horquilla de replicación con hebras conductoras y retardadas, se necesita un molde de origen de cadena doble, no una simple unión cebador–molde. La Holoenzima completa consiste en polimerasas, conductoras y retardadas, conectadas por tau y más procesivas debido a la acción de la pinza y de sus proteínas de carga, las cuales pueden funcionar sólo conjuntamente en una horquilla de ADN de cadena doble. Se ha otorgado parte de la puntuación por hablar de la carga en el origen de dnaA / B/ y C, pero el punto clave está en que para analizar las actividades de la holoenzima es necesario preparar una horquilla.

Se lleva a cabo un ensayo de replicación/periodo de tiempo utilizando dTTP radiomarcado, otros dNTP, Mg⁺², un plásmido de 5000 pares de bases que contiene una sola secuencia de OriC, dnaA, dnaB, dnaC, primasa, topoisomerasa y la Holoenzima ADN Pol III, ya sea modificada o no modificada. Se separan los productos en un gel desnaturante y se obtienen los siguientes autorradiogramas:



Nombre _____

2F (5 puntos). En el ensayo, no se observa ningún producto de más de ~2.500 bases. Explicar el motivo. ¿Qué proteínas adicionales habría que añadir al ensayo para ver esas moléculas?

El punto clave del gel estaba en que los fragmentos de Okazaki (alrededor de 500-1000 bases) no se estaban uniendo ni entre sí ni a las cadenas conductoras (2500 bases). Esto se debía a la total ausencia de ADN ligasa, Polimerasa I exonucleasa y ARNse H. Sin embargo, muchos de los alumnos se dieron cuenta de que olvidamos incluir las proteínas SSB. Y, aunque no es una proteína y, por tanto, vale menos puntos, olvidamos también el ATP. La máxima puntuación se obtenía mencionando 2 de las proteínas que faltaban en la reacción, junto con una explicación razonable.

Nos sentimos decepcionados porque no hay una gran diferencia entre las dos polimerasas. Sin embargo, observamos que ambas reacciones pasan de incompletas a completas en el segundo 15, lo que nos lleva a sospechar que ambas enzimas son tan rápidas que completan la totalidad del molde en menos de 15 segundos.

2G (3 puntos). Debido a la dificultad del experimento, no se puede tomar un punto en el tiempo inferior a 15 segundos. ¿Cómo se podría cambiar el molde para aumentar las posibilidades de ver alguna diferencia entre las dos polimerasas? Explicar brevemente el razonamiento seguido.

La respuesta más sencilla es alargar el molde para que la polimerasa de tipo salvaje tarde más de 15 segundos en realizar la replicación. Aunque nadie haya seguido este razonamiento, descubrimos que la polimerasa de E. Coli se mueve a una velocidad de unos 1000 pb/s. Por lo tanto, el molde debería ser más largo de 15.000 bases.

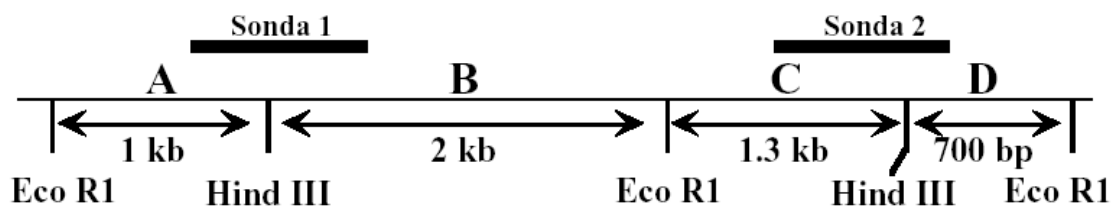
Utilizando el nuevo molde, los estudios *in vitro* indican que **la hipótesis es correcta** y la horquilla de replicación se mueve dos veces más rápido utilizando la Holoenzima de ADN Pol III modificada en el tubo de ensayo. Como prueba final de la hipótesis, se sustituyen las copias normales de los genes *dnaE* y *dnaX* en E. Coli por la versión fusionada de dichos genes y se determina el efecto que tiene sobre la tasa de crecimiento celular.

2H (4 puntos). Nos sorprende descubrir que las células crecen mucho más despacio que las células de tipo salvaje. Sin embargo, si el gen codificador de la proteína β está sobre-expresado, las células crecen más rápidamente que las de tipo salvaje. ¿Cómo se explican estos resultados) (Consejo: el complejo γ es necesario tanto para unir la pinza deslizante al ADN como para retirarla).

Nombre _____

Una respuesta completa incluiría la explicación de porqué las proteínas fusionadas originan un crecimiento más lento de las células Y porqué sobreexpresar beta da lugar a un crecimiento más rápido. Una respuesta es que la fusión de gamma a la horquilla impide que ésta vuelva y elimine las pinzas beta de detrás de la horquilla (al final de los fragmentos de Okazaki, por ejemplo). De este modo, las células dejan de tener pinzas beta y crecen más despacio. Si se sobreexpresa beta, se resuelve el problema, permitiendo que la polimerasa se mueva más rápido que el tipo salvaje, al igual que lo hace *in vitro*.

Pregunta 3 (22 puntos). Mediante un enfoque de clonación del replicador, se ha aislado un fragmento de ADN que contiene un replicador derivado de la levadura, B. Rewski. La fragmento identificado tiene 5 kb de longitud y presenta el siguiente mapa de restricción:



Los estudios iniciales indican que solo existe un origen en esta región. Se pretende identificar el sitio del origen de replicación en el fragmento. Basándose en la secuencia de ADN, se cree que el origen de replicación está situado en el fragmento C del mapa.

3A (3 puntos). ¿Con qué enzima de restricción cortaría el ADN genómico antes de llevar a cabo un análisis con gel 2D de los intermediarios de la replicación para identificar el origen? Explicar esta elección.

EcoRI: para que las sondas se puedan unir.

O

HindIII: para que el supuesto origen en C esté fuera del centro en el fragmento (pero esta respuesta trae complicaciones al utilizar las sondas 1 ó 2 en la parte B).

Nota: las respuestas basadas en el tamaño de los fragmentos de restricción no tienen sentido en este ensayo. Se está detectando sólo un fragmento con una sonda radiomarcada y cada fragmento tendrá una gama de tamaños en función de si está completamente replicado, parcialmente replicado o no está replicado.

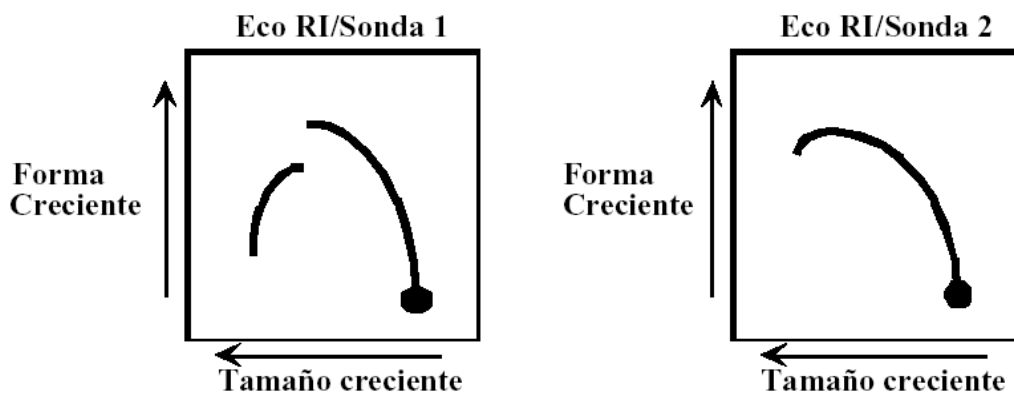
Nombre _____

3B (3 puntos). ¿Cuál de las sondas radiomarcadas (que se muestran mediante barras oscuras sobre el mapa de restricción) se podría seleccionar? Explicar brevemente dicha elección.

Si se digiere con RI, la sonda 2 se unirá a la región que incluye C, donde se sospecha que hay un origen.

Si se digiere con HindIII, no funcionará ninguna sonda, ya que ambas reconocerán múltiples fragmentos, originando patrones múltiples en el mismo gel.

Se realizan experimentos de mapeo de intermediarios en un gel 2D utilizando, en cada caso, diferentes digestiones con enzimas de restricción y diferentes sondas. Se obtienen los siguientes resultados:



3C (5 puntos). Basándose en estos datos, ¿qué conclusiones se pueden extraer con respecto a la localización del origen en el fragmento?

El origen está ubicado asimétricamente en un extremo del fragmento A o del fragmento B, ya que la sonda 1 origina una transición de burbuja Y.

El origen NO se encuentra en el fragmento C. El patrón generado por la sonda 2 podría ser TANTO una burbuja COMO un arco Y. Como se comentó en clase, no hay forma de establecer la diferencia a simple vista, de ahí que buscáramos una transición de burbuja Y en lo visto con la sonda 1. Se otorgaron más puntos a los alumnos que se dieron cuenta de esto, pero la pregunta afirmaba que sólo había un origen.

3D (6 puntos). Describir un experimento adicional en gel 2D que se podría realizar para esclarecer aún más o confirmar la conclusión extraída. Explicar el razonamiento seguido para ello.

Nombre _____

Existen muchas posibilidades. Un ejemplo: cortar con EcoRI y HindIII, sondear con una sonda específica para la región de B y buscar una transición de burbuja Y, ya que sabemos por la parte C que si el origen está en B, se encuentra en un extremo de B, no en el centro.

Obsérvese que el empleo de las sondas dadas no funcionaría, como se ha explicado anteriormente. Se otorgaron más puntos a los que al menos se dieron cuenta del problema. Quizá la pregunta no fuese del todo clara a la hora indicar que se podía diseñar una nueva sonda.

3E (5 puntos). Basándose en los experimentos descritos anteriormente, se descubre que el origen está ubicado en un único fragmento de 500 pares de bases. No obstante, nos interesa determinar si el replicador está situado completamente dentro del mismo fragmento. Describir brevemente cómo se podría mapear la localización del replicador en el fragmento.

Se quiere saber si el origen está “situado completamente dentro” del fragmento de 500 pb. La único modo de averiguar esto es con el ensayo de replicación del plásmido: clonar el fragmento en un vector que contenga un marcador selectivo, un centrómero y ningún origen; transfórmalo en levadura (no en bacteria, este es un origen de levadura) y seleccionar el marcador. Si las células logran crecer, el fragmento contendría el replicador. El mapeo de la mutación se puede utilizar entonces para realizar un mapeo más profundo, pero la única forma de comprobar si la región es capaz de desempeñar la función de origen es clonándola en un plásmido lejos de las secuencias flanqueadoras.

Pregunta 4 (20 puntos en total). Para identificar las proteínas que participan en la reparación de ADN en una cepa bacteriana recientemente identificada, se deciden aislar las versiones mutantes de esta cepa que tengan un fenotipo mutador. En el contexto de este análisis, se define la cepa mutante como una cepa mutadora si tiene una frecuencia de mutaciones al menos 10 veces mayor que la de la cepa inicial, como se determinó a partir de un ensayo de reversión *in vivo*, similar al utilizado en el test de Ames. La cepa de prueba inicial empleada para el ensayo de reversión contiene una mutación de sentido erróneo en un gen necesario para la biosíntesis de la arginina; como resultado, esta cepa es una auxótrofa de arginina.

4A (6 puntos). Nombrar, utilizando la nomenclatura de E. Coli, los **cuatro** genes (o la proteína codificada por dichos genes) que probablemente presentarán las frecuencias de mutación **más elevadas** (ej.: un aumento de más de 100 veces) en este ensayo. Justificar brevemente la respuesta.

Nombre _____

(4 Pts.) mutS, mutL, mutH y la actividad exonucleasa revisora (proofreading) de PolIII.

(2 Pts.) Es necesario dar una explicación de por qué las mutaciones anteriores originan las MAYORES frecuencias de mutación. mutS, mutL y mutH participan en la reparación de los malos apareamientos. Una mutación en uno de éstos causaría un incremento de 1000 veces en la frecuencia de mutación. Una mutación en la actividad exonucleasa revisora (proofreading) de PolIII también causaría un aumento de 1000 veces en la frecuencia mutación.

No se han aceptado los genes necesarios para la reparación de la escisión de bases (BER) ni para la reparación de la escisión de nucleótidos (NER), porque la frecuencia de mutación en estos mutantes es considerablemente más baja que en los mutantes anteriores, en ausencia de un mutágeno.

(Nota: También se ha aceptado dam-, aunque una mutación en este gen causaría un aumento de 500 veces en la frecuencia de mutación, lo cual no es tan alto como en las mutaciones mencionadas anteriormente).

Como resultado de este cuadro genético, se aíslan las células que constitutivamente expresan las proteínas necesarias para la translesión en la síntesis de ADN (TLS). Estas células expresan las proteínas en ausencia de inducción por medio de un agente dañino para el ADN. Sin embargo, las proteínas necesarias para la TLS son perfectamente normales en esta cepa.

4B (4 puntos). ¿Por qué tienen estas células un fenotipo mutador? Explicar la respuesta.

(2 Pts.) La TLS es propensa a error y causará la incorporación de nucleótidos incorrectos durante la replicación.

(2 Pts.) Normalmente, los genes de la TLS están reprimidos. Sin embargo, en estas células, la TLS está constitutivamente activa. Debido a esto, las proteínas necesarias para la TLS pueden actuar libremente y causar, por tanto, un aumento de las mutaciones.

En el proceso de caracterización de la cepa que expresa constitutivamente las proteínas necesarias para la TLS (utilizadas en el apartado b), se observa que un clon derivado de esta cepa posee una frecuencia de mutación aún MAYOR que la de la cepa madre. Esta elevada frecuencia de mutación se observa en muchos tipos distintos de ensayos *in vivo*, independientemente de la naturaleza del alelo “de prueba” utilizado en el experimento. Un análisis más profundo de esta cepa hipermutable revela que porta una mutación en el gen *umuC*.

Nombre _____

4C (5 puntos). ¿Qué característica de la proteína UmuC (polimerasa V) podría estar alterada en la versión mutante para explicar el fenotipo? Explicar brevemente la respuesta.

(Pts.) UmuC es una polimerasa de ADN de baja fidelidad y también posee una baja procesividad. Sin embargo, una mutación que aumente la procesividad de UmuC permitirá una polimerización mucho más larga de lo normal.

(3 Pts.) Cuanto más polimerice UmuC el ADN, más nucleótidos incorrectos se incorporarán, aumentando así la frecuencia de mutación.

Nota: se han aceptado otras explicaciones, como por ejemplo, una mutación en la subunidad de “proofreading” de UmuC o una mutación que haga que UmuC sea aún más propensa a error. Sin embargo, UmuC no posee actividad “proofreading”. Además, una mutación que la hiciese más propensa a error sería improbable, ya que incorpora nucleótidos casi al azar, sin tener en cuenta el apareamiento de bases apropiado.

4D (5 puntos). Diseñar un experimento para probar la hipótesis formulada acerca de la naturaleza del defecto en la proteína UmuC. Explicar, específicamente, los resultados que se esperan obtener en el experimento con la proteína mutante en caso de que la hipótesis sea correcta. Comparar estos datos con los obtenidos en los experimentos de control en los que se ha utilizado la proteína de tipo salvaje UmuC.

(1 Pt.) Un ensayo de desafío de procesividad/molde puede probar nuestra hipótesis según la cual UmuC sufrió una mutación que aumentó su procesividad.

(1 Pt.) Un sustrato apropiado incluiría un molde de cadena simple largo con un cebador complementario corto radiomarcado en su extremo 5'. Incubar UmuC y el sustrato marcado en una proporción equimolar.

(1 Pt.) Después de la incubación, añadir dNTPs y sustrato frío 1000x (molde de ADN de cadena simple y cebador no marcado). Dejar actuar la reacción y separar los productos en un gel desnaturizante.

(2 Pts.) Una mutación de aumento de procesividad en UmuC generará un producto de ADN largo, indicando su capacidad para polimerizar una larga extensión de ADN en un solo proceso de unión. El UmuC de tipo salvaje dará lugar a un producto de ADN corto, indicando una baja procesividad en esta enzima.