

INGENIERÍA GENÉTICA

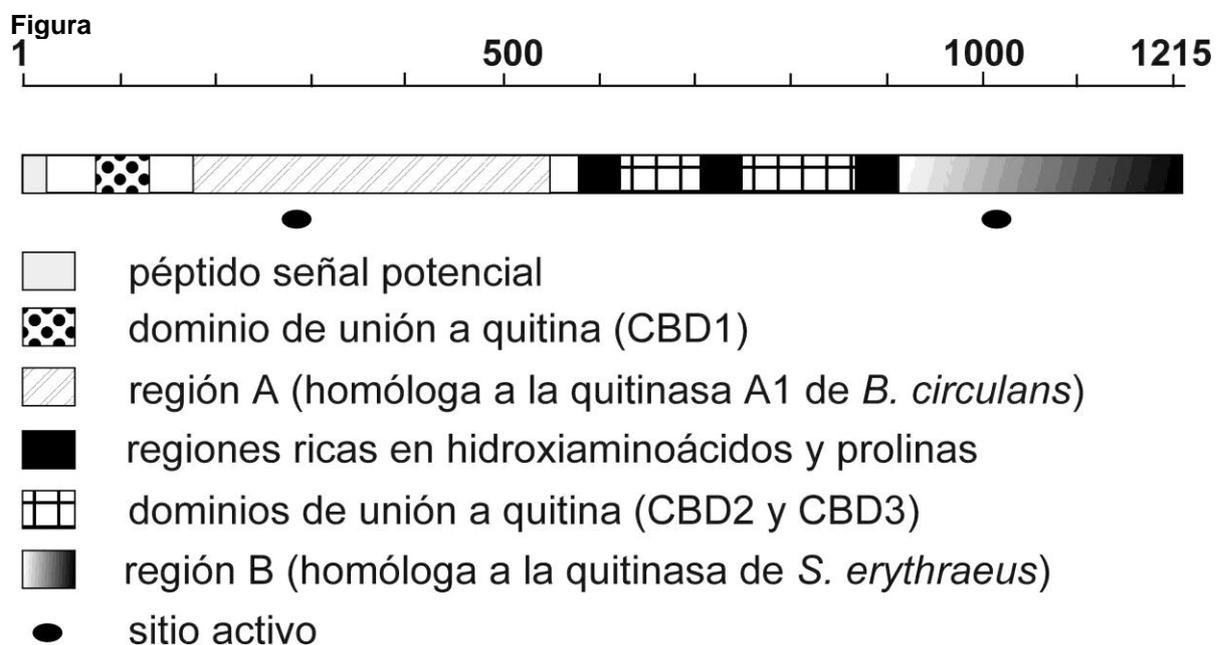
Problemas 2^{da} parte

- 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. Las quitinas constituyen una gran familia de glicanos que son polímeros lineales de N-acetilglucosamina (NAcGlc) unidos por enlaces α -1,4. Estos compuestos están presentes en las paredes de muchos hongos, en el exoesqueleto de los insectos, los arácnidos y muchos otros grupos de invertebrados, y como parte del polímero extracelular de algunas bacterias. La quitina es el segundo compuesto orgánico más abundante (después de la celulosa). Se calcula que la producción natural de quitina está en el orden de 10^{10} a 10^{11} toneladas/año. Por lo tanto, la producción de enzimas capaces de hidrolizar eficientemente la quitina (quitinasas) es altamente deseable para una efectiva utilización de esta abundante biomasa.

Hasta el presente se han descrito varias quitinasas provenientes de eucariotes y bacterias. Sorprendentemente, en un trabajo reciente se describe la existencia de un gen codificante para una quitinasa en una arquea hipertermofílica: *Thermococcus chitinophagus*, la cual utiliza la quitina como fuente de carbono.

En su laboratorio están trabajando en la caracterización de los genes presentes en el genoma de otra arquea: *Pyrococcus kodakaerensis* KOD1. Durante la etapa de búsqueda de homólogos de quitinasas, otro miembro del laboratorio determinó la existencia de un gen, al cual bautizó *chiA*, de 3645 nucleótidos (codificante para un polipéptido de 1215 aminoácidos). Este gen fue clonado y secuenciado en su totalidad. Las búsquedas de homología en los bancos de datos sugieren la existencia de distintos dominios (detallados en la **figura 1**)



En el laboratorio donde Ud. trabaja están interesados en estudiar en detalle la funcionalidad de este polipéptido y de los distintos dominios, con 3 objetivos principales:

- Producir la proteína *wild type* en forma recombinante en grandes cantidades (en *E. coli*).
- Aumentar el conocimiento básico sobre la proteína y determinar la imprescindibilidad de algunos de los dominios.
- Desarrollar un vector de expresión procariótico que permita la expresión de proteínas heterólogas y su fácil purificación mediante la fusión a uno de los dominios de unión a quitina de *P. kodakaerensis* KOD1 (CBD2 o CBD3).

Información adicional necesaria

Secuencia posterior al péptido señal.

```
61 GCAGTATTGACCGCCGTCGACCTTACAAACGCAAGTCGTTAC
21 A V L T A V D L T N A S R Y
```

Secuencia del primer sitio activo de Quitinasa (el residuo en **negrita** y marcado con un asterisco se supone que es el donador de electrones necesario para la actividad hidrolítica)

```
712 AAGTATCCAGCCGTC AAGGTTCTCATCTCAGTCGGCGGATGGACTCTCAGCAAGTACTTC
238 K Y P A V K V L I S V G G W T L S K Y F

772 TCGGTGGTCGCCG CAGACCCGGCCAAGAGACAGCGCTTCGCCGAGACTGCCATAGAGATC
258 S V V A A D P A K R Q R F A E T A I E I

832 CTCAGAAAGTACAACCTCGACGGAATTGATATCGACTGGGAGTACCCGGGCGCGGAGGT
278 L R K Y N L D G I D I D W E Y P G G G G
                               *

892 ATGGCGGGCAAC
298 M A G N 301
```

Secuencia del dominio de unión a quitina CBD2

```
1873 AAGCCGGGTTCTTTGAGCGTCAAGGTAACCGACTGGGGCAACACTGAATACGATGTCACC
625 K P G S L S V K V T D W G N T E Y D V T

1933 CTCAACCTCGGTGGAACCTATGACTGGGTCGTC AAGGTC A AACTCAAGGACGGTTC AAGC
L N L G G T Y D W V V K V K L K D G S S

1993 GTATCGAGCTTCTGGAGCGCAACAAGGCCGAGGAAGGCGGTACGTCGTCTTCACGCCG
V S S F W S A N K A E E G G Y V V F T P

2053 GTGAGCTGGAACAGGGGGCCGACGGCAACGTTCCGGATTCATCGCCACTGGAAGCGAGTCC
V S W N R G P T A T F G F I A T G S E S

2113 GTTGAAGCGATTTACCTCTACGTAGACGGCCAG
V E A I Y L Y V D G Q
```

Nota (detalles técnicos)

La actividad de quitinasa puede ser determinada mediante un ensayo fluorométrico utilizando 4-methylumbelliferyl N-acetyl- α -D-glucosaminide (GlcNAc-4MU). La fluorescencia liberada por la 4-methylumbelliferone (4MU) puede ser medida en un espectrofotómetro de fluorescencia con energías de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm.

En función de esta información Ud. debe:

- Describir la estrategia experimental a utilizar para clonar en un vector de expresión y producir la Quitinasa de *Pk KOD1* en *E. coli* en grandes cantidades, funcional y fácil de purificar. Para esto elija un vector de expresión y escriba la secuencia de los *primers* que diseñe. Indique en detalle que ensayos realizaría para verificar la actividad.
- Indicar la estrategia a utilizar para obtener un mutante de delección que contenga sólo desde el residuo posterior al término del péptido señal hasta el último residuo del primer sitio activo de Quitinasa. Además, debe indicar que ensayos (y controles) realizaría para verificar si este mutante tiene actividad y determinar la relación de actividades *versus* la proteína nativa.
- Como una alternativa adicional al estudio anterior, sus jefes le piden que construya una versión mutante de la Quitinasa donde elimine el donador de electrones del primer sitio activo reemplazándolo por un codón de leucina. Ud. debe indicar cómo haría la mutagénesis y la construcción final para su expresión.
- Diseñe un experimento que le permita confirmar la existencia del sitio CBD1.
- Pensando en el desarrollo de un nuevo vector de expresión de genes heterólogos, su jefe decide que Ud. realice una construcción plasmídica que le posibilite clonar cualquier marco de lectura abierto en fase (por la región 3') con la secuencia codificante para CBD2 de *Pk KOD1*. Este producto de fusión podría ser fácilmente purificable mediante una columna de afinidad con quitina inmovilizada. Para la

construcción se decide utilizar el plásmido pZErO como punto de partida. Ud. debe detallar todas las etapas constructivas, señalando en cada una las razones para realizarla.

Problema 2. El sistema proteolítico de las bacterias lácticas, encargado de la degradación de la caseína de la leche, consta de 1 proteasa, varias aminopeptidasas y un sistema de transporte de péptidos. La actividad de este sistema determina la velocidad del proceso de fermentación y juega un rol crucial en el desarrollo del aroma, sabor y textura del producto final (yogur y queso).

Se han analizado las propiedades bioquímicas del sistema proteolítico y la mayoría de los genes han sido clonados y secuenciados, entre ellos los genes cromosomales **pepN** (aminopeptidasa) de las cepas Wg2 y CH de *Lactococcus spp.* La actividad de la aminopeptidasa **PepN** de la cepa productora CH, que cataliza la eliminación de residuos leucina amino-terminales, tiene una actividad 20 veces menor que la correspondiente enzima de la cepa Wg2. Esto se debe a cambios estructurales en la enzima, derivados de 34 sustituciones aminoacídicas.

Dado que la cepa productora CH posee características adicionales que la hacen elegible como *starter*, respecto a Wg2, se desea trasladar la mayor capacidad de leucil-aminopeptidasa de la cepa Wg2 a la cepa CH. Se debe tener en cuenta la necesidad de respetar que la cepa modificada sea *food grade*.

Los elementos con que Ud. cuenta son:

- Conocimiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes **pepN** de ambas cepas.
- El vector pVS71, que contiene un origen de replicación (Ori) para Gram positivas y los genes de resistencia a eritromicina (Em) y ampicilina (Amp).
- Las cepas tipo salvaje Wg2 y CH de *Lactococcus spp.*

a) ¿Cuál sería la estrategia experimental que Ud. utilizaría para alcanzar el objetivo propuesto con los elementos de los cuales dispone?.

b) ¿De qué manera comprobaría, a nivel molecular y fenotípicamente, que ha logrado trasladar la mayor capacidad de aminopeptidasa **PepN** de la cepa Wg2 a la cepa CH?

Problema 3. Usted ha comenzado a trabajar en una industria biotecnológica, y su primer proyecto dentro de la misma consiste en encontrar nuevos promotores fuertes funcionales en *E. coli* e inducibles por temperatura con el fin de desarrollar nuevos vectores de expresión.

- a) Describa la metodología a aplicar para hallar el mayor número de promotores inducibles por temperatura en *E. coli*.
- b) Proponga un experimento que le permita elegir el promotor con mayor nivel de actividad de todos los hallados y compararlo con el promotor *lac*.
- c) Proponga un experimento que le permita aumentar la actividad promotora de la secuencia elegida en el punto anterior.
- d) Describa los pasos experimentales que seguiría en la etapa de construcción de un vector de expresión utilizando el promotor del paso c).
- e) Indique que pruebas realizaría para asegurarse que el vector está bien construido y que el promotor realmente funciona como se espera en su nueva localización.

Problema 4. El xilano es un componente importante de las paredes celulares de las plantas. La hidrólisis del xilano implica la acción de endo- β -1,4-D-xilanasas y β -D-xilosidasas. Recientemente, se aisló una bacteria hemicelulolítica perteneciente al género *Cellulomonas*, a partir del intestino terminal de las larvas de un insecto herbívoro (*Pachnodae marginata*). Esta bacteria, *Cellulomonas pachnodae* secreta xilanasas y endogluconasas el medio.

Las endo- β -1,4-D-xilanasas bacterianas pueden estar formadas por múltiples dominios discretos unidos por secuencias que actúan como linkers. Los dominios catalíticos existentes pertenecen a la familia de los dominios de unión a celulosa (CBDs) y dominios de unión a xilosa (XBDs). Además, pueden contener dominios de unión de polisacáridos, dominios de termoestabilización y otros.

Desde un punto de vista tecnológico, es interesante disponer de una endo- β -1,4-D-xilanasas recombinante. Por ello, en su laboratorio están interesados en caracterizar a nivel molecular el producto del gen Xyn11A de *Cellulomonas pachnodae*. En trabajos previos en el grupo, se caracterizó el producto proteico codificado en este gen como un polipéptido de ≈ 35 KDa, y se obtuvo la secuencia nucleotídica a partir de una biblioteca genómica.

El polipéptido XYN11A comprende 335 aminoácidos y, en función de análisis de homología con otras xilanasas conocidas, se han ubicado dos dominios: un dominio catalítico y un dominio de unión a xilano (XBD).

En su laboratorio están interesados en caracterizar a nivel molecular más profundo el gen *xyn11A* y, además, evaluar la factibilidad de introducir modificaciones que permitan ampliar el uso biotecnológico de este producto proteico. Desde este punto de vista, los objetivos principales del laboratorio son tres:

- Incrementar el conocimiento básico Xyn11A, a nivel molecular.
- Modificar el polipéptido original agregándole un dominio de termoestabilización, con la finalidad de utilizarla a altas temperaturas (60°C)
- Desarrollar un sistema de expresión heterólogo que le permita producir la proteína en cantidades importantes y evaluar la factibilidad de su utilización biotecnológica para la degradación de lignocelulosa.

En función de esta información, Ud. debe:

a) Indicar como haría para:

1. Construir un gen mutante, derivado del Xyn11A, cuyo producto proteico mantenga las funciones del original y posea agregado en el N terminal del polipéptido funcional una secuencia de termoestabilización. Esta secuencia es de 50 aminoácidos de longitud y sus extremos son

N-terminal GKLLWWNKR... (nucleotídica GGTAAGTTACTCTGGTGGAAACAAAAGA...)

C-terminal ...VVTLMNKKM (nucleotídica ...GTTGTCACCCTAATGAACAAGAAGATG)

Las secuencias del gen que codifica para la proteína son:

N-terminal MATHMHRLE...(nucleotídica ATGACCCACATGCATCGGCTTGAGTTC)

C-terminal ... YFKTIDLLF (nucleotídica ...TATTTTAAAACCATTGATTTGCTGTTT)

Indicar la secuencia de todos los *primers* a utilizar.

2. Asumiendo que el punto anterior ya lo cumplió, diseñar ensayos *in vivo* e *in vitro* que le permitan comprobar la funcionalidad de la proteína recombinante.
3. Producir la proteína recombinante en cantidades importantes en el sistema de *E. coli* fusionando a algún péptido que permita su purificación. Elegir un vector de expresión e indicar la secuencia de los *primers* a utilizar.

b) Al realizar el análisis inicial de las secuencias aminoacídicas, se observa que existen varios triptofanos (W). Dado que su jefe quiere utilizar los espectros de fluorescencia (basados en la presencia de W) como indicadores de conformación, Ud. debe tomarse el trabajo de realizar mutagénesis dirigida en cada una de las posiciones donde hay un triptofano, cambiándolo por fenilalanina (F).

1. Diseñar un esquema de mutagénesis mediada por PCR que le permita realizar estos cambios.
2. Indicar que tipo de controles realizaría para comprobar que el cambio introducido no afecta a la función de XYN11A.

Problema 5. El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), es causado por una cepa de *E. coli* denominada O:157, la cual es transmitida generalmente mediante ingesta de alimento contaminado.

La enfermedad (SUH) está asociada a una toxina liberada por *E. coli* denominada *Shiga toxin*.

Una vez que la bacteria fue introducida al organismo, esta coloniza el intestino, y exporta la toxina al medio. Esta proteína formada por dos subunidades (A y B), una vez liberada interacciona con receptores de las células endoteliales del riñón. Dentro de la célula la subunidad A es clivada en A1 y A2 y el fragmento A1 interacciona con el ribosoma 28 S inhibiendo la síntesis proteica.

Su grupo de trabajo está encargado de estudiar y caracterizar la toxina Shiga con el fin de desarrollar una vacuna a subunidad. Para ello usted cuenta con el gen dicha proteína aislado, clonado y secuenciado.

Por otro lado necesita obtener la proteína en gran cantidad y de forma muy pura para empezar a hacer los ensayos correspondientes en ratones.

Alineamiento de la secuencia de la subunidad A de la toxina Shiga

```

                Señal de exportación
O:157      ATGCGGATCCTCTAGAACGGCCGCTTTTTTCTTTTTTTTTTCGTTGCAAGTTGGCAGCCA
VarB      ATGCGGATCCTCTAGAGCGGCCGCTTTAATCTNNTCTTTTTTCGTTGCAAGTTGGCAGCCA
Var atenuada ATGCGGATCCTCTAGAGCGGCCGCTTTTGTTTTTTTTTTTTTTCGTTGCAAGTTGGCAGCCA
VarD      ATGCGGATCCTCTAGAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGTTGCAAGTTGGCAGCCA
                ***** * ** *****
                fragmento A1 ←
O:157      CCGCGCAACG--CACCGACAATCATGTCTAGATTGACAATTACCGACGGTCTTATGGGA
                thr leu
VarB      -CGCGCAACGT-CACCGACAATCATGAACGTTTTGACAATTACCGACGGTCTTATGGGA
Var atenuada -CGCGCAACGA-CACCGACAATCATGAGATCTTTGACAATTACCGACGGTCTTATGGGA
varD      -CGCGCAACG-TCACCGACAATCATGAAACGATTGACAAGTTAACACGGTCTTATGGGA
                ***** * *****
                fragmento A2
O:157      CACCGTCTACGCCAAGTCACGCGCTGTTC//CGCGATCTGCAGAATTCCAGCACACTGTAA
varB      CACCGTCTACGCCAAGTCACGCGCTGTTC//CGCGATCTGCAGAATTCCAGCACACTGTAA
Var aten  CACCGTGTACGGCAAGTCACGCGCTGTTC//CGCGAT---C-----CATCACACTGTAA
VarD      CACCGTCTACGCCAAGTCACGCGCTGTTC//CGCGAT-----CCATCACACTGTAA
                ***** ** *****

Region remarcada, señal de exportación
En negrita está el inicio y final de traducción
    
```

A- Usted decide expresar el gen de la subunidad A en pET22 b.
 ¿Cómo clonaría el gen de manera de obtener la proteína de forma económica, sin demasiados agregados aminoacídicos, relativamente pura, y utilizando la menor cantidad de pasos posibles?.

B- Usted está interesado en determinar que secuencia se encuentra involucrada en la proteólisis de la subunidad A. Para ello decide mutar dos aminoácidos que sospecha que son responsables. Esquematice como haría para mutar los dos a Gly. Escriba la secuencia de cada uno.

C- Esquematice paso a paso como armaría por PCR un gen, de manera de: eliminar la señal de exportación y que quede fusionado entre el fragmento A1 y A2 el gen de la inteína Scel. Escriba todos los primers que usaría.

Secuencia que codifica para los extremos de la inteína Scel

AGC GGA GGA GGA GGA GGA GGA GGA ///GGA GGA GGA GGA GGA ATC GGT CCC AAC

D - Como usted puede cuantificar la actividad tóxica de esta proteína en cultivos de células Vero su jefe le propone mutar la subunidad A de manera de buscar versiones más atenuadas de la proteína y poder utilizarlas como antígeno vacunal. Diseñe un experimento que le permita obtener esto. Mencione los controles que utilizaría en el experimento.

E –Usted encuentra una versión atenuada de la proteína pero al formular la vacuna a subunidad, y hacer los ensayos en ratones estos no desarrollan suficiente inmunidad sobre *E. coli* O:157, así que decide hacer una vacuna atenuada utilizando la versión del gen que encontró. Para ello debería generar una cepa de *E. coli* O:157 (genotipo: exactamente igual a O:157 excepto gen A "atenuado") y utilizar toda la bacteria para la formulación de la vacuna.

F - Para que tanto trabajo realizado (lleva 7 años en este trabajo, 830000 dólares gastados, dos úlceras, y tres anteojos de graduación en aumento, sin hijos, sin casa propia y solo como un perro) genere algún beneficio económico se le ocurre diseñar un kit de diagnostico rápido para identificar inequívoca y rápidamente este patógeno en cualquier tipo de muestra identificar y sus variantes que no son patógenas. Diseñe la estrategia en la que basaría su kit, y los controles que llevaría el mismo.

Problema 6. En la empresa donde usted trabaja quieren expresar en grandes cantidades un péptido humano con actividad antimicrobiana con el objetivo de producir cremas de acción tópica para heridas en la piel. Además quieren producir nuevos pépticos que resulten novedosos y una de las ideas que surgió es agregarle al péptido luego del décimo aminoácido la secuencia que codifica para los aminoácidos GHK, ya que se conoce que es un tripéptido que ayuda a la cicatrización.

1. Diseñe y esquematice una estrategia que le permita: agregar la secuencia que codifica para GHK entre los AAs número 15 y 16 del péptido. Escriba la secuencia de los *primers* que diseñe.
2. Teniendo en cuenta que el péptido podría resultar toxico, diseñe y esquematice construcciones basadas en inteínas, para expresar y purificar el péptido. Explique brevemente cómo funciona el sistema. ¿Qué tipo de cepa utilizaría teniendo en cuenta que se trata de un péptido de origen humano?
3. ¿Cómo haría para generar versiones con actividad aumentada del péptido, teniendo en cuenta que no se conocen los aminoácidos involucrados en el mecanismo de acción? Esquematice

Secuencia del péptido

```
ATGCTGCTGGGTGATTTCTCCGGAAATCTAAAGAGAAGATTGGCAAAGAGTTTAAAAGAATTGTCCAG
  M  L  L  G  D  F  F  R  K  S  K  E  K  I  G  K  E  F  K  R  I  V  Q
AGAATCAAGGATTTTTGCGGAATCTTGTACCCAGGACAGAGTCC
  R  I  K  D  F  L  R  N  L  V  P  R  T  E  S
```

Problema 7. A partir de alineamientos de regiones parciales de genes de enterotoxinas de diferentes cepas *Vibrio cholerae*, usted debe diseñar un *kit* para determinar las distintas tipos de *V. Cholerae* y que además le permita identificar variantes nuevas. Esquematice cada componente del *kit*.

```
TipoA  CGGATCCTCTAGAACGGCCGCTTTTTNTTTTTTTTTTC-GTTGCAAGTTGGCAGCCA
TipoB  CGGATCCTCTAGAGCGGCCGCTTTTTNNTNTNTNTTTTTTC-GTTGCAAGTTGGCAGCCA
TipoC  CGGATCCTCTAGAGCGGCCGCTTTTTNTTTTTTTTTTTTTTC-GTTGCAAGTTGGCAGCCA
TipoD  CGGATCCTCTAGAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTC-GTTGCAAGTTGGCAGCCA
TipoE  CGGATCCTCTAGAGCGGCCGCTTTTTTGGTTTTTGTTCAGTTGCAAGTTGGCAGCCA
***** * ** **** *****
```

```
TipoA  CCGCGCAACG--CACCGACAATCATGTCTAGATTGACAATTACCGACGGTCTTATGTGAC
TipoB  -CGCGCAACGT-CACCGACAATCATGAACGTTTGTACAATTACCGACGGTCTTATGTGAC
TipoC  -CGCGCAACGATCACCGACAATCATGAGATCTTTGACAATTACCGACGGTCTTATGTGAC
TipoD  -CGCGCAACG-TCACCGACAATCATGAAACGATTGACAAGTTAACACGGTCTTATGTGAC
TipoE  -CGCGCAACGGTCACCGACAATCATGAAACGATTGACAAGGATCCACGGTCTTATGTGAC
***** ***** ***** *****
```

```
TipoA  ACCGTCTACGCCAAGTCACGCGCTGTTCAACGCGATCTGCAGAATTCCAGCACACTG
TipoB  ACCGTCTACGCCAAGTCACGCGCTGTTCAACGCGATCTGCAGAATTCCAGCACACTG
TipoC  ACCGNTACGNCAAGTCACGCGCTGTTCAACGCGAT---C-----CATCACACTG
TipoD  ACCGTCTACGCCAAGTCACGCGCTGTTCAACGCGAT-----CCATCACACTG
TipoE  ACCGTCTACGCCAAGTCACGCGCTGTTCAACGCGACCG--AAGTGCCTATTGATGTG
***** ***** ***** * **
```

Problema 8. El cólera es un enfermedad producida por una enterotoxina secretada por el *Vibrio cholerae*, una bacteria en forma de vara. Los síntomas de la enfermedad son abundante diarrea líquida, usualmente acompañada de vómitos, llevando a la deshidratación. Esto conlleva a una intensa sed, dificultad al tragar, dolores musculares, debilidad y en algunos casos a la muerte

Más del 90% de los casos son de severidad moderada o leve y son difíciles de detectar clínicamente de otros tipos de diarrea aguda.

La bacteria es esparcida por los alimentos o el agua contaminados. Los crustáceos marinos y el plancton son las reservas principales del *V. cholerae*.

Se sabe que esta enterotoxina interactúa con el sistema de transportadores de Na⁺/K⁺ de las células endoteliales del intestino, inhibiendo el cierre del canal. Esto genera el flujo continuo de sales y agua al lumen intestinal provocando deshidratación.

Se caracterizó una cepa nueva (NC) de bacteria que produce una sintomatología similar al *V. Cholerae*. Al caracterizarla descubre grandes similitudes con *V. Cholerae* confirmando que podría ser una especie relacionada. Entre otras cosas, encuentra que la toxina que produce NC, podría estar anclada en la membrana externa ó ser secretada (no está determinado) y está relacionada con una fuerte actividad proteolítica. Con el objetivo de aislar y caracterizar esta toxina diseña *primers* conservados sobre toxinas relacionadas pero no logra amplificar ningún fragmento a partir del genoma de NC.

- A. Diseñe una estrategia alternativa para aislar, secuenciar y caracterizar el gen de esta toxina, sin utilizar un sistema heterólogo como *E.coli* debido a que la vía de exportación no es compatible y teniendo en cuenta que no ha sido purificada.

La secuencia obtenida es la siguiente:

5´ GGAAAGCATCCTGCCGCGTTTTGTTAAAGACGTTACCAACAACGAAGAATACGCCGCTAACAGTCTACGA
 GACGCGACTCAGCTGATAATTAAGACA **atg**CGCGAACC GGTTCTCGTAAACTGTTTGAACATGTAAACA
 GTTTTCGCGAGTTTTTAAACACCATTAAGCGGTGGCAATGGCCCGTGTGCCGTGCACCAACGCGCACCGC
 GTCACGATAACGAAGACGTTGATGACGAAGCGCGGAAAAACAGAGCGTGAGCTACATTAATCACTCTTTGG
 TGTGGAAAAACAATGATTTTTGTGTGTTTGTCAAGCCTTTTTATTGAAAAAACTATAACGTAATCA
 AGAACTACTTAAACTTGATAGTTTTTTGAGCAGCGAAAACCCCTGAGCACACTAACAAAGTGTGTAGAAGCAG
 GAGACTATTGTTATTGGCCCAATTGGCCCGCTCGCAAGCCGTTTCATTTACGGGATGGCAGCTATTTTTGT
 TTCTCAAATTTACATCAGCGTAGAATCCACCATAACCATAATTCACAACAAGCATTGGGGTCTGTGGACT
 TGTTTGTGTTTAATCCCGAAACTTTTTTAAACATTGAAATGAGTTTGTGCACAAACGAAACGCCGCGGTCA
 AGCTGTTTGTCAACGGCAAATCCGTTTTTGACGACAAAAGCGAAAATGTTTTTGAATAAAAAATGGCCAACA
 ATGCCACGGCCACGTGCAAGTTGGCCGCAAATTTGGTAAACTGTCACAAGAACCTGTTTCACGTGATTCGCG
 ACAACATAAATCTTGAAGAATGCATCAGCAGCCCAAGT **tga**CAAGCACATTATCAACGTAAACCTAACTAA
 ACTGCGCGAGTTTTCAAACGAGACGCCGTCCTCGCCGTCACAACCGGAGAACGCGGATTC 3´

Péptido de exportación

Posible dominio transmembrana

Dominio A Citoplasmático

Dominio B Externo

B. Al expresar el orf completo en *E.coli*, encuentra que la proteína forma cuerpos de inclusión. Dado que tiene una región transmembrana, que podría estar afectando a la solubilidad de la proteína usted decide eliminarla junto con el péptido de fusión y fusionar el dominio A - B a una cola de tres histidinas (CAC) en el extremo Nt. Diseñe la estrategia y los *primers* que utilizaría.

C. Se sabe que las proteínas que poseen motivos transmembranas aumentan la solubilidad considerablemente si estos dominios están delecionados o interrumpidos en aproximadamente la mitad de aminoácidos que los conforman. Con el objetivo de obtener la proteína *wild type* sin agregado ni delecciones de aminoácidos, en forma pura y lo mas importante, soluble diseñe una estrategia. Esquematice las construcciones.

D. Como usted ya diseño un experimento para cuantificar la actividad proteolítica (no??) de esta proteína su jefe le propone mutar el gen de la toxina de manera de buscar versiones más atenuadas y poder utilizarlas para desarrollar una cepa inocua para la formulación de la vacuna. Diseñe una estrategia que le permita alcanzar este objetivo. Mencione los controles que llevaría. Tenga en cuenta que no puede usar un sistema heterólogo como *E. coli*, sino debe usar la cepa NC.

E. Usted debe diseñar un ensayo, con el objetivo de determinar su relación filogenética con otras cepas y bacterias del genero *Vibrio*. Por otro lado desea construir un *kit* de detección de las distintas variantes y que además le permita identificar variantes nuevas. Tenga en cuenta solo posee secuencia de algunas de las toxinas y que entre ellas no presentan regiones altamente conservadas.

Problema 9. La tuberculosis bovina que persiste en regiones lecheras del suroeste de Inglaterra es el reservorio natural de *Mycobacterium bovis*. Inicialmente el diagnóstico se llevaba a cabo a partir del aislamiento de los microorganismos utilizando tejidos de animales con sintomatología. Con el comienzo del uso de anticuerpos monoclonales la tarea se ha facilitado ya que existe un anticuerpo que reacciona con una proteína de masa molecular aproximada de 22 kDa presente en *M. Tuberculosis* y en *M. bovis* y una proteína de masa molecular aproximada de 24 kDa *M. Kansaii*, y no produce reacción cruzada con proteínas de otras micobacterias.

Con la finalidad de aumentar la sensibilidad y especificidad de la detección, en el laboratorio donde Ud. trabaja se decidió clonar y caracterizar a nivel molecular el gen que codifica para el antígeno detectado con el anticuerpo monoclonal. Además, como el cultivo de micobacterias es bastante complejo, su jefe desea que Ud. produzca esta proteína en un sistema heterólogo con la finalidad de desarrollar un test tipo ELISA para estudios epidemiológicos con gran número de muestras.

- Esquematice la estrategia experimental que Ud. utilizaría para alcanzar estos resultados.
- Explique sintéticamente las distintas etapas de su diseño experimental. En cada una, suponga los resultados que obtendría.

Por otra parte, durante los años de trabajo sobre el tema se generó en el laboratorio una colección de 10 (diez) aislamientos de *Mycobacterium bovis* que presentaban ligeras diferencias en su patogenicidad. En algunos casos, esas diferencias poseen cierta correlación con diferencias en algunos de los aspectos de la

caracterización microbiológica y en otros casos no. Con el objetivo de disponer de un método rápido y seguro de tipificación de las variantes, su jefe decide desarrollar un test basado en PCR. Para ello, usted debe pensar en, al menos, dos etapas: en una etapa inicial el material de partida son cultivos de laboratorio y en una segunda etapa el material de partida son muestras de animales (enfermos o no).

- c) Explique sintéticamente las distintas etapas de su diseño experimental. En cada una, suponga los resultados que obtendría.

Problema 10. Usted logra aislar una nueva bacteria la cual crece óptimamente a 16°C. Sin embargo en los ensayos que le realiza comprueba que a 5°C esta bacteria tiene una fase lag mas larga, sin embargo luego de un tiempo crece de la misma forma que a 16 °C (la curva de crecimiento exponencial tiene parámetros similares que a 16°C).

Usted supone que en la fase lag se están expresando proteínas necesarias para poder crecer a esa temperatura. Desconoce totalmente la secuencias genómica del microorganismo.

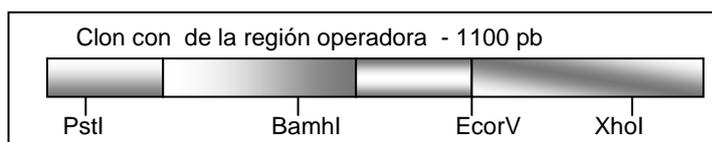
- 1- Diseñe y plantee paso a paso una estrategia que le permita identificar los genes involucrados en el crecimiento a 5°C
- 2- ¿Qué controles realizaría para validar sus experimentos?
- 2- Suponga que son dos los genes que identifica usted, ¿cómo determinaría fehacientemente que son los genes responsables de permitir el crecimiento a tan bajas temperaturas?

Problema 11. Su laboratorio se encuentra investigando un organismo termófilo del género *Pyrococcus* el cual fue aislado de fuentes termales en la provincia Santiago del Estero. Su temperatura óptima de crecimiento es entre 76-83 °C. Específicamente usted tiene como objetivo aislar y caracterizar el gen (R) que se encuentra involucrado en la represión de un sistema que es inducido cuando este organismo es sometido a temperaturas inferiores a 33 °C y se calcula que podría tener aprox. 1800 pb. Por información previa se sabe que este sistema solo se compone de una proteína represora que actúa sobre una secuencia operadora.

Este sistema se encuentra relacionado con la expresión de proteínas tipo chaperonas y con la secreción de distintos polisacáridos.

En la búsqueda de este gen usted identificó un clon con un fragmento de DNA que tiene alta homología con la región operadora donde este represor podría actuar. Sin embargo no cuenta con información acerca de la secuencia nucleotídica del represor, como así tampoco de la aminoacídica y los intentos por purificar la proteína y secuenciarla no dieron resultados

- 1- De acuerdo a los materiales que dispone proponga una estrategia para aislar el gen R Esquematice cada paso de su estrategia teniendo sus correspondientes controles.



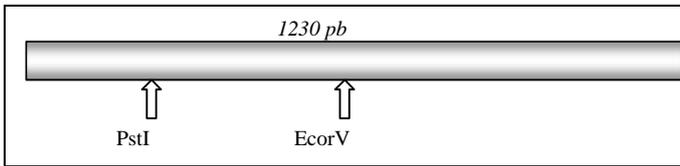
Problema 12. Usted desea obtener en cantidad, con un 95 % de pureza y sin ninguna modificación aminoacídica un factor de crecimiento humano, el cual tiene gran relevancia biotecnológica. Sabiendo que no tiene modificaciones postraduccionales, decide expresarlo en *E. coli*. Sin embargo, se encuentra con que esta proteína es altamente tóxica para dicha bacteria.

Por trabajos anteriores, usted sabe que el agregado de cualquier secuencia aminoacídica en el extremo N-t y en el C-t de su proteína anula el 100 % de su actividad dejando de ser tóxica para *E.coli*.

Debido al alto costo que implica la utilización de proteasas luego de expresar su proteína y la traducción *in vitro*, sus jefes le prohíben usar cualquiera de estas alternativas.

- 1) Proponga una alternativa que le permita expresar su proteína en *E. coli*, y que luego pueda purificarla con un alto grado de pureza, utilizando un método de afinidad sin agregar ni eliminar ningún aminoácido. Tenga en cuenta que no dispone de anticuerpos contra su proteína.
- 2) Esquematice el plásmido de expresión que diseñaría e indique todos los elementos nucleotídicos necesarios para que funcione en *E. coli*.

Si utiliza algún *primer*, indique si lleva sitios de restricción o cualquier detalle que sirva para lograr su objetivo.



Factor de crecimiento humano

Problema 13. Los moluscos acuáticos son organismos muy interesantes por su particular manera de alimentación. Constantemente se encuentran filtrando el agua donde se hallan, a partir de la cual obtienen los microorganismos que constituyen su principal fuente nutritiva. Pero también, en ese constante pasaje de agua ingresan contaminantes como metales pesados (Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺), los cuales son en general retenidos en diferentes tejidos del animal. De esta manera, estos organismos se constituyen como auténticos filtros biológicos.

Un grupo de investigación argentino estudió el molusco bivalvo *Limnoperna fortunei*, y encontró que el contacto de estos animales con Cd²⁺ inducía la expresión de un polipéptido de 23 kDa, posible quelante del metal. Posteriormente purificaron esta proteína, y mediante secuenciación por Edman de fragmentos de la misma, diseñaron *primers* que le posibilitaron amplificar mediante PCR el gen que codificaba dicho péptido (ver secuencia adjunta).

Actualmente, el grupo donde usted se ha incorporado, ha decidido comenzar a caracterizar en profundidad las particularidades de dicha proteína, con el fin de generar dos productos biotecnológicos:

- (1) Una columna cromatográfica de afinidad para el metal Cd²⁺, que sirva como filtro para aguas contaminadas
- (2) Una cepa de *Escherichia coli* que tenga insertado en su cromosoma el gen que codifica para dicha proteína, con el fin de utilizarlo para la biodepuración de residuos industriales.

Teniendo en cuenta los objetivos anteriores, desarrollar:

- a) Una estrategia que le permita producir la proteína en cuestión en cantidades importantes. Si utiliza estrategias basadas en PCR, indique la secuencia de los *primers*.
- b) Una estrategia que le permita mutagenizar el codón codificante para Leucina (marcado en la figura), por una Histidina.
- c) Los productos antes mencionados, y los ensayos que muestren su correcta función.

```

ATGTGGTTGGCTGCGCGAGATGATGCGTTCGACACCGTGTTCGAGAAACGTTTCATCACACACAACGACTTTGGTAATCTC
M W L A A R D D A F D T V F E K R F I T H N D F G N L

CAGCCCGTTTCAAACTTGTCTACGAGGCTGGTAAAGGTTACTCATACTCGCCGGTGCCTAGCAACACTCGACGTTTCGCTG
Q P G S Q L V Y E A G K G Y S Y S P V R S N T R R S L

CTCGATCAGATCAACGCTGCGCGTTTTAAACTGTTGCACGGCCGTGAACGACGCCAGCAAAAGATGCGAGCGTCATCACCA
L D Q I N A A R L K L L H G R E R R Q Q K M R A S S P

CCGCCCGCAACACACTAAACTCGTCCGAATTCAACTACAACGAGACGGATAGTTTGGAGGATATGATTGTGGACTTTCTC
P P P N T L N S S E F N Y N E T D S L E D M I V D F L

GAAGATCATTGTTGATTATAGGCATTTTGACCGATTGGGTCTGTAA
E D H S L I I G I L T D L G L
    
```

Nota: Esta secuencia no contiene sitios de reconocimiento a las enzimas: BamHI, XhoI, XbaI, EcoRI, entre otras.

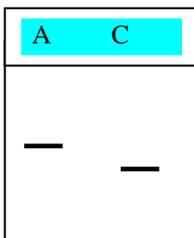
		Segunda posición										
		U		C		G		U				
Primer posición	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	Tercer posición		
		UUC		UCC			UAC		UGC			
		UUA	Leu	UCA			UAA	Stop	UGA		Stop	
		UUG		UCG			UAG	Stop	UGG		Trp	
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg			
		CUC				CAC		CGC				
		CUA				CCA		CAA		Gln	CGA	
		CUG				CCG		CAG			CGG	
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser			
		AUC				ACC		AAC			AGC	
		AUA				ACA		AAA		Lys	AGA	Arg
		AUG		Met		ACG		AAG			AGG	
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly			
		GUC				GCC		GAC			GGC	
		GUA				GCA		GAA		Glu	GGA	
		GUG				GCG		GAG				GGG

Región de clonado del plásmido Pet22-B

```

AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAAGCGGAATTGTGAGCGGATAACAATT
                Promotor T7                Operador lacI
CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATACCTGCTGCCG
                RBS                NdeI                PeI B
ACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCGGGCGATGGCCATGGATAT
                PeI B                NcoI
CGGAATTAATTTTGGATCCGGATATCCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCCCTCGAGCAC
                BamHI EcorV SacI SalI HindIII XhoI
CACCACCACCACCACAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCC
                Tag His STOP
A CCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTT
                Terminador T7
    
```

Problema 14. Usted trabaja como investigador en una empresa farmacéutica Argentina y se encuentra trabajando en un polipéptido con actividad anticancerígena, sin obtener hasta el momento muy buenos resultados. Por otro lado, recientemente una empresa extranjera lanzó al mercado una nueva droga para tratar algunos tipos de cáncer obteniendo excelentes resultados. Por contactos dentro de esta empresa se enteró que la droga está basada en el mismo polipéptido que usted estudia, de manera que decide comprar el producto para analizarlo y estudiar en qué se diferencia con su polipéptido. Para ello realiza los siguientes estudios:



SDS-PAGE – Western

Fig1: Western utilizando anticuerpos policlonales sobre el polipéptido puro.
 A: Su polipéptido. Clonado y expresado en pet22 sin tag ni pelB. Purificado por cromatografía de afinidad
 C: polipéptido comercial

Modificaciones post-traduccionales

Se evaluó mediante ensayos químicos y bioquímicos la existencia de glicosilaciones y otras modificaciones.

Glicosilaciones		Fosforilación		Otras	
A	C	A	C	A	C
-	-	-	-	-	-

Fig2:
 No se encontraron modificaciones ni en A ni C

Estabilidad del polipéptido en cultivo.

Sobre cultivo *in vitro* de células provenientes de carcinoma hepático, se agregó distintas diluciones de la droga y luego se tomaron las células (la misma cantidad de células) a distintos tiempos, se las lisó y se realizó un Western.

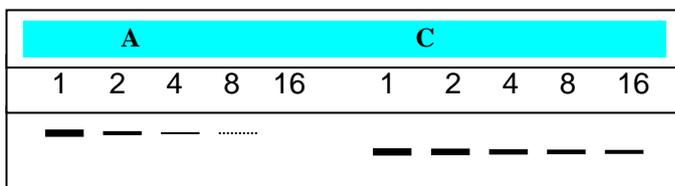


Fig3:
 Se muestra una de las diluciones ensayadas. Los números indican las horas a que se tomaron las muestras

Estabilidad del polipéptido en ratones.

Se inyectó la droga a ratones con cáncer hepático (sobre este tipo de cáncer se sabe que la droga actúa eficientemente), se sacrificaron y se extrajo el hígado a distintos tiempos (para cada tiempo se sacrificaron tres ratones). Luego se procesaron las muestras y se realizó un Western.

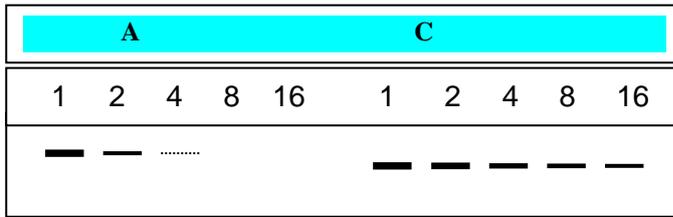


Fig4:
Los números indican las horas a que se tomaron las muestras

Secuenciación del polipéptido por Edman.

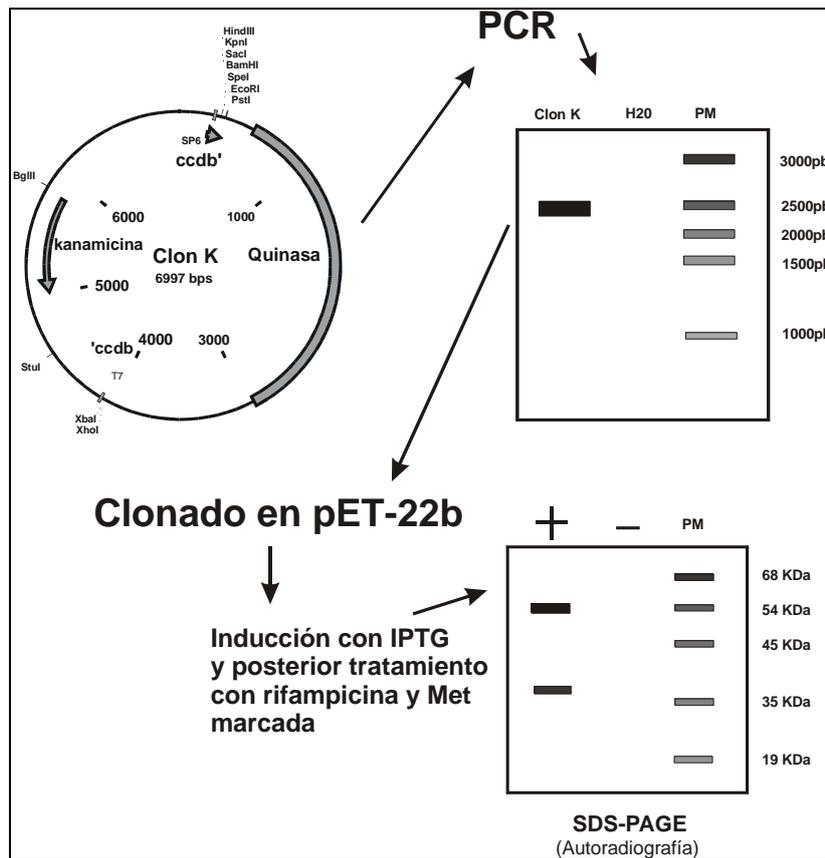
Composición			Proteólisis							
	A	C	A	C						
Cys	2	2	CysGlyIleProSer	GluLeuLeuLeuGlyGluGlyCysGlyIleProSer						
Gly	5	5	ArgLysGlyCysGlnGlySer	ArgLysGlyCysGlnGlySer						
Leu	3	3	GluLeuLeuLeuGlyGluGly							
Gln	1	1	<p>La enzima que utilizó para digerir el polipéptido cliva el enlace polipeptídico siguiente al residuo de Serina</p> <table border="1"> <tr> <td colspan="2">Nt</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>C</td> </tr> <tr> <td>Cys</td> <td>-</td> </tr> </table>		Nt		A	C	Cys	-
Nt										
A	C									
Cys	-									
Glu	2	2								
Arg	1	1								
Lys	1	1								
Pro	1	1								
Ile	1	1								
Ser	2	2								

- a) Escriba la secuencia de los polipéptidos.
- b) De acuerdo a los resultados obtenidos proponga una hipótesis acerca de porque su polipéptido no funciona eficientemente como droga anticancerígena y porque la comercial sí, descartando la posibilidad de que haya un problema de plegamiento ya que por dicroísmo circular corroboró que ambos son iguales.
- c) Teniendo en cuenta los sistemas de inteínas diseñe un plásmido que le sea útil para generar un polipéptido igual al comercial. Esquematícelo e indique claramente la orientación y extremos de la inteína.

Problema 15. Usted trabaja en un hospital de infectología en el área de patologías respiratorias. Durante el último año, su grupo de trabajo diagnosticó 500 casos de neumonías provocadas por infección con diversas cepas de *Streptococcus pneumoniae*, las cuales se caracterizan por tener un antígeno proteico común pero con regiones variables. Con el fin de acelerar los tiempos en el diagnóstico, su jefe le propone:

- a) Que plantee una técnica que les posibilite diagnosticar en forma sensible y específica infecciones provocadas por las diferentes cepas circulantes de *Streptococcus pneumoniae*, tomando como muestras de partida fluidos del tracto respiratorio.
- b) Que una vez encontradas diferentes cepas de *Streptococcus pneumoniae* mediante la metodología anterior, plantee una técnica que le permita hacer un estudio más completo sobre la filogenia de ese género de bacterias

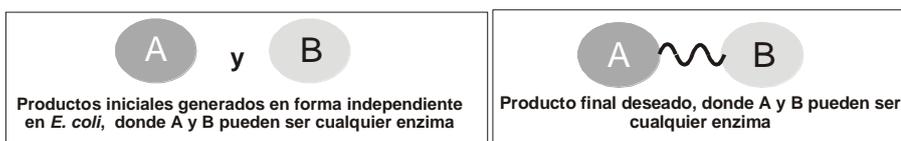
Problema 16. En el laboratorio donde usted se incorporó recientemente, uno de los becarios de investigación trabaja en la búsqueda de ciertos genes para caracterizar una ruta metabólica de una *Pseudomonas spp*, cuyo producto final es un compuesto alcohólico de importancia farmacológica. Para tal fin logró aislar una región genómica que posiblemente codifica para alguna de las enzimas implicadas en la ruta. Al secuenciar los extremos del fragmento, encontró el comienzo y el final de un ORF con homología a diferentes quinasas procariotas. Debido a que necesitaba resultados rápidamente, diseñó dos *primers* sobre esas secuencias (uno conteniendo el ATG y otro el codón de *stop*) y logró amplificar el ORF entero de la hipotética quinasa. Luego procedió a clonar ese fragmento en pET-22b para producir la proteína en forma recombinante, y así facilitar los ensayos sobre la misma. Pero cuando analizó sus resultados no pudo llegar a una explicación coherente, por lo que su jefe ofreció a usted que culmine estos experimentos.



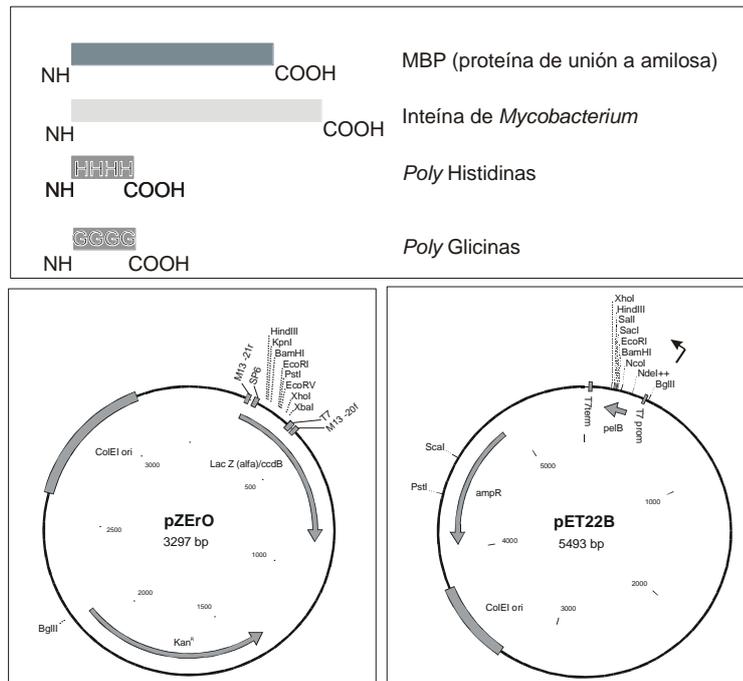
- a) Postule al menos dos hipótesis que expliquen la aparición de dos polipéptidos luego del ensayo de inducción, y no sólo uno como era lo esperado.
- b) Proponga un esquema experimental adecuado para verificar o refutar las hipótesis anteriores.
- c) Proponga un esquema experimental adecuado para demostrar que este gen está verdaderamente implicado en la ruta metabólica en estudio.

Problema 17. Las actividades enzimáticas de las proteínas son ampliamente diversas, lo cual las convierte en una materia prima importantísima para muchos sectores de la industria. Desde la elaboración de detergentes, alimentos, productos de detoxificación, catalizadores de reacciones hasta formulados farmacológicos, la producción de las mismas involucra una parte determinante dentro de la Biotecnología. Dado que es crucial disminuir los costos en las diversas etapas implicadas en la generación de los productos buscados, se torna elemental lograr expresar las proteínas de interés en sistemas heterólogos, como cualquiera que involucre a *Escherichia coli*.

A usted lo contratan de una industria dedicada a la producción de proteínas con la intención de mejorar algunos sistemas. Partiendo del conocimiento que los dominios globulares típicos de las enzimas, en general, suelen poder aislarse sin importar su fusión a otros polipéptidos, su jefe le propone que diseñe una estrategia que le permita generar proteínas mosaico (varios dominios independientes unidos covalentemente mediante *linkers*), pero donde la unión sea un evento posterior a la purificación de cada unidad proteica. Lo que su superior pretende es que usted diseñe los plásmidos necesarios (con todos sus elementos) para lograr, luego de expresar en *Escherichia coli* diferentes proteínas, unirlos de la manera deseada generando las combinaciones que usted quiera, y de manera de obtenerlas rápidamente purificadas.



Para tal fin, usted cuenta con los siguientes elementos génicos y sus secuencias.



a) Describir y esquematizar las construcciones plasmídicas a generar para cumplir tales objetivos. Indique la función de cada elemento génico incorporado.

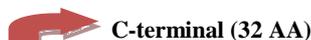
b) Indique los experimentos mínimos necesarios para probar la funcionalidad del sistema. Para tal fin Usted cuenta con los genes indicadores *lacZ* y *gfp*.

Problema 18. En su laboratorio se han hecho diversas construcciones que implican proteínas de fusión y han confirmado que los últimos 32 AA del interferón confiere estabilidad a pequeños péptidos difíciles de expresar. Es por eso que le encomiendan que haga lo mismo con la proteína LL37, un péptido de 37 AA que tiene actividad Bacteriana y que no han podido expresar todavía. Usted debe diseñar una estrategia basada en rearmado por PCR para unir ambos fragmentos y además debe agregar entre el fragmento C-terminal del interferón y LL37, el sitio de reconocimiento para la proteasa Xa (IGER) y clonar toda la construcción en el vector de expresión pQE60. La construcción final sería la siguiente:

1. Diagrame la estrategia para lograr los objetivos y escriba todos los *primers* que necesita para desarrollarla.



ORF Interferón



ATGGGCGAACCGTT // CTCGTAAACTGTTTGAACATGTATACAGTTTTTCGCGAGTTTTTATACACCATTGTGGCAAGTGGCCCGTGCA
CCGGATCCCGTCATGATCTTCTAA
 Stop

p-LL37

TAAAACTTGATAGTTTTTTTC ATGGAGCGAAAACCTGAGCACACTAACAAGTGTGTAGAAGCAGGAGACTATTGTTATTGGCCCAATT
GGCCCGCGTCGCAAGCCGTTTCATTTACGGGATGGCAGCTATTTTGTTCCTCAAATTTACATCAGCGTAGAATCCACCATAACC TAA
 CT TGA AATTCAGATCTCATTGGGT Stop

pQE-60

Eco RI/RBS Nco I Bam HI Bgl II 6xHis Hind III t₀
 [] CCATGGGAGGATCCAGATCT [] TAAGCTTAATTAGCTGAG []