

Nombre _____

Pregunta 1 _____/30 puntos

Pregunta 2 _____/20 puntos

Pregunta 3 _____/25 puntos

Pregunta 4 _____/25 puntos

Total _____/100 puntos

Nombre _____

Pregunta 1. (30 puntos)

1A (6 puntos). Un principio fundamental del análisis genético es que la distancia física existente en el ADN y la distancia genética (es decir, la distancia en un mapa genético) son **generalmente proporcionales** en todo el genoma. Aunque algunas zonas muestran frecuencias de recombinación anormalmente altas o bajas, todas las zonas del genoma pueden y de hecho participan en la recombinación homóloga. Basándose en el conocimiento propio acerca del mecanismo de la recombinación homóloga, enumerar dos propiedades de este proceso que sirvan para garantizar que todas las secuencias de ADN participan en la recombinación. Argumentar las respuestas.

Propiedad 1: (3 puntos) El inicio de la recombinación homóloga no depende de la secuencia. La probabilidad de incurrir en una ruptura bicatenaria es la misma en todo en ADN.

Propiedad 2: (3 puntos) Los componentes que actúan en un principio para reparar una ruptura bicatenaria son específicos para cada estructura y no dependen de la secuencia. RecBCD se cargará en cualquier extremo como de ADN bicatenario y RecA lo hará en una región monocatenaria.

Nota: La sobrerrepresentación de los sitios Chi no es una respuesta aceptable en este caso, ya que la frecuencia de recombinación sigue variando a medida que nos alejamos de un sitio Chi.

Leer la siguiente sección experimental y utilizar los datos para responder a las partes b-e que se muestran más adelante

Aunque generalmente la frecuencia de recombinación es bastante uniforme en todo el cromosoma, el análisis detallado de zonas concretas del cromosoma revela la existencia de algunas regiones en las que la frecuencia de recombinación está por encima de la media y otras en las que es menor. Se deciden estudiar estos fenómenos en *E. coli* para intentar entender los mecanismos moleculares responsables de estas zonas "frías" y "calientes".

El planteamiento experimental es el siguiente: se determina la frecuencia de la recombinación homóloga en 8 zonas del cromosoma mediante transducción generalizada por fago. La cepa receptora cuenta con múltiples marcadores auxotróficos, lo que indica la existencia de un gen defectuoso en cada una de las 8 zonas. La cepa donante contiene alelos de tipo salvaje para cada uno de estos genes.

Receptora: *his⁻, trp⁻, lac⁻, ara⁻, val⁻, leu⁻, thi⁻, ura⁻*

Donante: *his⁺, trp⁺, lac⁺, ara⁺, val⁺, leu⁺, thi⁺, ura⁺*

El fago transductor crece en las células donantes y los paquetes de fagos lo hacen de forma aleatoria, en segmentos de 50 kb del cromosoma de las células donantes. Estos fagos se utilizan, a continuación, para infectar las células receptoras y, así, introducir segmentos de los cromosomas donantes. Si la recombinación entre el ADN entrante y el cromosoma huésped receptor se produce correctamente, las células receptoras podrían ganar un alelo de tipo salvaje.

A continuación, se muestra una tabla de las frecuencias de recombinación observadas en cada una de las ubicaciones cromosómicas marcadas.

Nombre _____

Tabla 1: Frecuencia de recombinantes de tipo salvaje:

Región 1	His+	0,2%
Región 2	Trp+	0,2%
Región 3	Lac+	0,02%
Región 4	Ara+	0,2%
Región 5	Val+	0,02%
Región 6	Leu+	0,6%
Región 7	Thi+	0,2%
Región 8	Ura+	0,2%

Para analizar los mecanismos responsables de las frecuencias de recombinación superiores e inferiores a la media, se deciden estudiar las zonas 1, 3, 5 y 6 con más detalle. Para ello, se repite el mismo tipo de ensayo de recombinación *in vivo*, con la excepción de que, esta vez, la cepa receptora presenta una mutación en uno de los siguientes genes de recombinación: *recB*, *recD* o *ruvC*. A continuación se muestra una tabla con los resultados; en cada caso, se indica la frecuencia de los recombinantes de tipo salvaje (por ejemplo, His⁺ para la región 1), al igual que en la tabla 1.

Tabla 2: Frecuencia de recombinantes de tipo salvaje:**Mutación en las células receptoras**

	<i>recB</i>	<i>recD</i>	<i>ruvC</i>
Región 1	<0,001%	0,6%	<0,001%
Región 3	<0,001%	0,12%	<0,001%
Región 5	<0,001%	0,6%	<0,001%
Región 6	<0,001%	0,6%	<0,001%

1B (4 puntos). Basándose en estos resultados, sugerir una hipótesis para los fundamentos mecanísticos de la frecuencia de recombinación aberrante observada en la tabla 1 para la zona 5. Explicar el planteamiento experimental en el que se apoya el modelo formulado.

(2 puntos) En comparación con el resto de las regiones, la región 5 contiene un número menor de sitios Chi o se encuentra más alejada de un sitio Chi de lo que las otras lo están de su sitio Chi más cercano. **(2 puntos)** La prueba experimental de este hecho se muestra en la Tabla 2. En un mutante de *recD* (que ya no responde a los sitios Chi), la frecuencia de recombinación aumenta hasta equipararse con la de las otras regiones.

1C (4 puntos). Sugerir una hipótesis para los fundamentos mecanísticos de la frecuencia de recombinación aberrante observada en la tabla 1 para la región 6. Explicar el planteamiento experimental en el que se apoya el modelo formulado.

(2 puntos) En comparación con el resto de las regiones, la región 6 contiene un número menor de sitios Chi o se encuentra más cerca de un sitio Chi de lo que las otras lo están de su sitio Chi más cercano. **(2 puntos)** La prueba experimental de este hecho se muestra en la Tabla 2. En un mutante de *recD* (que ya no responde a los sitios Chi), la frecuencia de recombinación no varía.

1D (10 puntos). Para analizar el mecanismo con más detalle, se aísla un fragmento de 15 kb de ADN de la región 5 y uno de 15 kb de la 6 y se incuba cada uno de estos fragmentos *in vitro* con la enzima RecBCD purificada. Dibujar un diagrama de los **sustratos de ADN** (indicando cualquier cifra relevante) y de los **productos de ADN** de cada uno de estos dos fragmentos. **El diagrama debe estar aproximadamente a escala; no es necesario dibujar un gel,**

Nombre _____

simplemente una línea que represente el ADN. Si el producto de ADN final generado por la enzima RecBCD constituye un buen sustrato para la carga de RecA, trazar un diagrama adicional en el que se muestre el sitio al que se enlazará RecA.

Un diagrama completo debe incluir lo siguiente:

Sustrato: fragmento de 15 kb de ADN bicatenario (dsDNA) con extremos romos. Indicación de los extremos 5 y 3. La región 5 debe o bien contener menos sitios Chi o bien tener el marcador Val alejado de un extremo en el que se encuentre un sitio Chi (dependiendo de la respuesta dada en 1B). La región 6 o bien ha de contener más sitios Chi o tener el marcador Leu cerca de un extremo con un sitio Chi.

Producto: igual que arriba, pero con una cola monocatenaria de 3 pulgadas generada por RecBCD. RecA se debería cargar en esta región monocatenaria.

1E (6 puntos). Una vez finalizado el análisis de las regiones 5 y 6, volvemos a la región 3. Al no haber encontrado una respuesta a la pobre recombinación observada en la región 3, hablamos con los compañeros de prácticas para ver si tienen alguna idea. Uno de ellos sugiere analizar la secuencia genómica de *E. coli* que rodea a la mutación *lac*⁻ del cromosoma receptor. Dado que la secuencia está disponible y lista, decidimos que es una excelente idea. ¿Qué motivo de secuencia nos sugiere que busquemos? ¿Qué distribución de este motivo podría ofrecer una explicación a los datos de la frecuencia de recombinación mostrados anteriormente?

(3 puntos) Buscaremos la secuencia de consenso de RuvC, ya que estos sitios evitan que la prolongación del apareamiento se desplace por la zona de codificación de Lac e inhiben la recombinación de dicha región. (3 puntos) Los sitios de consenso de RuvC deberían rodear la región de codificación de Lac.

Nota: La respuesta no puede ser la secuencia de consenso del sitio Chi, porque la frecuencia de recombinación del mutante de *recD* sigue siendo baja en comparación con la del resto de las regiones.

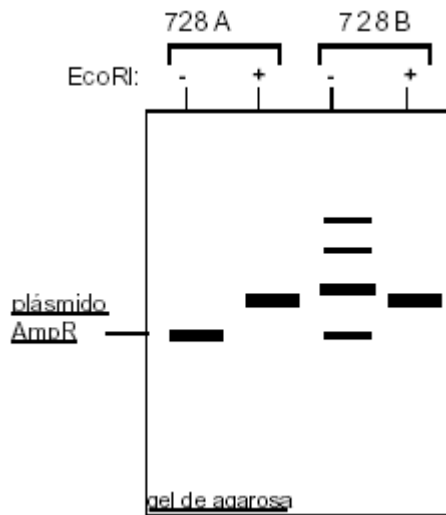
Pregunta 2 (20 puntos).

Se están analizando algunos mecanismos por los cuales las bacteria adquieren y mantienen genes de codificación de la resistencia antibiótica. Una de las cepas con la que se está trabajando (denominada 728A) es muy resistente a la ampicilina; el 100 % de las células ubicadas en un medio que contiene ampicilina forman colonias.

Sabiendo que tanto los plásmidos como los transposones suelen llevar genes resistentes a fármacos, se analiza la cepa 728A y se comprueba que contiene un plásmido. **Con el fin de analizar los mecanismos empleados por las células para mantener dicho plásmido, se mutageniza la cepa y se aísla una variante (denominada 728B), que a frecuencias elevadas pierde el fenotipo de resistencia a la ampicilina.** Cuando un cultivo líquido de 728B se ubica en un medio que contiene ampicilina, generalmente sólo un 10-15% de las células dan lugar a colonias.

Para investigar la razón por la que el 728B presenta una herencia reducida del plásmido resistente a la ampicilina, se purifica el ADN del plásmido eliminando los cultivos de las células 728A y 728B y se analiza el ADN en un gel de agarosa nativo. Este análisis en gel se lleva a cabo antes y después de digerir el ADN con EcoRI, que corta el ADN del plásmido una vez.

Nombre _____



2A (4 puntos). Basándose en este análisis, ¿qué explicación puede tener la disminución de resistencia que se observa en las células 728B ubicadas en un medio que contiene ampicilina?

Cuando los plásmidos experimentan una recombinación homóloga tras la replicación, forman multímeros, que se deben separar mediante una recombinación de sitio específico. De lo contrario, sólo una de las células hermanas recibirá los plásmidos que contienen genes AmpR cuando se dividan las células. Los plásmidos aislados de las células 728B se separan en monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros. Cuando se cortan con EcoRI, que realiza un corte por plásmido, todos ellos dan lugar a una banda del mismo tamaño. Por lo tanto, se trata de una mutación en la recombinación o en los sitios que ésta reconoce.

Obsérvese que, aunque un transposón replicativo formara un cointegrante mayor que el plásmido original, al cortarlo no recuperará el mismo tamaño, ya que el transposón replicado añade una longitud adicional.

2B (6 puntos). Un análisis detallado de las células 728B revela que la mutación que provoca una herencia de plásmidos pobre se encuentra **en el ADN del plásmido. Además, el gen codifica un factor transacción.** Describir brevemente uno o dos experimentos que apoyen estas conclusiones.

Aunque son muchos los experimentos que tienen cabida en este caso, se debe comprobar la herencia de los plásmidos, **NO** observar la transcripción desde un promotor de prueba.

Por ejemplo, transformar células 728B con un plásmido de tipo salvaje aislado de las 728A con un marcador diferente, por ejemplo, KanR. Si la mutación se da en el plásmido (cis), este nuevo plásmido se mantendrá y las células serán KanR. Si codifica un factor de transacción, las células también serán AmpR.

O:

Para saber si la mutación se da en el plásmido, se puede transformar el plásmido mutante aislado de una célula 728B en una cepa de tipo salvaje, entonces apenas debería mantener. A continuación, habría que realizar otro experimento para comprobar que se trata de un factor de transacción.

Nombre _____

2C (6 puntos). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los apartados a y b, se llega a una hipótesis para el tipo de proteína que debe codificar el gen mutado en las células 728B. Se decide intentar aislar la proteína de tipo salvaje mediante un enfoque bioquímico.

- Describir:
- (1) El ensayo que se utilizará para realizar la purificación.
 - (2) Las células que se emplearán como material inicial; y
 - (3) Si hay algún pequeño cofactor molecular que probablemente sea necesario para que el ensayo resulte funcional.

Ensayo: Incubar ADN de plásmido de las células 728B con extractos de células fraccionadas y observar si los multímeros (las bandas más grandes) desaparecen. Recordar que la complementación bioquímica de por sí no constituye un ensayo. Todavía es necesario indicar qué ensayo, que ese extracto celular mutante no puede realizar, será complementado por la proteína de tipo salvaje.

Material de arranque: fraccione los extractos de célula 728A para obtener la proteína de tipo salvaje.

Cofactores: si lo que busca es una recombinasa, no se necesitan cofactores.

2D (4 puntos). Mientras proseguimos con la purificación de la proteína, podemos también volver a usar la genética para comprender el mecanismo del mantenimiento de los plásmidos. Por lo tanto, decidimos ver si podemos aislar una mutación que suprima el fenotipo de la cepa 728B. Para ello, comenzamos con un cultivo de células 728B, lo mutagenizamos y buscamos un nuevo mutante que restaure la eficacia de la placa en un medio que contenga ampicilina prácticamente al 100 %. Conseguimos encontrar una cepa con este fenotipo y la llamamos cepa 728C. En esta ocasión, la nueva mutación responsable apunta al cromosoma y no al plásmido.

Sugerir un gen cromosómico que pueda mutarse en las células 728C y que pueda provocar esta supresión. Argumentar la respuesta.

Un gen involucrado en una recombinación homóloga, como el RecA/B/C/D. La multimerización del plásmido se debe a la recombinación homóloga entre los plásmidos.

¿Qué otro fenotipo cabría esperar en las células 728C para respaldar la hipótesis formulada anteriormente?

Las células 728C también podrían ser sensibles a agentes que causan rupturas bicatenarias, como los rayos x.

Nombre _____

Pregunta 3 (25 puntos). Se está estudiando la regulación de un gen clave que regula el ritmo circadiano de los ratones y que recibe el nombre de "Early to bed" (pronto a la cama) o ETB. Mediante la asignación mutacional del promotor y un análisis *en vivo* de los promotores mutantes, se han identificado los sitios de unión de dos activadores transcripcionales que son los responsables de inducir el sueño en los ratones. A estos dos factores se les denomina SNZ1 y SNZ2.

Se purifican y se clonan SNZ1 y SNZ2 para determinar cómo estimulan la transcripción. Mediante ensayos de cambio de gel, se descubre que cada uno de ellos se fija de forma independiente al promotor PLC y que no se estimulan entre sí para fijarse al ADN. En primer lugar, se comprueba la capacidad para activar la transcripción *in vitro* mediante la adición de activadores purificados que contienen el promotor PLC y la RNA Pol II purificada y los factores auxiliares (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH). Los resultados que se obtienen son los siguientes:

<u>Activador</u>	<u>In vitro</u> <u>Unidades de transcripción</u>
Ninguno	50 U
SNZ1	2000 U
SNZ2	50 U
SNZ1+ SNZ2	2000 U

3A (6 puntos). Proponer dos mecanismos distintos para la acción SNZ2 *in vivo* que expliquen la **incapacidad** del SNZ2 para activar la transcripción en el ensayo *in vitro*. Asumir que el SNZ2 que se ha purificado está adecuadamente plegado y listo para fijarse al ADN y llevar a cabo su funcionamiento normal.

I) y II)

Hay varias respuestas posibles. Todas deben mencionar que hay algo que falta en la reacción *in vitro* y que sí está presente *in vivo*: un cofactor como Ca⁺⁺, una modificación como la fosforilación o cualquier otro activador proteico adquirido por SNZ2.

Lo que buscamos aquí en realidad es una respuesta que haga referencia a la CROMATINA. *In vivo*, la cromatina desempeña un papel primordialmente represivo en la transcripción eucariótica. *In vitro*, no había ninguna cromatina asociado a este plásmido. Por lo tanto, SNZ2 podría ser un activador transcripcional que funcione recopilando una histona acetiltransferasa (HAT) o un factor de remodelado de la cromatina.

Nombre _____

3B (3 puntos). Para determinar la causa por la que SNZ2 no se activa en las reacciones *in vitro*, se decide asignar el dominio de activación de SNZ2 *in vivo*. Describir el enfoque experimental que se podría adoptar para conseguirlo.

Para asignar un dominio de activación, fusionar un dominio de unión al ADN, como LexA, al SNZ2 y realizar una serie de eliminaciones del SNZ2. Comprobar estas eliminaciones *in vivo* en un promotor de prueba con dominios de unión LexA y un gen indicador, como LacZ. Idealmente, una vez encontradas estas zonas necesarias para la activación, se deberían probar por separado, para ver si son suficientes.

Inicialmente, se prueba un promotor que carece del sitio de unión al ADN SNZ2, pero se descubre que, para presenciar la activación de la transcripción, es necesaria la presencia de un sitio de unión al ADN SNZ2 en el promotor ETB y el dominio de unión al ADN SNZ2.

3C (5 puntos). ¿Cómo se puede continuar con el análisis del dominio de activación del SNZ2 bajo estas circunstancias? Describir cualquier limitación de la interpretación de los experimentos de asignación del dominio de activación.

Idealmente, llevar a cabo cambios de gel para probar qué partes del SNZ2 son suficientes para la unión al ADN. A continuación, probar las eliminaciones del SNZ2 para la activación en un promotor de prueba que contenga sitios de unión al ADN SNZ2 y un gen indicador. Con esto se podrán determinar las zonas necesarias para la activación que no son necesarias para la unión al ADN, pero no se podrán determinar qué zonas son necesarias para la activación.

3D (3 puntos). Mediante uno de los dos modelos propuestos en la parte 3A, ¿cómo se podría explicar la importancia del dominio de unión al ADN SNZ2 para la activación transcripcional *in vivo*?

Si el SNZ2 reúne una máquina de remodelado de la cromatina o HAT, su capacidad para fijar el ADN nucleosomal será muy importante. La mayoría de las proteínas enlazantes de ADN, como LexA, no tienen esta capacidad.

Utilizando otros modelos era necesario explicar de alguna manera por qué no funcionaba simplemente recopilar el dominio de activación del promotor junto con otra proteína como LexA. Por ejemplo, el SNZ2 se podía enlazar cooperativamente en su sitio de unión con otro factor para poder activarse.

Nombre _____

3E (8 puntos). ¿Cómo se podría modificar el ensayo original de transcripción *in vitro* para detectar el efecto del SNZ2? Describir todos los componentes necesarios y el ensayo que se utilizaría para supervisar la transcripción.

-Hacer que el ADN del plásmido sea nucleosomal (no hemos explicado cómo conseguir esto *in vitro*).

-Añadir factores de remodelado de la cromatina y ATP o HATs.

-Realizar el ensayo de la transcripción mediante la incorporación supervisada de dUTP radiomarcado por fijación de filtro o electroforesis en gel (obsérvese que se preguntaba cómo supervisar la transcripción, no cómo supervisar si se remodela la cromatina).

A los ensayos realizados para probar otros modelos se les ha otorgado la máxima puntuación siempre y cuando estuviesen terminados y, en general, tuvieran en cuenta la adición de lo que faltaba en la reacción *in vitro* de la parte A.

Pregunta 4 (25 puntos). Nos acabamos de incorporar a la práctica de Ann Hochchild y queremos ponernos al día con los resultados de Simon Dove sobre los que hemos leído en la tarea de lectura. Estamos especialmente interesados en estudiar la función de los promotores quiméricos y de las proteínas *in vitro*.

Hemos preparado ADN de plásmido que contiene el promotor de tipo salvaje P_{RM} o P_{RM} con un -35 adicional, tal y como se describe en la tarea de lectura. Probamos la capacidad de la forma de superactivación del Sa109 de lcl para estimular la transcripción en presencia o ausencia de la proteína quimérica RNAP α -s⁷⁰. Utilizando un sencillo ensayo de fijación con filtro de incorporación, obtenemos los siguientes resultados:

Nº	Proteína	RNAP	Transcripción (cuentas por segundo)	
			P_{RM} de tipo salvaje	P_{RM} con -35 adicional
1	lcl Ninguno	WT	25 CPS	25 CPS
2	lcl (Sa109)	WT	250 CPS	25 CPS
3	lcl (Sa109)	α -s ⁷⁰	25 CPS	100 CPS

Intrigados por la inducción relativamente pobre detectada en lcl (Sa109) con el RNAP quimérico y el P_{RM} con la región de -35 adicional (Experimento n°3), decidimos que queremos comprobar qué paso del proceso se estimula en las dos combinaciones activadoras (n°2 con el P_{RM} de tipo salvaje y n°3 con el P_{RM} con -35 adicional).

4A (4 puntos). Describir cómo se determinaría el paso del proceso de iniciación que aumenta por la adición del activador lcl (Sa109) en cada tipo de promotor.

(1 punto) Para comprobar qué paso aumenta en el proceso de iniciación, se debe realizar un ensayo en presencia y ausencia del activador lcl (Sa109) en cada uno de los siguientes casos:

(1 punto) Para ensayar la formación de complejos cerrados, llevar a cabo un ensayo de retardo en gel o de protección de DNasa I con wt o RNAP quimérico y el promotor adecuado.

Nombre _____

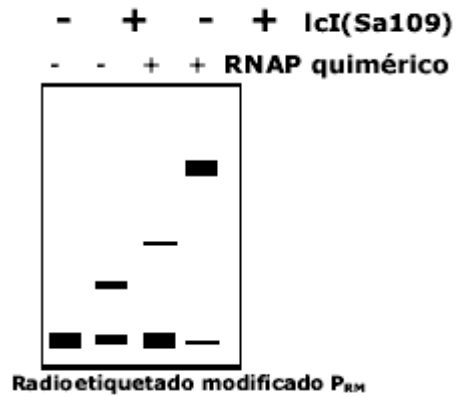
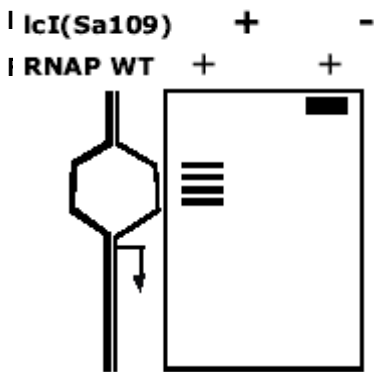
(1 punto) Para analizar la formación de complejos abiertos, llevar a cabo un ensayo esclarecedor de ADN con wt o RNAP quimérico y el promotor adecuado.

(1 punto) Para analizar la formación de complejos ternarios o la limpieza de promotores, realizar un ensayo de incorporación estándar utilizando nucleótidos radiomarcados.

4B (6 puntos). Dibujar los resultados que se esperan obtener si la proteína IclI (Sa109) activa la formación de complejos abiertos con el RNAP de tipo salvaje y el P_{RM} y la formación de complejos cerrados con el RNAP quimérico y el P_{RM} modificado (únicamente es necesario dibujar los resultados del ensayo que se está simulando).

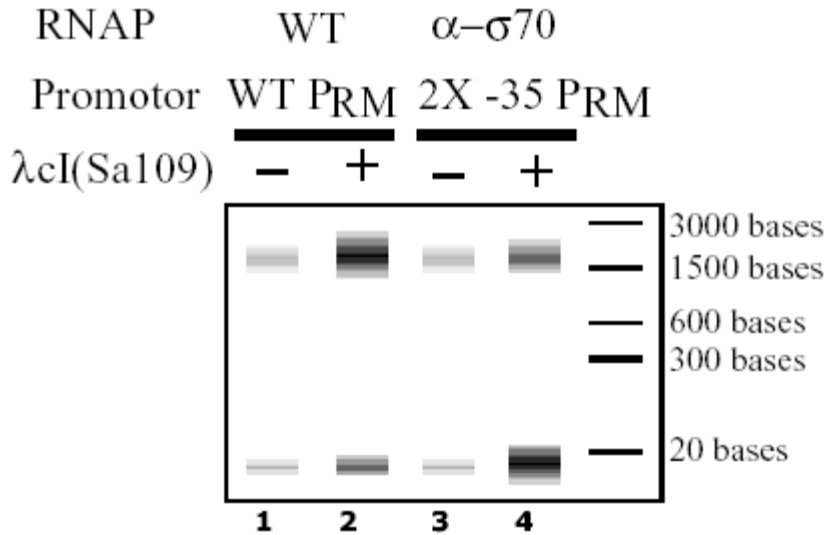
RNAP de tipo salvaje y P_{RM}

RNAP quimérico/P_{RM} modificado



No resulta sorprendente observar que la formación de complejos cerrados se ve estimulada en la situación quimérica (esto es, con RNAP α -s⁷⁰ y el P_{RM} con -35 adicional), pero se quiere analizar la causa por la cual el nivel de estimulación es bajo. Se lleva a cabo un ensayo de incorporación, pero se analizan los resultados en un gel de agarosa desnaturalizado. Los resultados que se obtienen son los siguientes:

Nombre _____



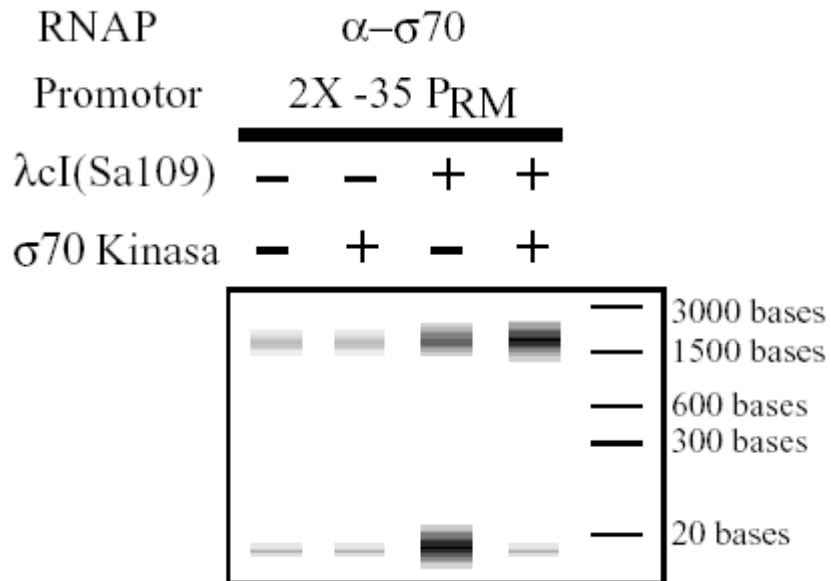
4C (6 puntos). Se propone un mecanismo de activación por λ cI(Sa109) en presencia del RNAP quimérico y del P_{RM} modificado que explique la fuerte inducción de los transcripts abortivos, en comparación con la inducción relativamente débil de los transcripts de longitud completa que se advierten en las filas 3 y 4.

(3 puntos) Una interacción fuerte entre λ cI(Sa109) y el RNAP quimérico aumenta la velocidad de un paso anterior a la eliminación del promotor. (3 puntos) Esta interacción es tan fuerte que también disminuye la velocidad de eliminación del promotor.

Se purifica un factor de extractos de crudo basado en su capacidad de aumentar la estimulación por λ cI(Sa109) en presencia del RNAP quimérico y del P_{RM} modificado. Curiosamente, este factor NO se une al P_{RM} con -35 adicional, ni con λ cI(Sa109) ni sin ella y/o el RNAP quimérico. Por el contrario, se descubre que este factor es una proteína kinasa que fosforila la s^{70} .

Se comprueba el efecto que tiene este factor (denominado kinasa s^{70}) sobre la estimulación de la transcripción mediante λ cI(Sa109) en el promotor con -35 adicional, en presencia del RNAP quimérico. Los resultados que se obtienen son los siguientes:

Nombre _____



4D (4 puntos). Teniendo en cuenta los resultados del ensayo de transcripción anterior, proponer un modelo que explique la capacidad de la kinasa s^{70} para estimular la activación transcripcional mediante λ cI(Sa109).

(2 puntos) La kinasa S^{70} fosforila la S^{70} , cambiando su conformación y aumentando la eliminación del promotor. **(2 puntos)** Este cambio en la conformación puede interrumpir la fuerte interacción entre la S^{70} y la λ cI(Sa109).

4E (5 puntos). Basándose en el modelo propuesto por Dove y Hochschild y en el mecanismo propuesto anteriormente para la función de la kinasa s^{70} , ¿cómo podría afectar la kinasa s^{70} a la capacidad de λ cI(Sa109) para estimular la formación de complejos abiertos a partir del P_{RM} de tipo salvaje y en presencia de RNAP también salvaje?

(1 punto) Según Dove y Hochschild, la interacción entre la S^{70} y λ cI(Sa109) resulta clave para la formación de complejos abiertos. **(4 puntos)** Si la kinasa S^{70} modifica la conformación de la S^{70} e interrumpe su interacción con λ cI(Sa109), cabe esperar que la kinasa S^{70} inhiba la formación de complejos abiertos.