

INGENIERÍA GENÉTICA

Problemas 1^{ra} parte

NOTA: En los problemas detallados a continuación Ud. debe basarse en las siguientes premisas:

- Dispone de un laboratorio con todo el equipamiento y los reactivos necesarios para llevar a cabo el trabajo
- Debe basarse exclusivamente en los datos disponibles, analizándolos objetivamente (se permite la creatividad personal en el diseño experimental, pero no en la lectura de la información).
- En todos los casos dispone de toda la información necesaria para realizar el trabajo.
- Siempre debe utilizar la metodología más corta, simple y económica.

Problema 1. El DNA del plásmido pHUB1 es circular, de doble cadena y tiene 5,7 kpb. Este plásmido lleva un gen cuyo producto proteico confiere resistencia a la bacteria huésped a tetraciclina (*tetr*). Este DNA tiene un sitio único de corte para las siguientes enzimas de restricción: EcoRI, HpaI, BamHI, PstI, Sall y BglII. El clonado en los sitios BamHI y Sall anula la resistencia a tetraciclina, mientras el clonado en los otros sitios no. La digestión con distintas combinaciones de enzimas de restricción da fragmentos cuyos tamaños se muestran en la tabla. Dibuje el mapa correspondiente al plásmido pHUB1.

Enzimas de Restricción	Tamaño del fragmento (kpb)
EcoRI	5,7
EcoRI, BamHI	0,4-5,3
EcoRI, HpaI	0,5-5,2
EcoRI, Sall	0,7-5,0
EcoRI, BglII	1,1-4,6
EcoRI, PstI	2,4-3,3
PstI, BglII	1,3-4,4
BglII, HpaI	0,6-5,1

Problema 2. En su laboratorio se ha construido una biblioteca genómica a partir de DNA de *S. thermophilus* (digerido con PstI), utilizando pBR322 como vector. El análisis fenotípico de esta biblioteca le permitió identificar un clon positivo (pRH 116) que posee un inserto de 7,0 kpb (con extremos PstI). Ahora, usted desea reducir el tamaño del inserto al mínimo indispensable para un buen nivel de expresión. Para ello, ud digiere el pRH116 con PstI, aísla el inserto completo y luego lo digiere con las endonucleasas de restricción BglII, BstEII, y HindIII, obteniendo un patrón de restricción que le posibilita diseñar el conjunto de deleciones a realizar para acotar el tamaño del inserto que contiene el gen β -galactosidasa.

Productos de digestión del fragmento PstI (kpb)

PstI: 7,0

BglII: 4,0-1,6-1,4

BstEII: 4,5-1,8-0,7

HindIII: 3,4-2,17-0,98-0,45

HindIII + BglII: 2,17-1,4-1,15-0,98-0,85-0,45

HindIII + BstEII: 2,17-1,8-1,35-0,98-0,45-0,25

BglII + BstEII: 4,0-(2)0,9-0,7-0,5

- a) Deducir y dibujar los mapas lineales para cada una de las digestiones antes indicadas. Dibujar el mapa final correspondiente al fragmento de 7,0 kpb.
- b) Para comprobar la presencia del gen de β -gal funcional, se generan distintos fragmentos de restricción que se subclonan en pBR322 y se ensayan su actividad en *E. coli*

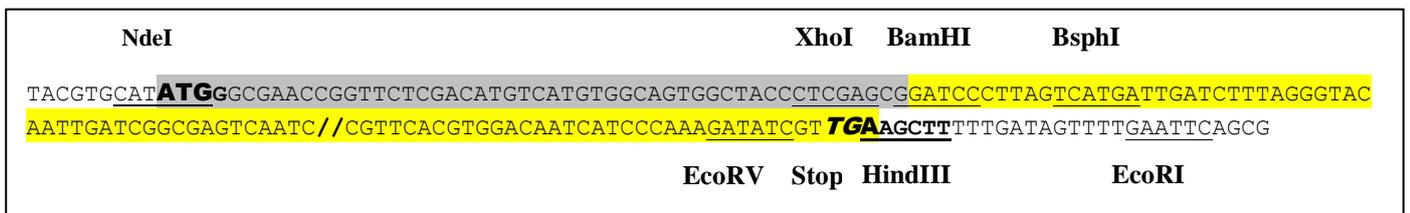
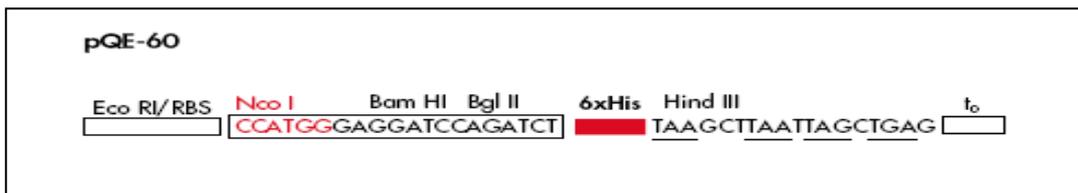
Subclonado en pBR322 de fragmentos derivados del inserto PstI

Fragmento	Plásmido	Actividad β -gal
1,4 Kpb BgIII	pRH117	-
3,4 Kpb HindIII	pRH118	-
3,85 Kpb HindIII	pRH119	+
4,83 Kpb HindIII	pRH120	+
7,0 Kpb PstI	pRH116	+

- 1) Indicar los procedimientos a efectuar para obtener los fragmentos respectivos que fueron subclonados. Detallar el procedimiento de purificación de los fragmentos.
- 2) Describir cómo haría el subclonado.
- 3) ¿Cómo haría para determinar la expresión del gen de β -gal en *E. coli* y obtener los resultados del cuadro?. Indicar las características de la cepa de *E. coli* a utilizar.
- 4) Indicar el fragmento de menor tamaño que contiene el gen β -gal funcional.

Problema 3. A partir del gen de un represor secuenciado y clonado en pZEro decide expresarlo y purificarlo en *E. coli* con el objetivo de realizar un ensayo de *band shift*. Para esto dispone del vector pQE el cual le permite fusionar su gen a un tag de histidina para purificarlo posteriormente. Por otro lado decide expresarlo sin la región Nt que sospecha que está involucrada en el direccionamiento de la proteína.

- a) Diseñe una estrategia basada solo en enzimas de restricción para cumplir el objetivo.



G : péptido señal
A : Represor

- b) Al no obtener clones positivos con esta estrategia decide utilizar *primers* para el clonado del inserto. Esquematice la estrategia y escriba la secuencia de los *primers* a utilizar.

Problema 4. Debido a la severidad del rotavirus, resulta de particular interés la generación de vacunas. Una forma simple de generar vacunas consiste en la producción de proteínas o péptidos inmunorrelevantes del patógeno, su purificación y administración en un huésped sano para que genere anticuerpos contra los mismos. La proteína VP4 de la cápside del Rotavirus, antes de ingresar al huésped, es clivada en el tracto intestinal por la tripsina y forma 2 nuevos péptidos llamados VP5 y VP8. Usted está interesado en generar una fusión del fragmento correspondiente a VP8 con la proteína lumazina sintetasa de *Brucella spp.* (BLS) que se conoce es una proteína capaz de aumentar respuestas inmunes de otras proteínas unidas a ella. BLS ya se encuentra clonada en el vector psRSET. Diseñe una estrategia para subclonar la región codificante para el péptido VP8 en un vector de expresión fusionada a BLS por el N-term y a His-tag por el C-term.

- a) Utilizando solo enzimas de restricción
- b) Utilizando primers

Indicar controles, enzimas utilizadas, secuencia de primers, perfil de ciclado, y formas de screening.

cDNA VP4

```

AAAAATG GTC ---//---- AGT ATA CCT TGG CCA GAA GAT CTT TGC ATA CAAAAT ---//----GGA TAC
TTTTTAC CAG ---//---- TCA TAT GGT ACC GGT CTT CTA GAA TCG TAT GTTTAA ---//----CCT ATG
                AccI           HhaI           BglII           sitio clivaje Vp8

ACT TCA TGA AGT GCA GTA AAT GCA TTT TAAATGGAATTCGTAGG
TGA AGT ACT TCA CGT CAT TTA CGT TTT ATTTACCTTAAGCATCC
        BspHI                NsiI
    
```

psRSET-BLS

```

TTTTGTTTAACTTTAA GAAGGA GATATA ATGCAT AAATACCTGCTGCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCCTCGCTGCCCA
AAAACAAATTGAAATT CTCCTCTATAT TACGTA TTATGGACGACGCTGGCGACGACGACGACGAGGAGGAGCGACGGGT
                RBS                NsiI                BLS

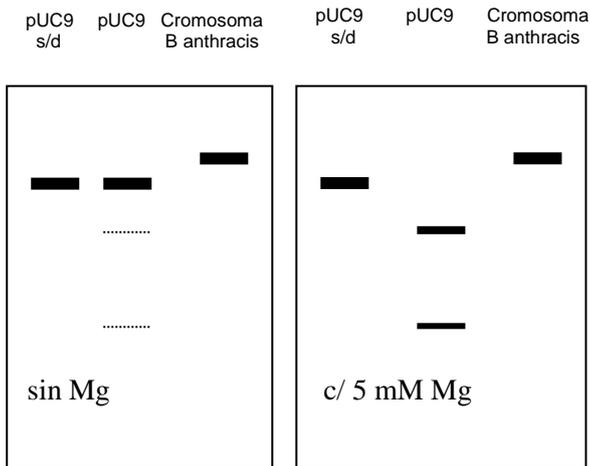
GATGGCCTTGCCATGGATATTTGGATCCGAATTCATCCATGGCAGGTGCGACTAAGCTTGCGGCTACCACCACCACCAC TGAG
CTACCGGAACGGTACCTATAAAGCCTAGGCTTAAGTAGGTACCGTCCAGCTGATTTCGAACGCCGATGGTGGTGGTGGTGGTACTC
                BamHI EcorI NcoI SalI HindIII Tag His STOP
    
```

Problema 5. Luego de analizar los clones de una biblioteca mediante *Dot Blot* y secuenciar el clon que le dió señal positiva y debería contener el fragmento correspondiente al gen E1, encuentra dos potenciales orf (X y Z) con la siguiente secuencia:

```

HindIII                BamHI                NcoI

5' aagcttTTTGTTTTGCAAGTTGGCAGCCACAGGATCCCCTAGAATCC ATCGAACGAATTGACAATTAC - 68
CGACGGTCTTATCTGACACCGTCTACGCCAAGTCACGCGCTGTTCAACGCGACCGAAGTGCCTATTGATC -138
CGAGTTTGATCCGCTATTGGTAAAGAAGATTTAGAAACCATGTTGCAAACCCCGTGCAGACAACCTAACA -208
ACTTTATAA AAGGAGCTGTTTTTCGCGAAAACGCAGCA ATGTTGTTGGCCAATGACGTCGGTTCGAGTCTT -278
CTTTCAGAATACTTGTCAATTCATTCCTCGCGCCATGGAACCCGAAGTGCAGCTGTCCGAACCAAGCACGT -348
CTGGCACAAAGCGCAAAGCTTCTGAAGACATTGATGTAGACAGCGATGATGAATTCAGGGGT TAA TTTTCG -418
                EcoRI
    
```

Se incubó durante una hora a 37 °C 5 µl del extracto crudo con 1 µg del plásmido pUC9 ó cromosoma de *B anthracis*, con y sin MgCl₂.

El plásmido pUC9 fue multiplicado y extraído (por columna de purificación) de la cepa *E. coli* HB101, la cual tiene el siguiente genotipo: recA(-) (sistemas de recombinación deficiente), hsdS (sistema de metilación-restricción deficiente)

- a) De acuerdo a este ensayo, proponga una hipótesis que explique los resultados obtenidos.
- b) Diseñe una estrategia para aislar el gen involucrado en la digestión que se observa, teniendo en cuenta que **NO** posee información acerca de este gen ni de genes relacionados. Por otro lado **TAMPOCO** cuenta con la proteína purificada.

Una vez encontrado el gen decide caracterizar la actividad de la ER.

Usted presume que se trata de una ER tipo II. ¿Cómo haría para confirmar su hipótesis?

Su jefe le pide que caracterice el sitio de reconocimiento de la ER. Para ello debe identificar:

- i- el sitio de unión exacto de la proteína
- ii- la secuencia mínima necesaria para que la proteína tenga actividad
- iii- el sitio exacto de corte
- iv- que tipo de extremos (cohesivo 5', 3' ó romo) y secuencia deja al cortar

Problema 7. En el grupo de investigación donde usted trabaja se pretenden estudiar diferentes genes de un baculovirus en particular (AgMNPV), cuyo genoma es de DNA doble cadena circular y covalentemente cerrado. Su jefe encomienda un gen a cada uno de sus becarios, tocándole a usted la caracterización de una región genómica que codifica para una proteína de unión a DNA, conocida como *p58*. Para llevar adelante este trabajo le han conseguido pZErO, un vector de clonado que asegura una fuerte disminución del *background*. Pero sólo le han dado 5 µl de una miniprep conteniendo ese plásmido con un inserto clonado en el sitio HindIII del MCS (**fig. 1**). Por otro lado, un becario anterior encontró en una biblioteca genómica de AgMNPV realizada por él, pero que lamentablemente no conservó, un clon en pBS-SK (clon J, **fig. 2**) con un inserto de 3,2 kpb, en cuyo extremo (por datos de secuencia) se encontraba la región *upstream* del gen que a usted le encomendaron encontrar y caracterizar.

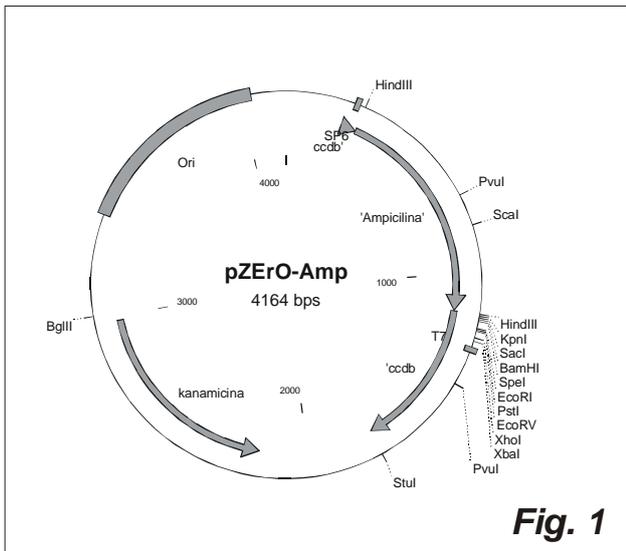


Fig. 1

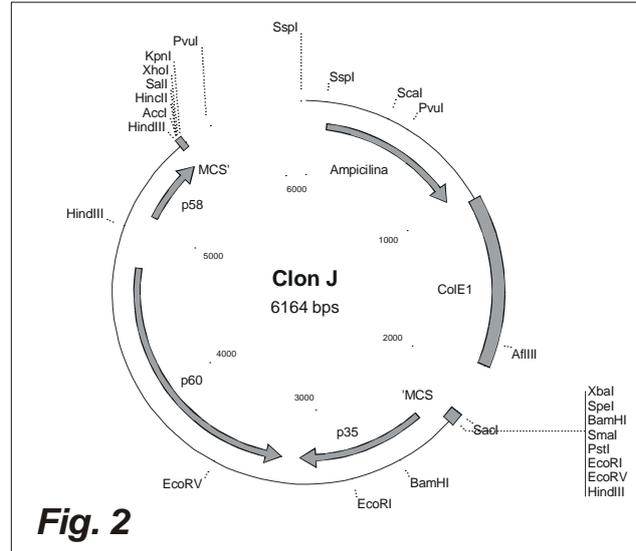


Fig. 2

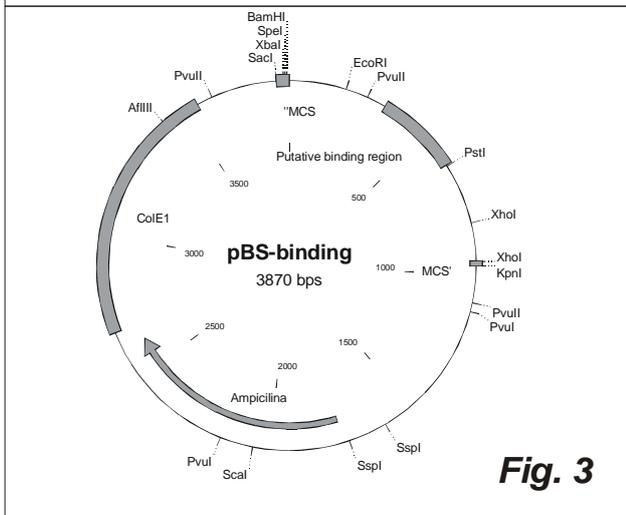


Fig. 3

- Describa como aseguraría para usted y el resto de sus compañeros de laboratorio el suministro continuo del vector pZERO íntegro (igual al comercial) a partir de los 5 µl de la miniprep que le han conseguido.
- Describa el diseño experimental que le posibilitaría la obtención de la totalidad del gen de AgMNPV que codifica para la proteína P58 de unión a DNA. Para esto sólo cuenta (por problemas de presupuesto) con una única endonucleasa de restricción (HindIII).
- Una vez hallado el segmento genómico conteniendo el gen en cuestión, plantee los experimentos mínimos que necesitaría para corroborar la especificidad de unión de la proteína codificada en el mismo a un DNA específico. Para ello cuenta con el posible DNA blanco (**fig. 3**), y ahora sí su jefe le permite comprar otras endonucleasas de restricción (si es que lo desea).

Problema 8. Existe una familia de virus de insectos conocida como Baculovirus. Los mismos poseen un genoma de DNA de doble cadena circular de aproximadamente 150 kpb. Entre ellos se encuentra el virus de la poliedrosis múltiple nuclear *CfMNPV*, baculovirus que infecta al lepidóptero *Choristoneura fumiferana*. Este virus, como otros de su familia, posee dos formas infectivas, las formas brotantes (BV, *budded virus*) y los cuerpos de oclusión (OV, *occluded virus*). Las BVs están formadas por el DNA más proteínas asociadas, todo recubierto por una bicapa lipídica (de origen plasmático) que presenta proteínas virales transmembrana. Los OVs tienen una composición semejante, salvo que la bicapa lipídica proviene de la

membrana nuclear de la célula infectada, y a su vez están ocluidos (de ahí su nombre) en una matriz proteica de forma poliédrica formada principalmente por la proteína Poliedrina.

En estudios de SDS-PAGE se reveló que los baculovirus tienen en ambas formas (BV y OV) alrededor de 30 polipéptidos estructurales. Varias proteínas han sido identificadas como específicas para una u otra forma, mientras que otras son comunes, entre las que encontramos una proteína de la cápside y otra proteína, que potencialmente forma parte de la cápside, conocida como P87, estudiada en *OpMNPV*. En *AcMNPV*, virus de la misma familia, se ha encontrado un ORF semejante.

En conjunto con los experimentos anteriores, también se realizaron ensayos de *Western Blot* sobre extractos proteicos de *CfMNPV*, utilizando antisueros policlonales producidos al inocular conejos con formas BV. Lo que se observó fue que, en ambos casos, hubo reactividad sobre la banda en cuestión (en torno a los 80 kDa), comparando con el patrón del SDS-PAGE. Sin embargo estos resultados no son del todo concluyentes, dado que esa banda observada puede estar constituida por más de un polipéptido diferente.

En el laboratorio donde Ud. trabaja, han decidido caracterizar la presencia de una proteína homóloga a las descritas en *OpMNPV* (P87) y *AcMNPV* (P80) y verificar si la misma se encuentra en las dos formas posibles del virión. Para tal fin, Ud. cuenta con un DNA genómico de *CfMNPV*, purificado por un compañero suyo que ya ha cursado Ingeniería Genética Aplicada.

En función de esta información Ud. debe:

- a). Obtener la región genómica del DNA de *CfMNPV* correspondiente al gen homólogo a *p87* y *p80* de *OpMNPV* y *AcMNPV* respectivamente
- b). Como Ud. necesita generar anticuerpos monoclonales contra esta proteína, para hacer estudios posteriores, describa como la produciría en un sistema procariota para obtenerla en grandes cantidades.
- c). Describa los experimentos que realizaría para demostrar que la proteína en estudio se encuentra presente en ambas formas del virión (BV y OV). Además deberá demostrar si la proteína en cuestión posee en algún momento de su vida un péptido señal en su zona N terminal.
- d). Indicar la estrategia a utilizar para obtener la secuencia nucleotídica completa de la región clonada.
- e). Puesto que Ud. debe caracterizar el gen en su totalidad, describa los experimentos que haría para determinar en qué nucleótido comienza la transcripción.
- f). Pensando en la realización de experimentos futuros, su jefe decide que Ud. realice una construcción plasmídica que le posibilite (cuando curse Ingeniería Genética Aplicada) reemplazar, mediante recombinación homóloga, el gen *p82* de *CfMNPV* con el gen *p87* de *OpMNPV* para verificar si afecta, de alguna manera, el rango de hospedador.

Problema 9. Los hongos filamentosos degradan muchos polímeros complejos, gracias a su propiedad de secretar grandes cantidades de enzimas. Muchas de estas proteínas tienen importantes aplicaciones industriales, algunas de ellas cruciales para la industria de la alimentación. El ascomycete *Cryphonectria parasitica* es reconocido como organismo seguro (GRAS) para humanos, lo que permite utilizarlo en la industria láctea, gracias a ciertas proteínas que secreta, útiles en la producción de quesos. Debido a esto ha sido muy estudiado, pudiéndose lograr entre otras cosas cultivarlo en medio de cultivo líquido con gran éxito.

El grupo de investigación donde usted trabaja ha decidido estudiar vías de secreción de proteínas en organismos eucariotas. En general, las proteínas de exportación suelen sufrir modificaciones postraduccionales y poseen péptidos señal que suelen ser clivados previamente a la secreción.

Para tal fin, y en la búsqueda de un modelo sencillo que permita hacer conjeturas sobre otros eucariotas, incluidos los seres humanos, han decidido estudiar la secreción de la proteína Cryparina del hongo filamentoso *Cryphonectria parasitica*. Esta proteína pertenece a la familia de las hidrofobinas, ubicuas en este tipo de hongos. En estado de crecimiento salvaje o sobre sustrato sólido se la localiza en la pared celular, dando características hidrofóbicas a la misma. Por el contrario, en cultivo líquido, la misma es secretada al exterior.

Su jefe le encarga a usted la ejecución de este estudio. Para ello le comenta lo anterior y le sugiere que realice una búsqueda de secuencias de hidrofobinas de otros hongos (ORFs promedio de 450 pb, inmersos en regiones genómicas de alrededor de 1,5 Kb) pues hay muchas de ellas secuenciadas y hasta el momento se las reconoce como una familia de proteínas altamente conservadas, tanto en sus marcos de lectura como en su organización genómica.

En función de esta información Ud. debe describir como haría para:

- a). Encontrar la región genómica (marco de lectura más secuencias regulatorias y no codificantes) del gen que codifica para la Cryparina de *Cryphonectria parasitica*.
- b). describa los experimentos que necesitaría hacer para determinar en que nucleótido comienza la transcripción.
- c). Demostrar que es producida inicialmente como una preproteína, pero secretada sin su péptido señal.
- d). Puesto que aparentemente Cryparina tendría algún tipo de actividad de aplicación industrial, también Ud desea poder producirla en bacterias, pero sin el péptido señal propio, el cual no funcionaría en procariontes ni tampoco podría ser clivado naturalmente.
- e). Por otro lado, hay grupos de investigación que encontraron que las hidrofobinas presentan una actividad coagulante de la leche, siendo muy útiles para la producción de cuajos. Ya que Ud. no sólo quiere en el futuro modelizar la ruta de excreción de una proteína, sino también encontrar aplicaciones industriales concretas, plantee experimentos que le permitan verificar si la proteína que Ud. produjo en *E. coli* conserva la actividad *wild type*. Recuerde que se ha descrito que estas proteínas de exportación sufren modificaciones postraduccionales, como por ejemplo glicosilaciones que podrían ser cruciales en su actividad. Las mismas se deberían perder al ser expresadas en un sistema procarionte.
- f). Un amigo de su jefe le comenta a éste las ventajas de realizar la purificación de proteínas a partir del sobrenadante del cultivo en lugar de purificarla a partir del citoplasma bacteriano. En función de estos comentarios, a su jefe se le ocurre que esa alternativa podría ser útil para solucionar, al mismo tiempo, otro problema: cuando se la expresa en un sistema tradicional (sólo intracelular), aproximadamente el 40% de la proteína queda en cuerpos de inclusión. ¿Qué modificaciones realizaría para que la proteína sintetizada se exporte al medio de cultivo?. ¿Qué controles realizaría para verificar la presencia de la proteína en el sobrenadante?. ¿Qué controles realizaría para verificar la actividad de la misma?.

Problema 10. La aldehído reductasa, la aldosa reductasa y la carbonil reductasa son enzimas que catalizan la reducción (dependiente de NADPH) de una variedad de compuestos carbonílicos, y están ampliamente distribuidas en mamíferos y plantas. Estas enzimas forman parte de una familia de aldo-ceto

reductasas, cuyas funciones fisiológicas no se conocen muy bien. Las secuencias amino acídicas de las aldosas reductasas y las aldehído reductasas muestran niveles de similitud altos (en particular en la zona C-terminal), mientras que las carbonil reductasas no.

En publicaciones previas se ha descrito la purificación y caracterización de 3 aldehído reductasas dependientes de NADPH: ARI, ARII y ARIII de la levadura roja *Sporobolomyces salmonicolor* AKU4429.

Desde el punto de vista biotecnológico, el interés en estas enzimas radica en la estereoespecificidad que poseen. En particular, los aspectos más conocidos de estas enzimas son los bioquímicos: ARI es la aldehído reductasa más abundante en *S. salmonicolor* y cataliza la reducción asimétrica del Ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate (4-COBE) al enantiómero Ethyl (*R*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate (4-CHBE); mientras que ARII es producida en cantidades sensiblemente menores, y cataliza la reducción del 4-COBE al enantiómero (*S*) del 4-CHBE (92,7% de exceso del enantiómero). Los aspectos moleculares de ARII, se conocen mucho menos que los de ARI.

Desde este punto de vista, se sabe que la proteína ARII es un polipéptido de ~ 37300 daltons, que puede ser purificado (con mucho trabajo) en pequeñas cantidades a partir de extractos proteicos de *Sporobolomyces salmonicolor* AKU4429.

En su laboratorio están muy interesados en caracterizar genéticamente ARII para poder comparar los mecanismos catalíticos de ARI y ARII y conocer las bases moleculares de la estereoespecificidad. Para ello, un becario anterior a Ud. había realizado un *Northern* sobre RNA total de *Sporobolomyces salmonicolor* AKU4429, utilizando una sonda derivada de un clon de cDNA codificante para ARI de *S. salmonicolor*. En este ensayo, se obtuvo como resultado una imagen autorradiográfica que mostraba 4 señales muy fuertes de hibridación: una banda de ~5600 nt, una banda de ~4500 nt, una banda de ~1500 nt y una banda de ~1200 nt; se sabe que la primera y la tercera corresponden a ARI, respecto de las otras dos el becario anterior asegura que corresponden a ARII. A partir de este punto, el trabajo lo continúa Ud.

En función de esta información, Ud. debe:

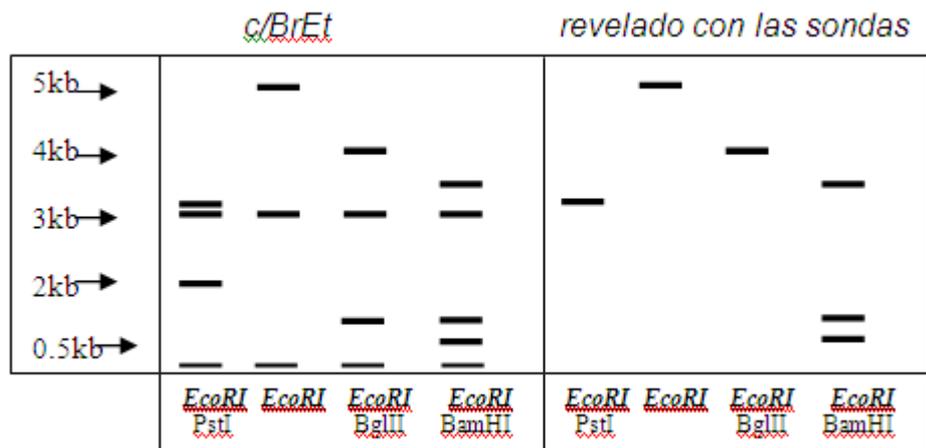
- a). Confirmar si los resultados (y las afirmaciones) del becario anterior son correctas
- b). Explicar por qué se observa más de una banda atribuible a ARII en el *Northern blot*
- c). Describir cómo realizaría el clonado del gen correspondiente a ARII en un sistema procariota
- d). Indicar la estrategia a utilizar para obtener la secuencia nucleotídica completa de la región clonada.
- e). Transferir el segmento de DNA necesario a un vector de expresión procariota que permita sobreexpresar la enzima y verificar la actividad de la misma.
- f). Asumiendo que Ud. ya puede producir (y purificar) grandes cantidades de la enzima, idear un sistema en el cual se pueda realizar la transformación continua del 4-COBE a 4-CHBE.

Problema 11. Las Fosfatasas Acidas bacterianas poseen un PM promedio de 67 kDa.

Utilizando dos sondas diseñadas para detectar el gen que codifica para la Fosfatasa Acida, (una de ellas correspondiente a 200 nt del extremo 5' del gen y otra correspondiente a 230 nt del extremo 3'), se identificó por *colony blot* un clon positivo en una biblioteca genómica total de *S. piogenes*, generada mediante digestión con EcoRI y clonada en pZER0.

El mapeo del clon con diferentes enzimas de restricción (digestiones dobles con enzimas del *polilynker*) y luego hibridado con las sondas genera el siguiente patrón.

Southern Blot:



***EcoRI* se utilizó para digerir el genoma y generar la biblioteca**

Usted necesita secuenciar su inserto para luego poder expresarlo

-Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del mapeo de restricción y *southern blot* realizado, analice todas las bandas y explique en cada digestión qué es lo que usted saca como conclusión. Proponga un mapa posible de su clon.

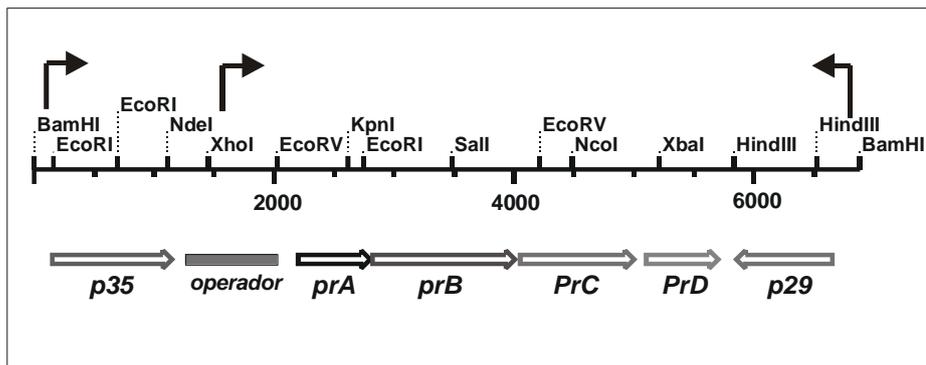
Problema 12. En las ciénagas y estanques, ambientes ricos en material orgánico en descomposición, existen microorganismos interesantes para su estudio, con la potencialidad, por ejemplo, de encontrar ejemplares útiles para la biorremediación de efluentes cloacales. Uno de ellos, *Firmannia crovis*, es una bacteria *Gram negativa* aeróbica que además de ser un eficiente detritívoro, tiene la capacidad de colonizar el ecosistema donde habita, consumiendo incluso a otros microorganismos competidores. Un grupo de investigación alemán interesado en esta particular bacteria, encontró y secuenció la región genómica (6879 pb) involucrada en tales funciones (**Fig. 1**). Una caracterización parcial del sistema allí codificado, mostró una potencial organización en forma de operón para los genes *prA*, *prB*, *prC* y *prD*, mientras que en cambio, *p35* y *p29*, presentan sus propias regiones promotoras. Estudios preliminares modelizaron el funcionamiento del sistema, el cual funcionaría de la siguiente manera:

P35 y P29 serían dos proteínas constitutivas con capacidad de interactuar con el operador del potencial operón. En condiciones de exceso de ATP (medios ricos), una de ellas, el potencial **activador**, se fosforilaría en forma de autoquinasa, disminuyendo su capacidad de pegado en la zona del operador, por lo que la otra, el **represor**, resultaría capaz de bloquear la transcripción del sistema *prABCD*. Cuando los nutrientes escasean (medios mínimos), la disminución de la concentración citoplasmática de ATP provocaría la pérdida del fosfato en el **activador**, el cual, en la condición desfosforilada, tendría una mayor capacidad de interacción con el operador que el **represor**, facilitando así la transcripción del operón. Este operón codifica para una toxina (PrA), un transportador de membrana (PrB) y dos proteínas exportables de actividad desconocida (PrC y PrD).

Cuando este sistema se activa, la bacteria es capaz de matar a otros microorganismos competidores, a los cuales también utiliza como fuente de nutrientes. Además, se sabe de la existencia de un gen de inmunidad, gracias a que se encontró una cepa de *Firmannia crovis* que al cultivarla en medios mínimos muere a causa de la expresión del sistema *prABCD*. A partir de la información anterior, plantee estrategias experimentales para los siguientes puntos:

- Demostrar que los genes *p35* y *p29* son constitutivos, y que los genes *prA*, *prB*, *prC* y *prD* conforman un operón inducible sólo en medios de cultivo mínimos.
- Determinar entre las proteínas P35 y P29 quién es el represor y quién el activador. Para ello plantee ensayos *in vitro* e *in vivo*.
- Demostrar la existencia de las proteínas PrC y PrD en *Firmannia crovis*, y determinar si presentan actividad proteasa, RNAsa o DNAsa.
- Encontrar el gen de inmunidad que le permite a la bacteria expresar este sistema sin verse afectada.

Fig.1



Problema 13. Los genes que codifican para β -lactamasas son comunes en bacterias Gram negativas. La resistencia a carbenicilina es típica de una β -lactamasa (tipo A), que se produce constitutivamente, es de amplio espectro, y usualmente tiene una masa molecular aproximada de 20 kDa.

Por otra parte, la resistencia a cefalosporinas deriva de una β -lactamasa inducible (tipo B), que es una cefalosporinasa de masa molecular aproximada 34 kDa. Estas enzimas son específicas para la hidrólisis de muchas cefalosporinas. La resistencia a nuevas cefalosporinas está asociada con niveles relativamente altos de estas enzimas.

En el laboratorio donde Ud. trabaja se está estudiando la resistencia a antibióticos de *Yersinia enterocolitica*. Trabajando con distintos serotipos se encontró variación en la resistencia, el serotipo O:3 posee resistencia a carbenicilina y varias cefalosporinas, mientras que el serotipo O:5b solamente posee resistencia a unas pocas cefalosporinas.

Estos resultados le sugieren que el serotipo O:3 podría poseer dos genes de β -lactamasas, mientras que el serotipo O:5b tendría uno solo.

Su jefe le encomienda a Ud. estudiar en detalle el o los genes asociados con la resistencia a estos antibióticos, incluyendo los aspectos de regulación de la expresión génica, sabiendo que no cuenta con sondas de β -lactamasas conocidas.

- Esquematice la estrategia experimental para identificar y caracterizar los genes involucrados en la resistencia de estos dos serotipos.
- ¿Cómo determinaría por otra técnica que no sea *Northern blot* si estos genes pertenecen a un operón?
- Plantee un sistema para saber si los genes son constitutivos o inducibles.
- Usted supone que puede haber una expresión diferencial de alguno de los genes y eso conferir resistencia al antibiótico. ¿Cómo haría para cuantificar la cantidad de expresión de cada gen?

e). Usted encuentra que en el serotipo O:3 el gen de β -lactamasa (para cefalosporinas) se expresa mucho más que en el serotipo O:5. Proponga una hipótesis de por qué podría estar pasando esto (donde radica la diferencia) y los ensayos necesarios que debería hacer para comprobarla.

Problema 14. La búsqueda de enzimas con nuevas o mejores actividades es uno de los pilares de las industrias dedicadas a la biotecnología. Por ello, infinidad de grupos de investigación son financiados con el fin de encontrar los genes implicados en tales actividades, caracterizar sus proteínas y producirlas en gran escala. A usted, como nuevo empleado de una flamante industria nacional del ramo, le encomiendan como tarea hallar enzimas con diversas actividades. Su jefe pretende que, en el término de un año, comiencen a producirse las nuevas proteínas en sistemas de expresión heterólogos. En particular, desea hallar enzimas con actividad: *Agarasa*, *Pectinasa*, *Quitinasa*, *Capacidad de metabolizar hidrocarburos*.

Como insumos para satisfacer los requerimientos de su superior, usted dispone de:

- Un cepario con 250 bacterias de especies diferentes.
- Los materiales necesarios para determinar las actividades buscadas (agar, un conjugado de pectina que cambia de color al ser degradado, un sustrato sintético susceptible a las quitinasas produciendo productos fluorescentes, .medios de cultivo con hidrocarburos derivados del petróleo).

Para llegar a cumplir los objetivos propuestos, determine

a) Un ensayo que le permita seleccionar bacterias del cepario con alguna de las actividades antes mencionadas.

Luego de cumplir con lo anterior, usted encontró que una misma bacteria, una *Pseudomona putida*, presenta las actividades *Agarasa* y *Pectinasa*, una termófila la actividad *Quitinasa*, y una *Enterobacter spp*, con la capacidad de metabolizar hidrocarburos.

- b) Plantee una estrategia experimental que le permita hallar la secuencia de los genes que codifican para las actividades anteriores.
- c) Determine si los genes hallados son constitutivos, o si se inducen en presencia de los sustratos adecuados.
- d) Determine la localización física de las proteínas anteriores en sus respectivos organismos. Es decir, si están asociadas al citoplasma, a las membranas o en el medio extracelular.

Luego de realizar el ensayo anterior, usted determinó que la *Agarasa*, la *Pectinasa* y la *Quitinasa* se hallaban en el medio extracelular, y que la enzima con capacidad de metabolizar hidrocarburos era citoplasmática.

e) Plantee una estrategia para poder expresar estas proteínas en *Escherichia coli*.

Problema 15. Usted está estudiando y caracterizando las secuencias mínimas promotoras reconocidas por la RNA polimerasa de un nuevo fago de *E. coli*. Para ello ha clonado y secuenciado el gen completo de una proteína regulatoria (pE-1) que se transcribe tempranamente en el ciclo viral del fago, y sabe que la RNA polimerasa transcribe este gen independientemente de otras proteínas, pero tiene la sospecha que podría actuar formando dímeros.

Por otro lado en trabajos anteriores usted ha podido expresar y purificar la RNA polimerasa del fago. Su becario realiza una serie de estudios con la región *upstream* del gen *pe-1* para determinar la secuencia mínima de reconocimiento de la RNA pol.

Figura A:

Primer extensión

Se purificó RNA total y luego se utilizó un *primer* específico marcado con ^{32}P a 7 pb del ATG. Paralelamente se realizó una reacción de secuenciación a partir del clon con el gen de *pe-1* utilizando el mismo *primer*.

Figura B:

Band-shift

Se utilizaron fragmentos marcados con ^{32}P de 15 a 70 pb *upstream* al ATG y se los preincubó con la RNAPol purificada.

Figura C:

Footprinting

Se utilizó un fragmento de 75 pb *upstream* al ATG, marcando alternativamente una y otra hebra. Se utilizó como marcador el mismo fragmento marcado en el extremo 5' de la hebra no codificante y codificante (según corresponda) digerido químicamente en C y G.

Figura B

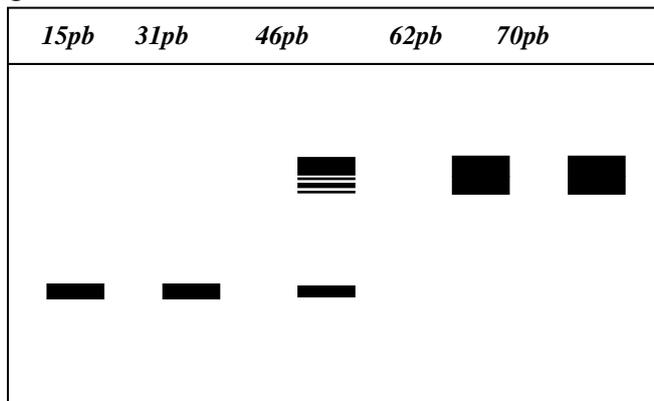


Figura A

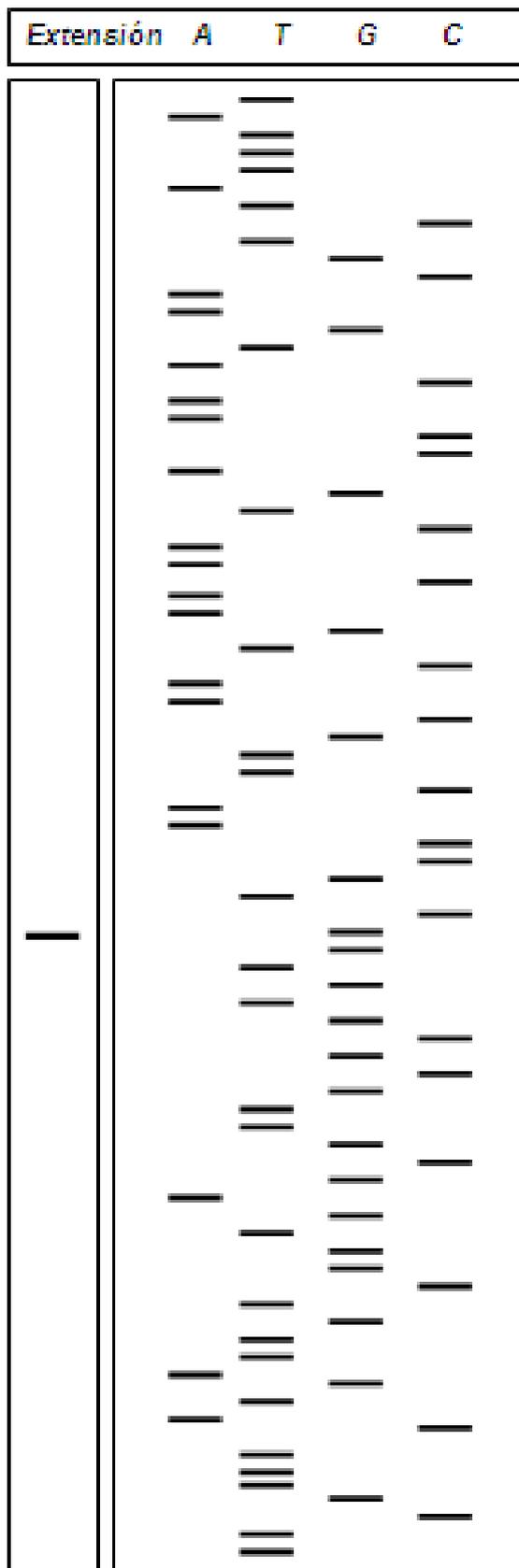
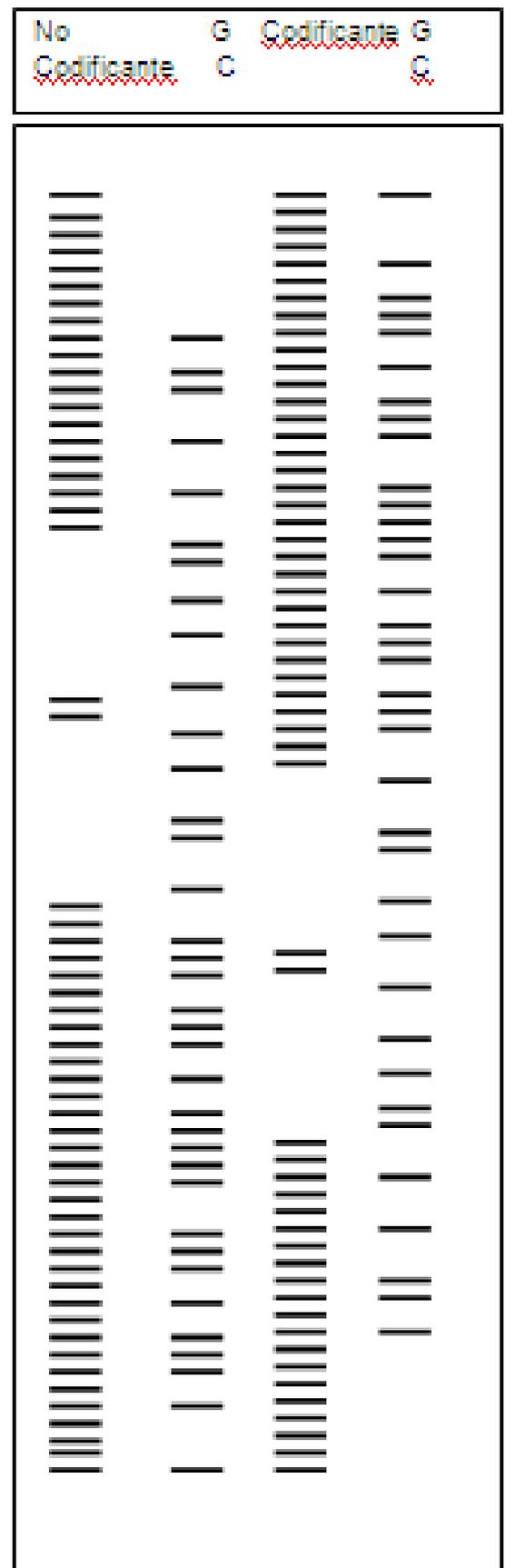


Figura C



- a).** Escriba la secuencia mínima promotora que usted deduce de estos resultados. Esquematice como está organizada la región *upstream* del gen, indicando a que distancia se encuentra el +1 de transcripción, el ATG, y la secuencia promotora.
- b).** Proponga un sistema con el cual pueda corroborar cuantitativamente estos resultados. ¿Qué ensayos faltarían para determinar exactamente la secuencia mínima?
- c).** Mencione si en la **Figura B** faltan controles y si fuese así cuales serían.

De acuerdo a la información que obtuvo con estos experimentos usted sospecha fuertemente que esta proteína está actuando como dímero, ¿por qué?. Diseñe algún experimento que confirme esta hipótesis