

Genética I

Guía de Problemas

Segundo Cuatrimestre de 2018

Segunda Parte



3) Las flores se construyen según líneas similares compuestas por 4 verticilos concéntricos (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) que comprende cada órgano floral. Los estudios en *Arabidopsis* demostraron que si bien las plantas no parecen tener proteínas con homeodominio, existen genes que cuando mutan provocan cambios homeóticos en la arquitectura floral. El estudio del patrón de expresión espacial de mutantes fenotípicos originó el modelo ABC que afirma que hay tres tipos de genes homeóticos. Los diferentes fenotipos para las mutaciones apetala-2 (en genes A), apetala-3 (en genes B) agamous (en genes C) y se presentan a continuación.

	Verticilo 1	Verticilo 2	Verticilo 3	Verticilo 4
Salvaje	sépalos	Pétalos	estambres	carpelos
Apetala 2 (A)	carpelos	Estambres	estambres	carpelos
Apetala 3 (B)	sépalo	Sépalo	carpelo	carpelo
Agamous (C)	sépalos	Pétalos	pétalos	sépalos

¿Cómo explicaría los fenotipos de los mutantes en relación al modelo ABC?

6. INGENIERÍA GENÉTICA

Bibliografía: **Recombinant DNA, Watson y col.**

Guía de estudio:

- 1) ¿Qué significa "clonar" un gen? Defina la expresión "ADN recombinante", "vector" e "inserto". Mencione un método que sirva para reconocer fácilmente colonias de bacterias que llevan plásmidos que contienen insertos.
- 2) ¿Qué tipos de vectores de clonado conoce que funcionen en células procariotas? ¿y en eucariotas?
- 3) ¿Qué es una genoteca (o *library* genómica) y cómo se construye? ¿Qué diferencia tiene con una clonoteca (habitualmente llamada *library*) de ADNc (*cDNA*)? ¿Cómo se realiza una búsqueda, prospección, relevamiento (habitualmente llamado *screening*)? ¿Cómo se puede marcar una sonda? ¿Cómo se procede para identificar bacterias que llevan una construcción de interés, luego de haber sido transformadas con una mezcla de ligación?
- 4) ¿Cuál es la diferencia entre una transformación y una transfección?
- 5) ¿En qué situaciones usaría Ud. las siguientes enzimas?:
Retrotranscriptasa; ligasa; Taq polimerasa; DNAasa I; RNasa H.
- 6) Se quiere clonar el gen de una proteína que se expresa en cerebro de ratón. Ud. no tiene, ni puede llegar a saber, la secuencia de aminoácidos de la proteína y depende exclusivamente de anticuerpos. ¿Qué tipo de genoteca usaría para comenzar?:
a) ¿una genómica hecha con ADN obtenido de cerebro de ratón?
b) ¿una genómica obtenida de hígado de ratón?
c) ¿una de ADNc hecha con ARNm de corazón en pBR322?
d) ¿una de ADNc hecha con de ARNm de cerebro en pBR322?
e) ¿una genómica de expresión hecha en el fago λ gt11 a partir de ADN de ganglios linfáticos de ratón?
f) ¿una genómica de expresión hecha a partir de ADN genómico obtenido de cerebro de ratón?
g) ¿una de ADNc de expresión hecha en fago λ gt11 a partir de ARN de cerebro de ratón?
- 7) ¿Qué es la mutagénesis dirigida *in vitro*? Mencione algún procedimiento para lograrla, uno usando células y el otro sin usarlas.
- 8) Dada una secuencia de interés: mediante qué estrategias se pueden generar mutaciones *in vitro*? Dé ejemplos de generación de mutantes *in vivo*.
- 9) ¿Cuál es la diferencia entre una transfección transitoria y una estable? ¿En qué casos se utiliza la primera?
- 10) ¿Cuáles son los métodos más comunes para transfectar células animales? ¿En qué casos o aplicaciones se utilizan la transfección de células animales cultivadas *in vitro* versus la de animales transgénicos?
- 11) ¿A qué se llama organismo "transgénico" u OGM u OVM? Dé ejemplos.
- 12) ¿Qué utilidad tiene el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*?

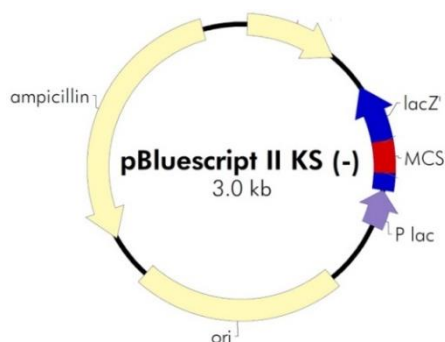
- 13) ¿Qué tipo de plantas se suelen transformar con el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* y cuales por métodos biolísticos y por qué?
- 14) ¿A qué se llama "vacuna recombinante"? ¿Hay alguna en el mercado?
- 15) ¿Qué significa "terapia génica"?
- 16) ¿Cuáles son los riesgos para el ambiente y para la salud humana que pueden traer estas tecnologías mencionadas en 13, 14 y 15?
- 17) ¿Qué pasó en Asilomar en la década del '70? ¿Qué conoce del tema de la bioseguridad del manejo de OGMs en Argentina y en el mundo?

Problemas:

1) Se desea clonar el gen que codifica una entomotoxina proteica con propiedades insecticidas que se encuentra en *Bacillus thuringiensis* (bacteria del suelo originalmente aislada de insectos muertos), pensando en producir soja transgénica resistente a lepidópteros. Para cumplir con la primera etapa del objetivo planeado se cortó el DNA total de *B.t.* con *MboI* en cantidad limitante (tubo 1). Por otra parte, el plásmido Bluescript (parecido al pUC19) fue incubado con *BamHI* (tubo 2). Después se mezclaron los contenidos de los tubos 1 y 2 en presencia de ligasa, incubándose durante la noche a 16 °C (tubo 3). Luego se transformaron células competentes (permeabilizadas con CaCl_2) de una cepa de *E. coli* que era *RecA*⁻, *Amp*^S, *lac*⁻ en presencia de ampicilina, IPTG y X-gal (X-gal es un sustrato cromogénico de la β -galactosidasa que da un producto azul). Como resultado se obtuvo una relación apropiada entre colonias blancas y azules, decidiendo así continuar con los experimentos pertinentes.

Diga si es verdadero o falso y fundamente el razonamiento:

- A) Los extremos generados por *BamHI* no pueden ligarse a extremos generados por *MboI*.
 B) Se utilizó *BamHI* porque la enzima universalmente reconoce los codones de iniciación de todos los genes permitiendo su correcta inserción en el vector utilizado con respecto a su posición respecto del promotor *lac*.
 C) La ampicilina sirvió para seleccionar bacterias transformadas.
 D) La ampicilina sirvió para seleccionar bacterias transformadas con algún plásmido recombinante (es decir plásmido con inserto).
 E) Las colonias que llevaban algún plásmido recombinante (es decir con inserto) son azules.

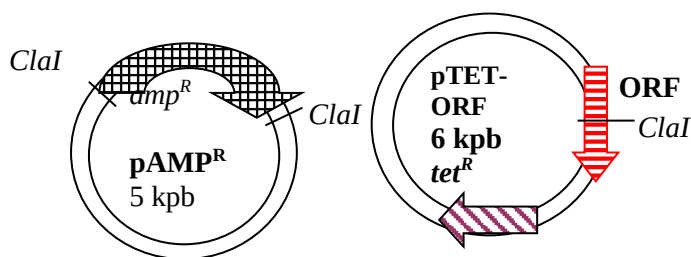


Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento
<i>BamHI</i>	G GATCC CCTAG G
<i>MboI</i>	GATC CTAG

Esquema del vector comercial pBluescript. Incluye una secuencia de sitios múltiples de clonado (MCS), la secuencia de la resistencia antibiótica a la ampicilina y el origen de replicación para *E. coli*. La secuencia del sitio múltiple de clonado se encuentra dentro del gen reportero *LacZ* diseñado para proporcionar una coloración azul cuando se expresa en bacterias. Esto se consigue normalmente a través del agregado de X-gal en medio de crecimiento utilizado para cultivar las bacterias. Si el gen es interrumpido por la inserción exitosa de una secuencia de ADN (gen de interés), las bacterias presentan una coloración blanca en vez de azul, distinguiendo recombinación exitosa.

2) Utilizando como sonda un cDNA de la subunidad mayor del receptor de GABA (un neurotransmisor) y empleando condiciones de baja rigurosidad, se aisló a partir de una genoteca de *E. coli* un fragmento de DNA conteniendo un marco de lectura abierto (llamado ORF más adelante) con cierta similitud de secuencia con la sonda usada. Con el objeto de identificar la función de este gen (la cual seguramente no es recibir neurotransmisores) se utilizó la siguiente estrategia: El plásmido pAMPR (ver Fig.) fue digerido con la enzima de restricción *ClaI* y el fragmento de 1,6 kpb conteniendo el gen *amp*^R que codifica para la β -lactamasa (enzima que hidroliza a la ampicilina y confiere resistencia a este antibiótico) fue purificado e introducido en el sitio *ClaI* de pTETORF (ver Figura). Este plásmido contiene el fragmento clonado (ORF) y un gen (*tet*^R) que confiere resistencia al antibiótico tetraciclina. La replicación de pTETORF es termosensible, funciona a 30°C y se inhibe a 42°C.

El plásmido recombinante pTETORFAMP se obtuvo por transformación en una cepa de *E. coli* *recA*⁻ (incapaz de hacer recombinación homóloga). Las bacterias transformadas con la ligación se crecieron a 30°C. Posteriormente, el plásmido fue purificado e introducido por transformación en una cepa de *E. coli* salvaje (*recA*⁺). Las bacterias fueron cultivadas a 42°C durante 15 horas en presencia de ampicilina y luego una alícuota fue sembrada en agar conteniendo medio rico y ampicilina. Se hizo un plaqueo en réplica hacia una placa conteniendo el mismo medio suplementado con tetraciclina. Las colonias resistentes a ampicilina y sensibles a tetraciclina fueron utilizadas en los ensayos siguientes.



Se hizo un plaqueo en réplica hacia una placa conteniendo el mismo medio suplementado con tetraciclina. Las colonias resistentes a ampicilina y sensibles a tetraciclina fueron utilizadas en los ensayos siguientes.

- A) ¿Cuál es el objetivo del protocolo? ¿Por qué fueron elegidas las bacterias *amp*^R *tet*^S? ¿Hubiera bastado con determinar la resistencia a ampicilina? ¿Por qué?
 B) ¿Qué hubiera pasado si las bacterias hubieran sido cultivadas a 30°C?
 C) ¿Qué ensayos haría para confirmar que las mutantes aisladas tienen el genotipo esperado?
 D) Una vez confirmada la mutación, obtenemos como primera conclusión que ésta no parece afectar la capacidad de la bacteria para crecer en medio rico. ¿De dónde saca esa conclusión?

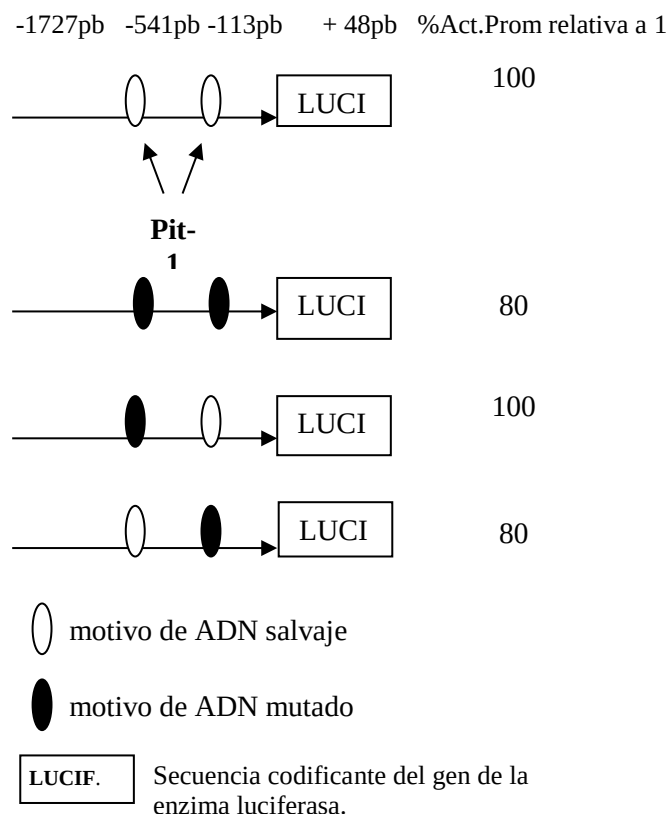
El experimento siguiente fue plaquear las bacterias mutantes en medio mínimo. No se encontraron diferencias respecto de las salvajes en número ni en morfología de colonias. Luego de tanto tiempo de trabajo infructuoso y, con tal de tener un resultado, los investigadores decidieron mapear por conjugación el locus ORF aprovechando las características de la mutación introducida.

E) ¿Qué característica de las mutantes facilita el mapeo del locus ORF? ¿Podría hacerlo si no la tuvieran?

Muchos años después, un joven e inquieto estudiante de biología, buscando tema para su tesis de Licenciatura, rescató de una congeladora esta vieja mutante y se propuso caracterizarla. Su razonamiento fue: si este gen no es esencial en condiciones de crecimiento normales, quizás sea necesario en condiciones de estrés (calor, frío, hiperosmotividad, hipoosmotividad). Haciendo curvas de crecimiento en medio líquido en estas condiciones, encontró que la cepa mutante mostraba una marcada deficiencia (comparando con la salvaje) para crecer a temperaturas mayores a 45°C. Al mostrarle este resultado a su ya decrépito director éste lo desanimó diciéndole que seguramente tanto tiempo en la heladera había introducido nuevas mutaciones en la cepa. Aunque extrañado el estudiante enseguida pensó y realizó un experimento que despejó toda duda sobre la causa genética de la deficiencia de la cepa congelada.

F) ¿Cuál fue el experimento realizado?

3) La hormona del crecimiento (HC) es una proteína que se sintetiza y se secreta en la glándula pituitaria. La expresión de este gen depende de un factor de transcripción específico llamado Pit-1, el cual reconoce la secuencia de ADN (T/A)NCTNCAT. Además de Pit-1, existen otros elementos regulatorios que juegan un papel importante en la expresión de este gen como CRE, GRE y TRE, cuyas secuencias de reconocimiento son conocidas. La zona promotora del gen HC de pollos (HCp), no ha sido tan bien estudiada como la de mamíferos. Se describieron sólo 500 pb de la región promotora del gen HCp, lo cual no permitía realizar un análisis profundo de la regulación de la transcripción en esta especie. Ip, S *et al.* (Exp.Biol.Med 229: 640-649, 2004) decidieron entonces estudiar más extensamente esta zona regulatoria, y lograron identificar un fragmento de 1,8 kbp de la región promotora de HCp.



A) Describa cómo le parece que hicieron los autores para clonar el gen completo de HCp (zona reguladora de 1,8 kpb + región codificante). ¿Qué sonda/s habrán utilizado?
 B) ¿Cómo se le ocurre que los autores determinaron los posibles sitios de unión de Pit-1 y de otros elementos regulatorios?

Los resultados revelaron dos sitios de reconocimiento de Pit-1 en el fragmento de 1,8 kpb.: uno proximal -113/-104 pb y el otro distal -541/-533 pb, y un posible motivo TRE (CAATGAGGTA) a -137/-128. Para caracterizar funcionalmente la zona 5' del gen HCp, se realizaron ensayos de transfección *in vitro* usando como gen reportero al gen de la luciferasa.

- C) ¿Qué consideraciones cree Ud. que se deberían tener para elegir un gen reportero?
 D) ¿Que construcciones genéticas los autores podrían haber utilizado para el ensayo de transfección?
 E) ¿Qué células pudieron haber utilizado para el ensayo de actividad promotora por transfección? ¿Qué control/es considera Ud. que los autores deberían haber realizado?

Con los ensayos de luciferasa concluyeron que la zona entre -187/+48 pb es la secuencia mínima para tener la mayor actividad promotora. Luego, para determinar si los sitios proximales y distales de unión de Pit-1 eran ambos funcionales, midieron actividad de luciferasa en el fragmento de 1,8 kpb al cual le habían introducido, previamente, mutaciones en la zona distal, proximal o ambas. Los resultados se muestran en la figura.

F) ¿Cómo interpreta Ud. estos resultados?

Finalmente compararon las zonas regulatorias del gen HC de pavo (HCv) con las de HCp. Encontraron que dichas zonas en ambas aves tienen un 90% de identidad de secuencia. Sin embargo, informaron que existe poca similitud entre estas zonas del gen HCp y las zonas regulatorias de HCM (mamíferos como rata y humanos).

G) ¿Qué le sugieren estos resultados?

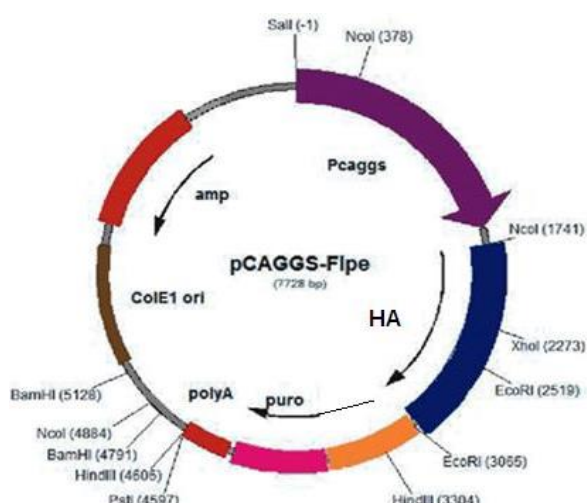
4) Zheng y col (BMC Infect. Dis. 9 2009 y anteriores) investigaron la factibilidad de una vacuna a DNA para inmunizar contra la gripe aviar (H5N1). En trabajos previos, clonaron los genes virales codificantes para hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y nucleoproteína (NP).

A) Este virus tiene un genoma a RNA completamente secuenciado ¿Cuáles fueron los 4 primeros pasos necesarios para clonar cada uno de estos 3 genes a partir del genoma purificado? Contestar brevemente sin justificar.

Una vez aislados los genes, los subclonaron en el vector plasmídico combinado (*shuttle vector*) pCAGGS-Fipe:

B) ¿Por qué y para qué se usa este vector combinado? ¿Es capaz de replicar tanto en bacterias como en células de vertebrados?

C) ¿Cuántos y cuáles productos de expresión esperaba encontrar a partir de este plásmido en *E. coli* y cuántos y cuáles en vertebrados?



Aclaraciones:

ColE1 ori: Origen de replicación de *Escherichia coli*

Amp: gen de resistencia a ampicilina (incluyendo su promotor y terminador de transcripción originales presentes en el Tn3 de *E. coli*)

Pcaggs: Promotor de actina de pollo y *enhancer* de hCMV (citomegalovirus humano)

HA: Secuencia codificante para la HA de influenza (en los otros 2 plásmidos HA fue reemplazada por NA o NP, respectivamente)

polyA: Terminador del gen de la hormona de crecimiento bovina

puro: gen de resistencia a puomicina (antibiótico eucariótico) separado del gen HA por un sitio IRES (internal ribosome entry site) que permite la unión del ribosoma (independiente de CAP) y una expresión bicistónica.

Después de hacer varias pruebas, electroporaron estos 3 plásmidos en ratones experimentales y, después de 7 días, desafiaron los ratones mediante infección pulmonar con virus H5N1. La tabla muestra los resultados.

Tabla: Grado de protección de ratones inmunizados con la vacuna a DNA contra el desafío virus influenza H5N1

Dosis de DNA (µg)	Ratones sobrevivientes			
	HA	NA	NP	control
10	6/12	3/12	0/12	0/12
50	10/12	5/12	0/12	0/12
100	12/12	12/12	0/12	0/12

D) ¿En qué habrá consistido el control que se muestra en la última fila?

E) ¿Fue exitosa la vacuna? ¿Cuál fue el mecanismo molecular de la respuesta? (es decir, ¿se generaron anticuerpos contra DNA o contra una proteína viral?)

F) ¿Fueron los 3 genes igualmente eficaces? Si no fue así ¿puede explicar por qué no?

G) Señale (sin justificar) una ventaja que tendría esta clase de vacuna contra la gripe en comparación con la convencional.

5) Un grupo de investigadores está interesado en obtener plantas de lima transgénicas resistentes al virus de la tristeza de los cítricos. Para ello idearon una estrategia que consiste en expresar una proteína específicamente en floema.

Comenzaron evaluando la actividad de tres promotores específicos de floema (tejido vascular) en cítricos. Los promotores que analizaron fueron los siguientes:

OSS: promotor de *Oryza sativa* (arroz)

AtSUC2: promotor de *Arabidopsis thaliana*

RTBV: promotor del rice tungro bacilliform virus (virus de arroz)

Para el estudio de estos promotores transformaron mediante *Agrobacterium tumefaciens* plantas de lima (*Citrus aurantifolia*)

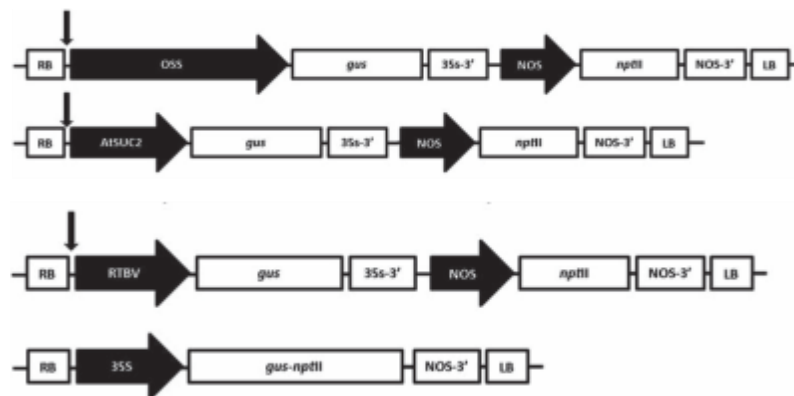


Figura 1. Representación esquemática de la región T-DNA de los vectores binarios utilizados para la transformación de lima. Cada construcción contiene el gen *gus* bajo el control de los promotores específicos de floema: SSO, AtSUC2 y RTBV y el terminador 35S-3'. Además contienen el gen *nptII* (gen que codifica para una enzima que da resistencia a Kanamicina, antibiótico que actúa sobre la unidad ribosomal 30S de procariotas) bajo el control del promotor NOS y el terminador NOS-3'. El vector control contiene una fusión del gen *gus-nptII* bajo el control del promotor 35S (promotor sin especificidad de tejido) y el terminador NOS-3'. RB: borde derecho y LB:

borde izquierdo del plásmido Ti. La flecha indica el sitio *EcoRI* de corte único en las construcciones.

A) ¿Por qué es posible utilizar el antibiótico Kanamicina para la selección de plantas transgénicas?

B) ¿Por qué los autores evaluaron los tres promotores específicos de floema en las plantas de lima (cítrico)? ¿Qué es el gen *gus* y por qué se colocó bajo el control de los promotores en estudio? ¿Para qué colocaron el gen *nptII* en la construcción?

Una vez seleccionadas las plantas transgénicas para cada construcción, las mismas fueron evaluadas por PCR para confirmar la presencia del transgen *gus* y *nptII*. Las plantas que resultaron positivas para ambos transgenes fueron también analizadas con una sonda contra el gen *gus* por Southern blot y se seleccionaron las plantas marcadas con asterisco (Figura 2)

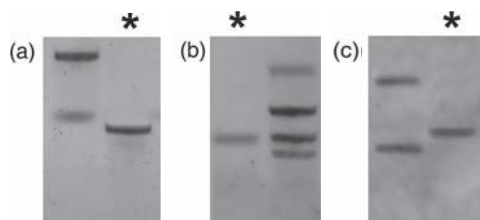


Figura 2. Southern blot de DNA total de dos plantas transgénicas de lima transformadas con cada uno de los tres promotores específicos de floema (construcciones Fig. 1), (a) OSS, (b) AtSUC2 y (c) RTBV. El asterisco (*) indica las plantas seleccionadas.

C) ¿Para qué se realizó este ensayo de Southern blot? ¿Con qué enzima se digirió el DNA para el análisis de las plantas? ¿Por qué utilizaron como sonda a *gus* y no utilizaron a *nptII*? ¿Por qué seleccionaron las plantas con asterisco?

Para cada promotor analizado se seleccionó la planta marcadas con asterisco y se continuó con el análisis de la expresión de *gus* (Figura 3).

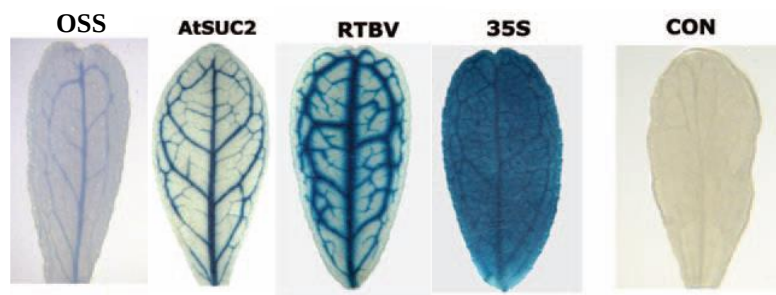


Figura 3. Expresión específica de *gus* en el floema de hojas provenientes de plantas transgénicas de 6 semanas edad. La actividad de la enzima *gus* fue revelada con el sustrato X-Glu, observándose la coloración azul. OSS: hoja de planta transgénica expresando *gus* bajo el control del promotor OSS. AtSUC2: hoja de planta transgénica expresando *gus* bajo el control del promotor AtSUC2. RTBV: hoja de planta transgénica expresando *gus* bajo el control del promotor RTBV. 35S: hoja de planta transgénica expresando *gus* bajo el control del promotor 35S. CON: hoja obtenida de una planta no transgénica.

D) ¿Qué puede decir de la actividad de los tres promotores en las plantas de lima? ¿Cuál de estos promotores elegiría para expresar alguna proteína de interés en el floema de plantas de lima? Para qué utilizan en el experimento de la figura 3 la construcción 35S-*gus* y la hoja CON? ¿Qué control/es faltarían en este experimento?

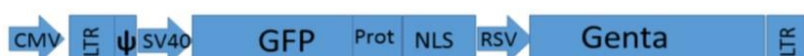
Una vez estudiados los promotores los autores decidieron expresar en el floema de plantas de lima la proteína de la cápside del virus de la tristeza de los cítricos con el objetivo de obtener plantas transgénicas de lima resistentes al virus.

Esquematice DETALLADAMENTE qué vector construiría para transformar plantas de lima (mediante *Agrobacterium*) con la proteína de la cápside (CP) del virus de la tristeza de los cítricos para que se exprese: a) exclusivamente en el floema y b) sin especificidad de tejido.

6) El virus de la hepatitis C infecta al 3% de la población mundial, puede provocar hepatitis crónica y es la causa principal del trasplante hepático. El diagnóstico del virus es muy complejo dado que no causa muerte celular en cultivo. Hace unos años, unos investigadores (Jones, 2009) desarrollaron un sistema de células reporteras de hepatitis aprovechando que el virus expresa en grandes cantidades una proteasa (NS3) que reconoce de manera muy específica una secuencia de aminoácidos.

Para construir las células reporteras utilizó un sistema lentiviral. El mismo consiste en transfectar células empaquetadoras que aportan en trans las funciones que se requieren para sintetizar virus recombinantes. En esas células se empaquetará el ARN que contenga la secuencia Psi (ψ) entre sus dos bordes LTR.

A continuación, se muestra parte del plásmido que utilizaron los autores del trabajo para transfectar las células empaquetadoras.



CMV, SV40 y RSV: Promotores constitutivos eucariotas

GFP: Proteína fluorescente verde

Prot: Secuencia reconocida por la proteasa de Hepatitis

NLS: señal de localización nuclear. Estando presente interactúa con importinas que dirigen la proteína al núcleo celular.

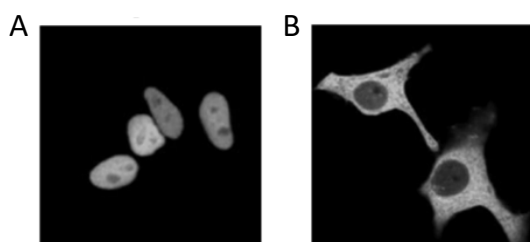
Genta: Gen de resistencia a Gentamicina, antibiótico eucariótico

A) Dibuje el plásmido completo y mencione cuáles genes se expresarán en bacterias y cuáles en células eucariotas. ¿Qué características debe tener un gen reportero?

Luego de obtener virus recombinantes del sobrenadante de las células empaquetadoras transfectadas con el plásmido se procedió a infectar células de hígado, principal blanco de la hepatitis. Como usted sabe, la infección con lentivirus provoca la inserción en el genoma de los fragmentos de ADN contenidos entre los bordes LTR.

B) Explique la función del gen de resistencia a Gentamicina. Las células transformadas, ¿expresarán GFP? ¿Dónde se observará predominantemente la fluorescencia?

C) A continuación se muestran fotos de las células hepáticas infectadas o no con el virus de la hepatitis, diga cuáles son las infectadas. ¿Cómo funciona el sistema reportero?

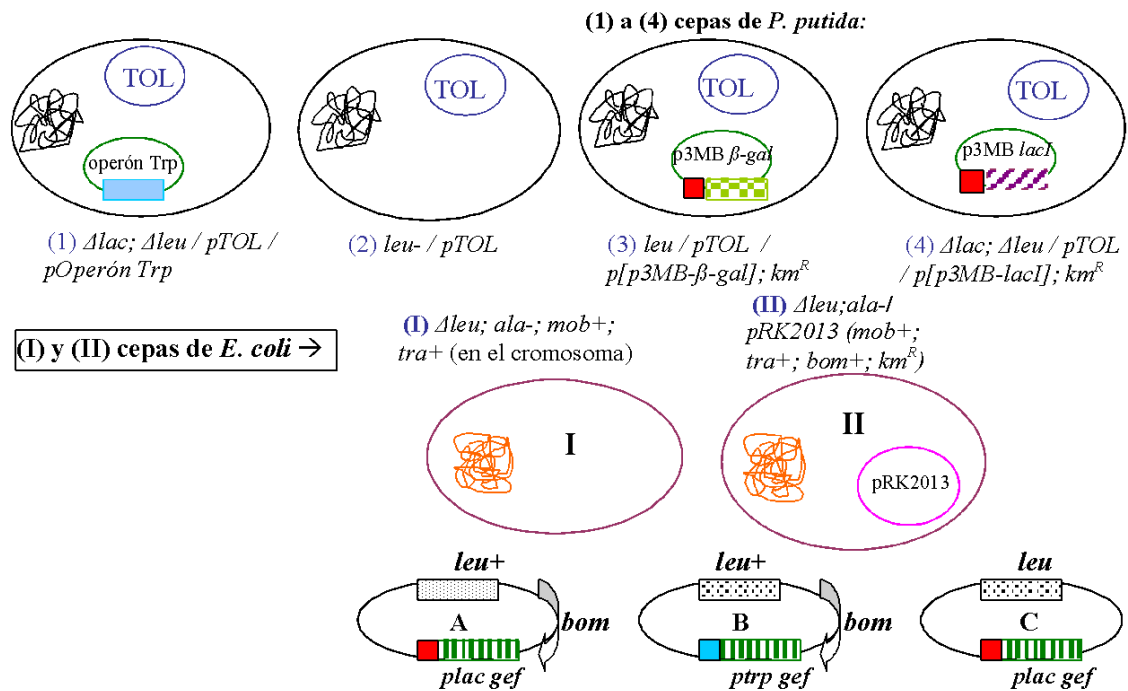


7) Uno de los objetivos de la microbiología es “construir” microorganismos recombinantes para que actúen como “remediadores” del medio ambiente dentro de un ecosistema contaminado, y que al terminar su función se autodestruyan.

Existe un compuesto tóxico, 3-metil-benzoato (3MB) que es catabolizado por la bacteria *Pseudomonas putida*. Los genes responsables del catabolismo del 3MB están organizados en un operón dentro de un plásmido denominado TOL. Los genes de este operón están regulados positivamente en presencia de 3MB.

Construya, mediante conjugación, una cepa de *Pseudomonas putida* capaz de destruir al 3MB presente en un lago contaminado, y que esta cepa se autodestruya luego de eliminar el contaminante. Se dispone de los siguientes elementos:





(A) a (C): Plásmidos que poseen origen de replicación de amplio rango de huésped (funciona en *Pseudomonas* y *Escherichia*), contienen un gen de resistencia a ampicilina y las siguientes características:

- $p3MB\beta\text{-}\beta\text{-gal}$: promotor del operón que cataboliza el 3MB fusionado al extremo 5' del gen de la enzima β -galactosidasa.
- $p3MB\beta\text{-}lacI$: promotor del operón que cataboliza 3MB fusionado al extremo 5' del gen de la del represor del operón lactosa.
- Δlac y Δleu : La Δ (delta) significa que lo que sigue está deletado (operón lac o leu , en este caso la *delección involucra también al gen del represor I*).
- tra : genes de transferencia del plásmido F
- mob : endonucleasa que corta en la región bom
- bom : origen de transferencia del plásmido F
- $ptrp$: promotor operón triptofano (otro distinto)
- $plac$: promotor del operón lactosa
- gef : es un "gen suicida", es decir que codifica para una proteína que produce la muerte de la bacteria cuando se expresa.

A) Diseñe una estrategia para construir (mediante conjugación) la cepa de *Pseudomonas putida* que sea capaz de metabolizar el contaminante 3MB y que luego se autodestruya, indicando cuáles cepas y plásmidos elige y cómo se selecciona la bacteria de interés.

B) Justifique las/los que descarta.

C) Esquematice mediante un gráfico la curva de crecimiento (número de bacterias en función del tiempo) y la **curva de concentración de 3MB (concentración de 3MB en función del tiempo)**. Considere $t=0$ al lago contaminado en el momento del agregado de las bacterias limpiadoras.

D) ¿Por qué se debe evitar el escape de la bacteria "limpiadora" al medio ambiente?