

Nombre _____

Pregunta 1 _____/25 puntos

Pregunta 2 _____/25 puntos

Pregunta 3 _____/30 puntos

Pregunta 4 _____/20 puntos

Total _____/100 puntos

Nombre _____

Pregunta 1. (25 puntos)

Está trabajando en una empresa farmacéutica en un programa para identificar nuevos antibióticos contra la bacteria de la tuberculosis. Recientemente, ha identificado un nuevo antibiótico derivado de bacterias del suelo que aisló en la selva amazónica, y que es muy efectivo contra la tuberculosis. Pensando como el ejecutivo farmacéutico que un día espera ser, lo ha llamado CoughNot (TosNo). Antes de empezar las pruebas clínicas debe determinar el objetivo del antibiótico.

1A (6 puntos). Describa los experimentos que llevaría a cabo para determinar si el antibiótico inhibe la replicación del ADN, la transcripción o la traducción.

Replicación de ADN:

Prueba de incorporación: incubación de células o extracto de células con dNTP marcados con radioactividad, aislamiento del ADN, medición de la radioactividad.

Transcripción:

Lo mismo, pero con UTP marcado con radioactividad.

Traducción:

Lo mismo, pero con aminoácidos marcados con radioactividad. (Si se trata de un extracto, debe ser de tuberculosis, no de reticulocitos de conejo, ya que se quiere inhibir la traducción de la tuberculosis, no la traducción de conejo.)

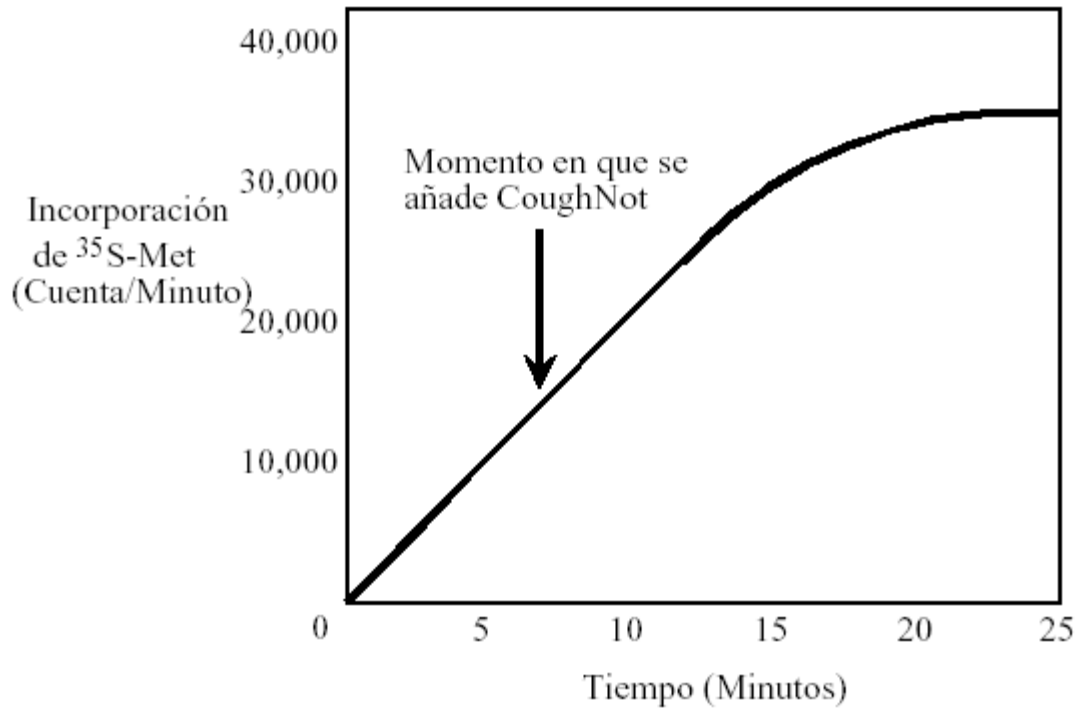
Haga +/- antibiótico en todas las pruebas. Se le concedió medio crédito si utilizó componentes purificados en vez de un extracto, porque hay muchas más proteínas *in vivo* que el medicamento podría inhibir (por ejemplo, para la replicación de ADN, las proteínas iniciadoras, primasa, helicasa, etc.)

1B (3 puntos). Una vez esbozados sus experimentos, envía a sus técnicos a realizar las pruebas. Primero prueban la traducción y hay que el tratamiento con CoughNot la inhibe. Quieren hacer pruebas más detalladas para el objetivo exacto en la traducción, pero usted explica que deben continuar con las pruebas de replicación y transcripción. Explique brevemente por qué es necesario hacerlo así.

Además de que hay múltiples procesos que el medicamento podría inhibir, la transcripción es necesaria para la traducción. La falta de replicación detendría las células y, aunque los procesos metabólicos continuarían, los niveles de transcripción y traducción se podrían alterar (como esto aún no se ha visto, el crédito se otorga por darse cuenta de que la replicación va antes que la traducción o de que su ausencia puede matar a la célula.)

Tras completar las otras pruebas, sus técnicos le han convencido de que la traducción es el objetivo de CoughNot. Lo siguiente que desea determinar es qué paso del proceso de traducción inhibe este antibiótico. Para ello, se añade CoughNot a pruebas de traducción *in vitro* que incluyan Metionina ³⁵S-radioactiva para detectar una nueva traducción. Obtiene los siguientes resultados:

Nombre _____



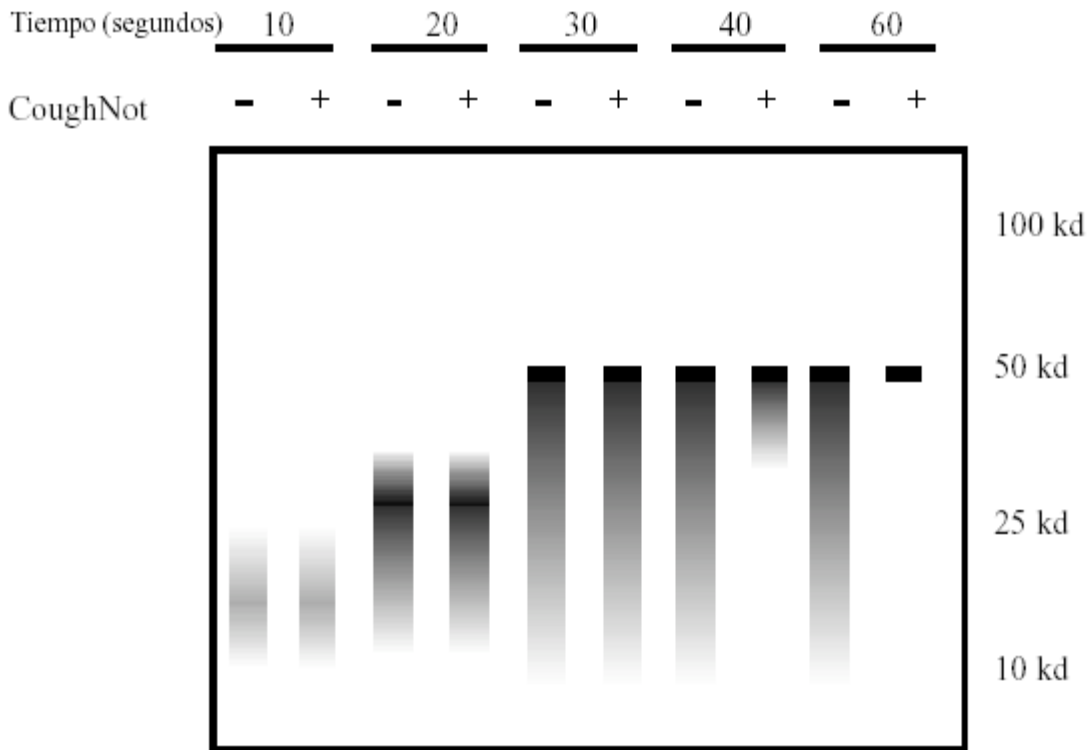
1C (6 puntos). Basándose en esta gráfica, ¿qué conclusiones puede sacar sobre el paso o los pasos de la traducción que CoughNot podría inhibir? Debe suponer que el antibiótico inhibe su objetivo en segundos. Explique cómo respalda sus conclusiones la gráfica.

Iniciación o Terminación. Debido a que la traducción continúa durante un tiempo después de añadido el CoughNot, la elongación no se ve afectada (como un mutante de replicación de ADN de parada lenta). Sin embargo, la traducción sí se inhibe poco después, cuando los ribosomas intentan o bien aniquilar las proteínas que estaban produciendo cuando se añadió el fármaco, o bien iniciar una nueva traducción.

Nombre _____

Para distinguir con más detalle entre los distintos pasos posibles de la traducción que el CoughNot podría inhibir, realiza una reacción de traducción diferente. En este caso, usa Metionina ^{35}S -marcada radioactivamente y añade el CoughNot **antes** de empezar la reacción de traducción *in vitro* añadiendo un ARNm que codifica una proteína de 50 kd.

Tras varios intervalos de tiempo diferentes, **aísla los ribosomas y todas las proteínas asociadas**. Separa las proteínas resultantes en un gel de policrilamida con SDS y expone el gel resultante a una película de rayos X. Los resultados obtenidos con los siguientes.



1D (4 puntos). ¿En qué cambian estos datos su hipótesis sobre el paso en la reacción de traducción inhibido? Proponga un modelo para la acción de CoughNot en función de estos datos.

El defecto no es la iniciación, pues el medicamento se añade antes de que se inicie la traducción añadiendo ARNm. Pero luego, una vez que se sintetiza una cierta cantidad de proteínas de longitud completa, no hay nueva iniciación (40 y 60 segundos). Por tanto, hay un problema en la terminación. Una vez hecha la proteína de longitud completa, no se libera el ribosoma y por tanto no puede iniciar la síntesis de nuevas proteínas.

Nombre _____

1E (6 puntos). Desea determinar si hay factores concomitantes asociados con el ribosoma tras la adición de CoughtNot. Basándose en el modelo anterior, describa para qué factor o factores concomitantes haría pruebas y cómo haría el seguimiento de sus asociaciones con el ribosoma.

Si su modelo en D fuera un problema en la terminación, querría comprobar la asociación de los factores de liberación con el ribosoma.

Aisle los ribosomas y efectúe un gradiente de sacarosa. A continuación, prepare los ribosomas y los factores de liberación por separado. Observe qué fracción de los ribosomas aislados reacciona separando las fracciones en un gel y realizando transferencias *Northern* para ARNr. Observe qué fracciones de los factores de terminación reacciona mediante un SDS PAGE y un *Western* con anticuerpos en comparación con los factores (o márkuelos radioactivamente). Luego, observe si los factores de terminación comigran con los ribosomas aislados del extracto.

La prueba de modificación de la interferencia también puede funcionar, pero no el de retardo en gel.

Pregunta 2 (25 Puntos).

Está interesado en desarrollar la tecnología necesaria para incorporar una Serina modificada químicamente a las proteínas de una posición determinada. Su enfoque consistirá en utilizar un extracto de traducción *in vitro* y programarlo con un único ARNm para la proteína que desea modificar.

2A (4 Puntos). La primera decisión que debe tomar para alcanzar su objetivo es determinar qué codón quiere que reconozca el ARNt acoplado a la Serina modificada. Tiene que asegurarse de que la Serina modificada se incorpora a todas las proteínas sintetizadas en la reacción *in vitro*. ¿Qué codón utilizaría para cumplir este objetivo? Fundamente su elección con dos razones.

El mayor codón para este experimento es el codón de terminación 5'-UAG-3'. El codón de terminación resulta de utilidad porque:

- 1. Ningún otro ARNt usa este codón. Por lo tanto, la traducción de los otros codones puede llevarse a cabo con normalidad, con los aminoácidos normales insertados en su ubicación adecuada. Esto es fundamental para mantener la integridad de las interacciones necesarias para un adecuado plegamiento de las proteínas.**
- 2. Podemos garantizar que *todas* las proteínas que sinteticen tenían una Serina modificada colocando el codón tempranamente en el ARNm. Así, sólo se obtendrán proteínas de longitud completa si la Serina se inserta en la proteína. Si no, la traducción terminará antes de tiempo. Es importante que el verdadero terminador traduccional sea uno de los otros dos codones de terminación.**

Nota: usar el codón de iniciación es problemático por varios motivos. No se puede garantizar que todas las proteínas sintetizadas tengan Serina modificada sin borrar el fMet-ARNt (lo que es imposible). El grupo formilo también es necesario para una iniciación adecuada, al igual que la interacción con los factores de iniciación.

Nombre _____

2B (3 puntos). El siguiente paso es modificar el anticodón de uno de los ARNt de Serina para reconocer el codón elegido. Teniendo en cuenta la elección hecha, qué anticodón escogería? Recuerde que sólo se quiere reconocer un codón.

5'-CUA-3'

Este es el anticodón para 5'-UAG-3'. Utilizando este par anticodón/codón evitará oscilación de apareamiento de bases, que podría darse con los otros dos codones de terminación.

2C (6 puntos). Una vez determinado el codón elegido y modificado el anticodón del ARNt, debe determinar cómo fijar la Serina modificada al ARNt. Como se ha cambiado el anticodón del ARNt y se quiere acoplar una Serina modificada al ARNt, ¿qué zonas de la sintetasa Serina aminoacil-ARNt apropiada puede tener que modificar para poder cargar el ARNt modificado con la Serina modificada químicamente?

Se pueden modificar las siguientes zonas de la sintetasa aa ARNt:

- 1) Habrá que modificar el dominio de unión del anticodón para acomodar la nueva secuencia del ARNt del anticodón.**
- 2) El dominio de unión a aminoácidos se modificará para permitir el reconocimiento de la Serina modificada.**
- 3) El dominio de hidrólisis de aminoácido se modificará para evitar la revisión de la serina modificada.**

Le preocupa si podrá cambiar la sintetasa aminoacil-ARNt de la manera apropiada para que se pueda cargar con la Serina modificada. Por eso, desea investigar otro método para generar un ARNt cargado con Serina modificada.

2D (3 puntos). Describa un método alternativo que se pueda utilizar para generar un ARNt acoplado a la Serina modificada.

Un posible método consistiría en cargar el ARNt con la Serina normal y modificar químicamente la Serina después de cargada en el ARNt.

Usando la estructura cristalina del ARNt enlazado a su sintetasa aminoacil-ARNt cognada, se pueden hacer varias mutaciones clave que permiten que la sintetasa aminoacil-ARNt se enlace con el ARNt modificado, con una alta especificidad, cargándolo con la Serina modificada. Emocionado, usted quiere probar la funcionalidad de su ARNt cargado con Serina modificada en un extracto de traducción *in vitro*.

Nombre _____

2E (3 puntos). Para probar el ARNt cargado de Serina modificada *in vitro* tiene que programar el extracto de traducción *in vitro* con el ARN mensajero apropiado. Describa el ARN mensajero que utilizaría, sin olvidar cualquier cambio necesario para garantizar que la Serina modificada sólo se incorpore en una única posición.

Diseñe su ARNm de modo que el codón UAG aparezca después del de iniciación, pero muy claramente en la secuencia codificadora del ARNm. Para que la terminación de la traducción se dé en el sitio adecuado, se usará, en la ubicación de terminación, cualquier otro codón que no sea el UAG. Así no se obtendrán proteínas de longitud completa si el sistema no funciona.

2E (6 puntos). Está decepcionado porque no ha encontrado pruebas de incorporación de Serina modificada en la proteína objetivo. Dé dos explicaciones basadas en su conocimiento de la traducción. Describa brevemente cómo determinaría experimentalmente si estas explicaciones son responsables de la falta de incorporación.

Dos razones por las que la Serina modificada no se incorpora a la proteína objetivo son:

- 1) El ARNt de Serina modificada no consigue enlazar Ef-Tu y por tanto no es conducido al sitio A. Esto se puede comprobar con un ensayo de ligamento en filtro.**
- 2) El ARNt de Serina modificada puede no ser capaz de entrar adecuadamente en el sitio A del ribosoma. Esto se puede comprobar mediante un gradiente de sacarosa o un ensayo de modificación de interferencia.**

Pregunta 3. (30 puntos)

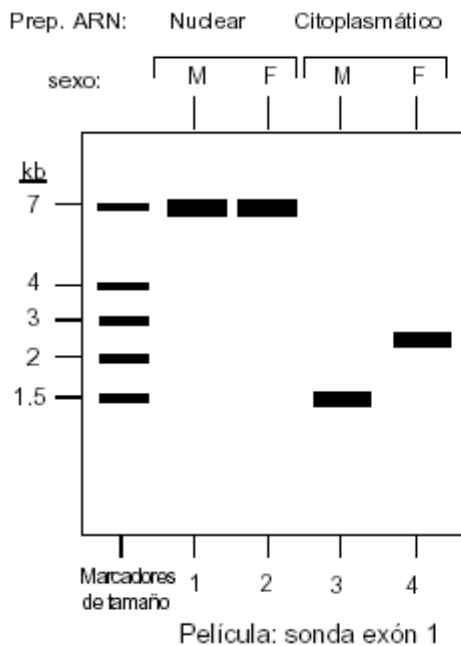
Está trabajando en un laboratorio que estudia el desarrollo en una plaga habitual: la mosca común. Para intentar frenar la proliferación de esta plaga potencialmente transmisora de enfermedades, decide estudiar su desarrollo sexual.

Basándose en el trabajo pionero con la mosca de la fruta, considera la posibilidad de que las moscas comunes macho y hembra se desarrollen de modo diferente, debido a la presencia de una “proteína reguladora principal” que es funcional únicamente en las hembras. El análisis genético descubre un gen candidato para esta proteína reguladora, que llama *Fse1* (*female specific expression 1*).

Como resultado del análisis genético, es capaz de localizar el gen *Fse1* en el ADN cromosómico. Esta información también le permite generar una sonda radioactiva que puede utilizar en transferencias *Northern*.

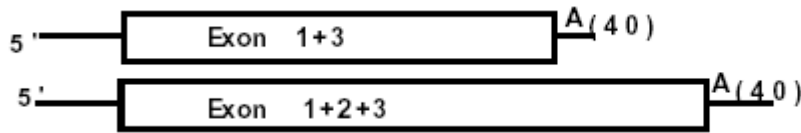
El siguiente es un ejemplo de una transferencia *Northern* que examina cuatro muestras de ARN:

- (1) ARN nuclear para machos
- (2) ARN nuclear para hembras
- (3) ARN citoplasmático para machos
- (4) ARN citoplasmático para hembras

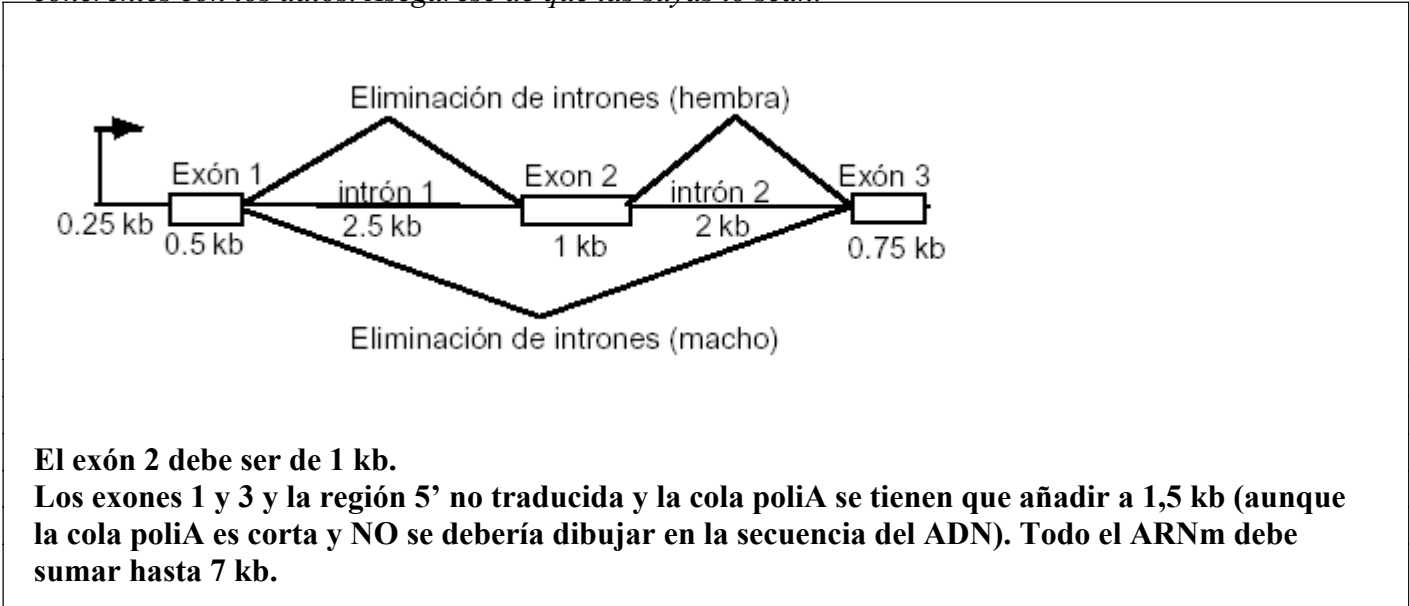


Usando las muestras de ARN citoplasmático, prepare también ADNc y secuencielas. A continuación se muestra una estructura esquemática de estos ADNc.

Nombre _____



3a (6 puntos). Basándose en este análisis, dibuje un diagrama esquemático del gen Fse1 que cumpla los datos mostrados. Indique las características importantes, incluyendo las longitudes de los distintos segmentos del gen. *Nota: varias de las posibles longitudes de diferentes segmentos del gen son coherentes con los datos. Asegúrese de que las suyas lo sean.*



El exón 2 debe ser de 1 kb.

Los exones 1 y 3 y la región 5' no traducida y la cola poliA se tienen que añadir a 1,5 kb (aunque la cola poliA es corta y NO se debería dibujar en la secuencia del ADN). Todo el ARNm debe sumar hasta 7 kb.

3b (4 puntos). A continuación, decide sondear las bases de mecanismo para el ajuste de intrones diferencial del pre-ARNm del Fse1 hallada en los machos, en comparación con las hembras. ¿Qué dos sitios de ajuste (de los cuatro presentes en el pre-ARNm) son los candidatos más firmes para ser reconocidos diferencialmente en machos y hembras? (Nota: para esta cuestión considere los branch sites como parte de los sitios 3' de ajuste). Explique brevemente su respuesta.

El sitio de ajuste 3' eliminación del intrón 1 y el sitio de ajuste 5' de eliminación de intrón 2 Para que al exon 2 se empalme, al menos uno de los sitios flanqueadores no debe estar activo.

Nombre _____

3c (10 puntos). Para conocer más en profundidad el mecanismo de salto de exones en los machos, decide preguntar como interactúan los dos sitios de ajuste, pobremente reconocidos, con componentes de espliceosoma. Diseñe un experimento para investigar esta cuestión.

No olvide incluir: la especie de ARN que quiere usar, la fuente de los componentes de espliceosoma y cómo medirá la interacción. Es más, elija uno de los dos sitios de ajuste (de la respuesta 3b) como defectuoso al interactuar con un componente de espliceosoma y explique qué tipo de resultado le llevaría a esta conclusión.

**RNA: Intrón 1 flanqueado por exones 1 y 2 para comprobar el sitio 3' de ajuste.
Intrón 2 flanqueado por exones 2 y 3 para comprobar el sitio 5' de ajuste.**

Componentes de espliceosoma: extracto de mosca macho.

Incube el ARNm marcado radioactivamente en extracto masculino de ajuste y siga la formación de complejos E, A, B y C por las bandas en pruebas gel *shift* nativo. O incube ARNm no marcado con extracto de ajuste masculino de eliminación de intrones y realice transferencias *Northern* con diferentes ARNs.

Por ejemplo, si el sitio 5' de ajuste fuese defectuoso para enlazar U1 en los machos, el complejo E no formaría un intrón 2 y una transferencia *Northern* no detectaría ARN U1 asociado con el ARNm del intrón 2. En contraste, el ARN U1 se asociaría con el ARNm del intrón 1, pues los machos pueden usar efectivamente el sitio 5' de ajuste.

3d (6 puntos). Basándose en su conocimiento de los principios de la regulación biológica, razona que hay dos tipos básicos de modelos para explicar por qué el exón 2 podría ser omitido específicamente en los machos en comparación con las hembras:

Modelo 1, las células masculinas contienen un inhibidor de ajuste.

Modelo 2, las células femeninas contienen un activador de ajuste.

Utilizando una reacción de ajuste *in vitro*, diseñe un experimento bioquímico que le ayude a establecer cuál de estas dos posibilidades es la más probable. De nuevo, especifique cuál será su sustrato de ARN, el origen de los componentes de la eliminación de intrones. Explique **con palabras** qué resultados espera ver en cada modelo posible. **No hay que trazar los datos esperados.**

Mezcle los extractos masculino y femenino, añada ARNm de longitud completa no marcado con radioactividad al que no se ha aplicado la eliminación de intrones y prepare los productos de eliminación de intrones en un gel desnaturizante. Si ahora el producto final de eliminación de intrones son los exones 1, 2 y 3, los extractos femeninos contendrán un activador (modelo 2). Si el producto final de eliminación de intrones son los exones 1 y 3, el extracto masculino contiene un inhibidor (modelo 1). Para ayudar a identificar los productos de eliminación de intrones se pueden realizar reacciones de control en los extractos masculino y femenino por separado.

Nombre _____

3e (4 puntos). La secuencia de ADNc del ARNm Fse1 específico del macho tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 400 aminoácido, pero no consigue detectar ninguno de estos productos proteínicos utilizando condiciones de transferencia Western muy sensibles. Sugiera **dos** posibles tipos generales de mecanismo que explicarían por qué no se detectan proteínas. *Se aceptan respuestas cortas.*

1-La proteína no se puede regular en el nivel traduccional. (También sería correcto dar una lista de varios mecanismos para esto, mientras sean posibles en las eucariotas.)

2-La proteína podría estar degradada

3-La proteína podría estar procesada proteolíticamente de forma que el anticuerpo no la reconozca.

Pregunta 4. (20 puntos)

Está interesado en comprender los residuos de un intrón de grupo I específico que funciona concretamente en catálisis de la reacción de ajuste. Para investigar esta cuestión, mutagenice el intrón y, usando una criba *in vivo* aisle las variantes mutantes que son defectuosas en la eliminación de intrones.

Debido a que los intrones del grupo I contienen muchas regiones de estructura secundaria que son importantes para el plegamiento del ARN pero que seguramente no estén directamente implicadas en la catálisis, decide analizar inicialmente los ARN mutantes para aquellos defectuosos en el plegamiento. Estos mutantes se separarán, pues no es probable que tengan defectos específicos para los pasos catalíticos.

4a (6 puntos). Descubre que es relativamente fácil aislar el ARN no procesado de sus linajes celulares mutantes. Teniendo esto presente, sugiera un tipo de análisis que pueda usar para buscar mutantes que tengan defectos en el plegamiento del ARN. Explique qué controles usaría y cómo decidiría si el mutante es un defecto de plegamiento.

Se pueden detectar mutantes en el plegamiento del ARN aislando el ARN no procesado de wt y de cada uno de los mutantes y digiriendo individualmente cada uno con nucleasa S1 o con ribonucleasa pancreática de veneno de serpiente. Tiene que hacer un marcaje terminal a ARN y colocarlo en un gel desnaturalizante. La nucleasa S1 digerirá el ARN monocatenario y la SV digerirá el ARN bicatenario. Compare el diagrama de bandas de cada mutante del con el diagrama natural. Cualquier "impronta" que difiera del wt indicará un mutante en el plegamiento del ARN.

4b (7 puntos). Tras separar los mutantes de plegamiento, desea cribar aún más los mutantes, buscando buenos candidatos para tener defectos catalíticos específicos. Decide que será más fácil buscar mutantes con defectos en el segundo paso de ajuste. Su idea consiste en buscar ARNs mutantes que acumulen los intermedios esperados de un ARN capaz de catalizar el primer paso con éxito, pero que presenta un defecto completo en el segundo paso.

Dado el esquema del pre-ARN de longitud completa que aparece a continuación, dibuje la estructura de los ARN que esperaría ver tras una reacción de ajuste *in vitro* para un ARN mutante defectuoso en el segundo paso.



Nombre _____

Y aún más, además del pre-ARNm, ¿qué otros componentes añadiría a la reacción de eliminación de intrones *in vitro*?

1. Nucleósido o nucleótido de guanina
2. Cationes divalentes (p.ej. Mg^{++} o Mn^{++})
3. Cationes monovalentes (p.ej. Na^+ o K^+)

4c (7 puntos). Usando la estrategia esbozada en el punto anterior, identifica satisfactoriamente varios ARN mutantes que son defectuosos específicamente en la realización de la segunda reacción de ajuste. Principalmente, está interesado en mutantes que identifiquen los residuos que son parte verdadera del sitio activo que cataliza esta reacción. Por tanto, lo siguiente es determinar si los ARN mutantes son o no defectuosos en la redistribución estructural terciaria que es necesaria antes del segundo paso de ajuste, pues los mutantes defectivos en esta reacción de reordenación estructural son de menor interés para usted.

Sugiera un método genético o bioquímico que le permita cribar los mutantes defectuosos en la reordenación. Es suficiente con una descripción general del método, sin detalles experimentales.

Usando este método, ¿qué resultados esperaría ver para los mutantes verdaderamente defectuosos en la catálisis?

¿Qué resultados esperaría para los mutantes defectuosos en la reordenación?

Quiere eliminar mutantes defectuosos en la formación de la estructura terciaria. Normalmente, las zonas P1 y P7 van juntas en el paso 1 y las zonas P1 y P9 van juntas en el paso 2 del ajuste de intrones del grupo I. Se pueden hacer pruebas para estas interacciones con un reactivo de unión cruzada. Dado que lo se busca es identificar mutantes en el sitio activo del ARN, estudiará los mutantes que reticulen de manera similar al ARN natural, pero que no logren catalizar el segundo paso.