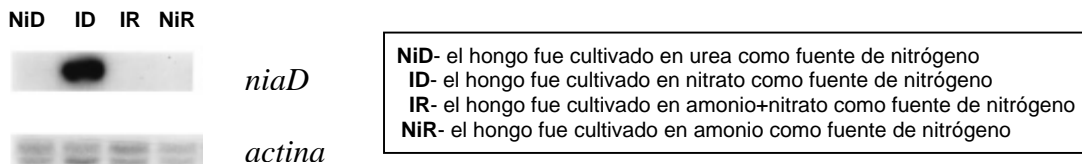


Autoevaluación Seminarios 2007- Biología Molecular

Pregunta 1

El hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* es capaz de utilizar el nitrato como fuente de nitrógeno. Se sospecha que los genes que codifican las enzimas responsables de la captación y degradación del nitrato (*niiA* y *niaD*) están sometidos a un mecanismo de regulación que depende de la fuente de nitrógeno presente en el medio.

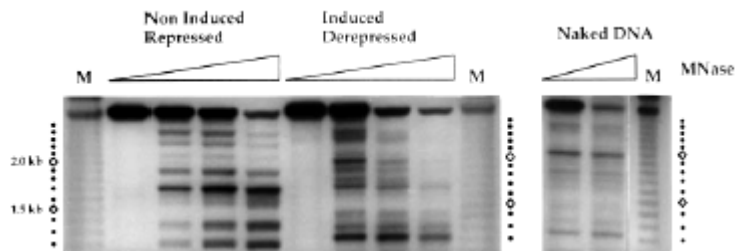
A) Se estudia la expresión de *niaD* en una cepa salvaje mediante el siguiente Northern blot. Se sabe que hay un factor NirA, de acción positiva, que activa la expresión del gen en presencia de nitrato. En base a estos resultados, proponga un modelo de regulación de la expresión de *niaD*.



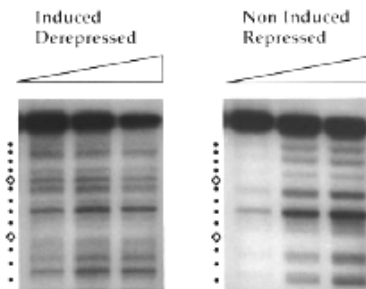
A)

B) Se estudiaron los cambios en la estructura de la cromatina asociados a la transcripción en el promotor de *niaD* y la participación de NirA en este fenómeno mediante un ensayo de digestión a la MNasa. Para eso, se estudió la estructura de la cromatina del promotor en una cepa salvaje (wt) y en un mutante de pérdida de función de NirA (*nirA637*), obteniéndose los siguientes resultados. Explique lo que ocurre a nivel de la cromatina.

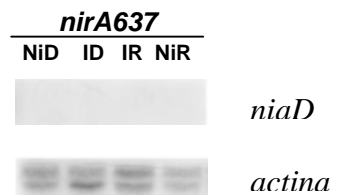
cepa salvaje



nirA637



Northern blot:



C) Muchos autores proponen que el rearrreglo de la cromatina asociado a la transcripción es una consecuencia trivial de la misma; otros que este rearrreglo debe ocurrir previamente para que se active la transcripción. Considerando los estudios arriba descritos con el mutante *nirA637*, ¿cuál de los postulados le parece correcto en este caso?

Pregunta 2

Los estudios de plasticidad sináptica han demostrado una relación clara entre la traducción del mRNA, el aprendizaje y la memoria. La proteína quinasa GCN2, es la kinasa de eIF2 más conservada y su mRNA es muy expresado en el cerebro. Los autores estudian su papel en el comportamiento y la plasticidad sináptica (Costa-Mattioli *et al.*, Nature 2005).

Para ello crean ratones transgénicos que tienen inactivados ambos alelos GCN2 (GCN2^{-/-}). Si bien estos ratones no muestran alteraciones en la transmisión sináptica basal, ellos presentan una mayor duración y amplitud inicial de la potenciación a largo plazo (LTP) que se refleja en una disminución de la memoria y el aprendizaje.

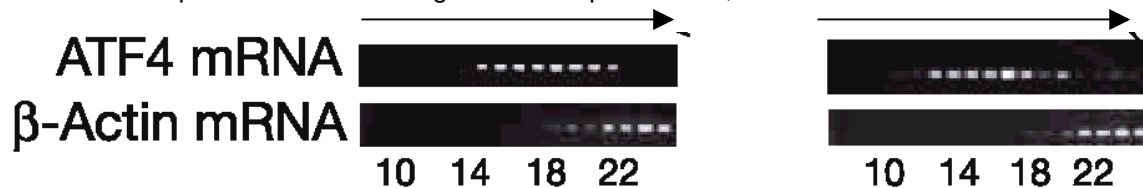
El factor ATF4 es un modulador transcripcional, que regula la plasticidad sináptica y el aprendizaje en varios phyla.

Explique los resultados que se muestran, establezca las conclusiones que se pueden extraer de éstos y discuta el posible mecanismo molecular por el cual GCN2 es capaz de generar el fenotipo de disminución de la memoria-aprendizaje.

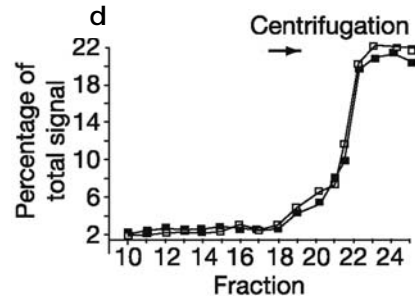
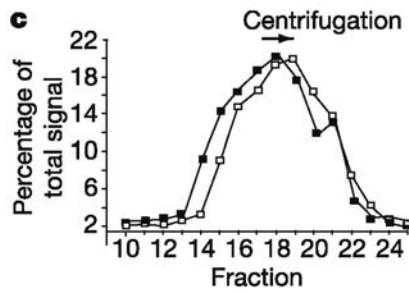
a. Western blots con extractos proteicos de cerebro usando anticuerpos anti la forma fosforilada y defosforilada de la proteína eIF2 α en a, y anti ATF4 y anti β -actina en e. Debajo se cuantifican los resultados de tres experimentos independientes. WT: ratones salvajes. GCN2^{-/-}: ratones mutantes para GCN2.



b. Gel de agarosa mostrando RT-PCR del mRNA de ATF4 en fracciones de un gradiente polisomal o polirribosomal (indicadas con números entre 10-24) de extractos de cerebro. La flecha indica el incremento de peso molecular en el gradiente. Izquierda: WT; Derecha: GCN2^{-/-}.



c y d. Cuantificación de la intensidad de las bandas mostradas en b. C: mRNA de ATF4 y D: mRNA de β -actina. Cuadros blancos: WT; Cuadros negros GCN2^{-/-}.



Pregunta 3

Suponga que forma parte de un grupo multidisciplinario que estudia al carpincho (*Hydrochaeris hydrochaeris*), el roedor sudamericano de mayor tamaño. Su genoma no se encuentra muy estudiado. La methyl-CpG binding protein 2 codificada por el gen MeCP2, es una proteína cromosómica que se une al ADN metilado. Le interesa estudiar si dicho gen que está presente en ratón y rata se encuentra en esta especie y como es su estructura. Ud. dispone de ADN de carpincho, de un fragmento de 1.3 kb correspondiente al gen MeCP2 de ratón y la secuencia completa en las bases de datos.

- 1- ¿Qué experimento realizaría para determinar que este fragmento se encuentra presente en el genoma del carpincho? Explique como lo haría.
- 2- Una vez confirmada su presencia, ¿de qué forma continuaría con el aislamiento y el estudio del gen?.