

Apellidos:

Nombre:

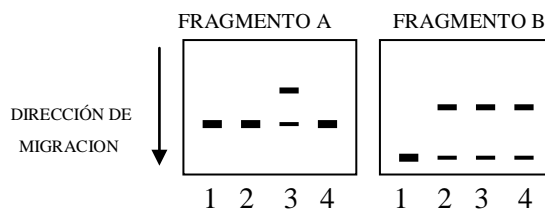
Grupo:

Problema 7

El *genX* se expresa específicamente en células de oviducto de gallina, aunque se puede detectar expresión basal en todos los tejidos. El análisis de una colección de deleciones en la región 5' del gen indica que la eliminación de la región A (centrada en la posición -120) conduce a una fuerte disminución de los productos obtenidos del *genX*, por RT-PCR (en extractos de oviducto), y a una falta de especificidad de la misma (se expresa en todos los tejidos).

A continuación obtenemos, mediante enzimas de restricción, cortos segmentos de DNA que incluyen la región previamente estudiada Fragmento A (de -150 a -104), y otra región que solo se ha examinado *in silico*, el fragmento B (-104 a -72). Los purificamos y los marcamos radioactivamente. Incubamos los fragmentos por separado y en condiciones apropiadas con extractos nucleares de distintos tejidos de gallina. A continuación se someten a electroforesis y, tras la autorradiografía, se obtienen los siguientes resultados:

1. DNA radioactivo incubado con tampón estéril
2. Idem incubado con extracto muscular
3. Idem incubado con extracto de oviducto
4. Idem incubado con extracto de hígado



¿Que tipo de técnica experimental es la descrita y esquematizada en la figura?

¿Qué reactivos y/o procesos implica?

¿Para qué se emplea?

¿Se podría haber utilizado otra técnica para aislar los fragmentos A y B? En caso afirmativo, menciónala(s).

Mirando solo la Figura ¿Qué se puede deducir de los resultados obtenidos con el fragmento A?

Idem sobre el fragmento B.

¿Qué nos sugieren los datos mencionados sobre la función de la región A?

¿Y sobre la función de la región B?

Menciona alguna otra técnica o experimento adicional que sirva para demostrar las funciones propuestas o añadir detalles moleculares, indicando que tipo de información obtendrías.

Apellidos:

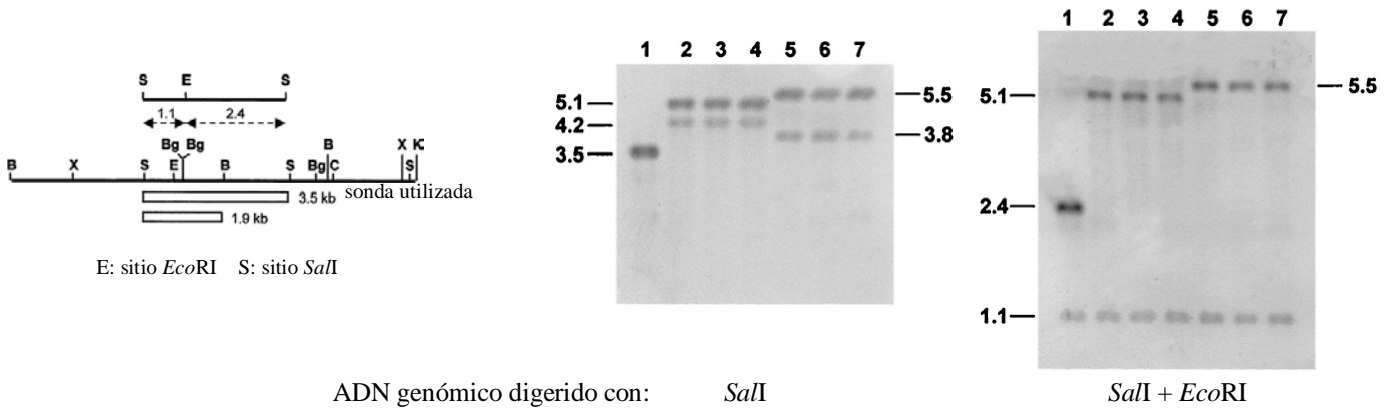
Nombre:

Grupo:

Problema 8

La acumulación de carotenos determina el color rojo de las colonias de *Myxococcus xanthus*. Los genes implicados en la síntesis de carotenos se expresan exclusivamente en presencia de luz. Tras mutagénesis por inserción del transposón Tn5 se obtiene un mutante de color rosa (debido a una menor acumulación de carotenos en la luz), que mapea en la región 5' del operón, fuera de las secuencias que codifican para los genes estructurales. El fenotipo mutante es inestable, ya que con cierta frecuencia aparecen colonias rojas (siempre se hicieron las observaciones de color en presencia de luz). Al cultivar 3 de estas colonias rojas y sembrar en cajas de Petri, de nuevo aparecen unas pocas colonias rosas. Para estudiar el fenómeno se hicieron transferencias Southern, utilizando como sonda un segmento genómico *SalI* de 3,5 kb correspondiente a la región 5' del operón, tal como se esquematiza en la figura.

1: Estirpe silvestre; 2, 3 y 4: colonias rosas; 5, 6 y 7: colonias rojas aisladas a partir de las colonias rosas.



¿Se puede deducir del resultado de los experimentos el tamaño que tiene el Tn5 y el lugar aproximado de inserción en la región 5' del operón? Si la respuesta es afirmativa, indica el sitio de inserción sobre la figura.

¿Podemos deducir con precisión si este Tn5 tiene sitios de corte para la enzima *SalI*? En caso afirmativo indica cuantos.

Haz mapas de restricción con *SalI* y *EcoRI* de la región de interés en los clones 2 y 5.

Según el análisis estructural, ¿en que se diferencian las colonias rojas y rosas derivadas del mutante rosa original?

¿A qué puede deberse la diferencia fenotípica entre colonias rojas y rosas que contienen Tn5?

¿Habríamos obtenido el mismo número y tamaño de bandas si se hubieran realizado las hibridaciones con la sonda de 1,9 kb que aparece esquematizada en la figura inicial? ¿por qué?

¿Cuál podría ser la causa de la inestabilidad del fenotipo mutante en los clones con inserciones de Tn5? Concreta todo lo que puedas.

Apellidos:

Nombre:

Grupo:

Problema 9

Se han construido 3 plásmidos diferentes con una fusión génica entre el inicio de un gen (promotor y primeros 10 codones incluidos) de expresión constitutiva y el gen *kan*, que codifica para la enzima kanamicina acetil transferasa, que confiere resistencia a kanamicina. En cada uno de estos plásmidos, en la secuencia codificante de *kan*, se ha introducido uno de los 3 codones de terminación de forma que la traducción termina ahora (muy prematuramente) en el aminoácido 19.

La estirpe silvestre de *E. coli* es muy sensible al antibiótico kanamicina, siendo la frecuencia de aparición de colonias $kan^R < 10^{-10}$ (en medios con 40 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina). Esta misma estirpe de *E. coli*, transformada con cualquiera de los 3 plásmidos anteriores es sensible (no aparecen colonias en medio sólido) a 40 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Sin embargo, a bajas concentraciones de kanamicina (1-2 $\mu\text{g/ml}$), las 3 estirpes con plásmidos son resistentes, mientras que la estirpe sin plásmido es sensible a estas mismas concentraciones.

Indica una posible causa (razonable) de que los plásmidos confieran resistencia a bajas concentraciones de kanamicina.

Con el fin de obtener mutantes que permitan estudiar interacciones moleculares implicadas en la terminación de la traducción, la estirpe silvestre de *E. coli* fue transformada, por separado, con cada uno de los 3 plásmidos anteriores. Las estirpes resultantes se cultivaron y se sembraron (unas 10^9 células de cada) en cajas de medio LB con 40 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. En los tres casos aparecieron unas cuantas colonias. ¿te sorprende este resultado?, ¿alguna explicación?

Con el fin de analizar los mutantes con cada uno de los tres plásmidos, en cada caso se elimina el plásmido utilizado para el aislamiento del mutante antes de volver a transformar por separado con cada uno de los tres plásmidos para comprobar si las estirpes resultantes son o no resistentes a altas concentraciones de kanamicina. Ello permitió clasificarlos en 4 grupos diferentes (mutantes 1-4).

Mutante	Codón de terminación empleado en el aislamiento del mutante	Codón de terminación de la fusión	Resistencia a kanamicina (40 $\mu\text{g/ml}$)
1	UAG	UAG	SI
1	UAG	UGA	SI
1	UAG	UAA	SI
2	UAG	UAG	SI
2	UAG	UGA	NO
2	UAG	UAA	SI
3	UGA	UAG	NO
3	UGA	UGA	SI
3	UGA	UAA	SI
4	UAA	UAG	NO
4	UAA	UGA	NO
4	UAA	UAA	SI

Indica telegráficamente y con la mayor precisión posible el producto génico o elemento regulador probablemente mutado y el tipo de mutación(es) compatible con los datos. En los casos en los que los datos no sugieran un único tipo de gen mutado, propón más de un candidato.

1:**2:****3:****4:**