

TERCER EJERCICIO de las pruebas selectivas para el acceso a la Escala de Ayudantes de Investigación de los Organismos Públicos de Investigación, por el sistema de acceso libre, convocadas mediante Resolución de 14 de diciembre de 2020, de la Subsecretaría de Ciencia e Innovación (BOE 9 de enero de 2021)

Programa: “CENTROS DE REFERENCIA EN BIOMEDICINA Y SALUD HUMANA. ENFERMEDADES CRÓNICAS”

TRIBUNAL Nº: 8

Formato: Desarrollo por escrito de un SUPUESTO PRÁCTICO relacionado con las materias específicas del programa “Centros de referencia en biomedicina y salud humana. Enfermedades crónicas”

Advertencias:

1. Para el desarrollo de las mismas, usted dispone de un “cuadernillo” debiendo escribir por ambas caras de cada hoja.
2. Recuerde que el examen lo corregirá directamente el tribunal, en revisión ciega, por lo que es necesario escribir con letra clara y legible, en color azul o negro, indicando en cada hoja la concreta pregunta que se está contestando, de modo que no haya confusión en las respuestas. No escriba su nombre ni apellidos en el interior del cuadernillo, ni se identifique de ningún otro modo.
3. No existe límite de espacio por pregunta.
4. El tiempo de realización de este ejercicio es de **120 MINUTOS (2 horas)**.
5. Compruebe en el “cuadernillo” los datos relativos a sus apellidos, nombre y DNI; no olvide firmar en el recuadro habilitado.
6. No podrá ausentarse del aula durante los primeros 15 minutos de examen ni cuando falten 15 minutos para finalizar el mismo. En caso de ausentarse antes de la finalización del tiempo del examen no podrá llevarse las preguntas.
7. Está permitido el uso de calculadora. No está permitido el uso de dispositivos móviles ni relojes inteligentes u otros dispositivos similares durante la realización del ejercicio, los cuales serán retirados.

TEXTO SUPUESTO

En el “Hospital del Río” se ha detectado una enfermedad neurodegenerativa en un menor. Se sospecha la posible implicación de una mutación a nivel génico que pueda ser responsable de la aparición temprana de esta enfermedad.

En la búsqueda bibliográfica se localiza el gen X como posible responsable de este fenotipo. Dicho gen codifica para la proteína UFIEX de 336 aminoácidos y en la bibliografía se ha descrito que la sustitución de una Serina por una Cisteína en posición 112, altera la funcionalidad de la proteína. Aquellos individuos que tienen esta mutación son más propensos al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas a edades tempranas. Por lo que decidimos explorar el gen X con el material humano del que se dispone, que consiste en biopsias de piel del paciente y de un individuo sano control sin la enfermedad.

Conteste a las siguientes 10 preguntas. VALOR MAXIMO DE CADA PREGUNTA: 3 puntos. Si hay apartados en la pregunta se indica la puntuación máxima que se puede obtener en cada uno.

- 1.- Describe la obtención del cultivo de los fibroblastos humanos a partir del tejido.
- 2.- Sobre el ARN total:
 - 2a) Tu protocolo contempla el aislamiento de ARN total de los fibroblastos en cultivo, cómo aislarías este ARN total, ¿cómo consideras que es de buena calidad? (2 puntos).
 - 2b) Para tus ensayos posteriores necesitas una dilución de trabajo de 20 ng/ μ l. Tu ARN total stock está a 1 mg/ml, ¿cómo harías 100 μ l de la dilución de trabajo? (0,5 punto).
 - 2c) El volumen de reacción de tu ensayo es de 100 μ l y la cantidad de ARN total necesaria es de 20 ng. ¿Cuántos μ l de la dilución de trabajo (20 ng/ μ l) deberías de utilizar? (0,5 punto).
- 3.- El gen X es un factor de transcripción con dos genes dianas (CNY e IIEY) bien descritos en la bibliografía. Has realizado una RT-PCR cuantitativa y se han obtenido los valores de Ct para cada gen que se especifica en la tabla. Describe:
 - 3a) ¿Cuáles son los pasos a seguir para la realización de esta técnica a partir de ARN total de los fibroblastos? (1,5 puntos).
 - 3b) Los valores de CT que te han salido en la RT-PCR son los siguientes

	Individuo sano	Paciente con enfermedad
Endógeno/Housekeeping	21,20	22,02
CNY	33,20	21,03
IIEY	35,00	36,30

¿Qué significan estos valores y qué conclusión puedes obtener de la expresión de cada uno de estos genes en el paciente con la enfermedad y el individuo sano control? (1,5 puntos).

4.- En la realización de uno de los protocolos tienes que hacer Buffer Fosfato Salino (PBS) 1X. En internet has encontrado la receta abajo indicada para hacer 1 litro de PBS. En el protocolo normalizado y teniendo en cuenta los pesos moleculares, debes de especificar la concentración final en mM de cada componente en la solución de PBS.

Receta 1 L PBS:

1. Prepara 800 ml de agua destilada en una botella limpia y autoclavada.
2. Añade 8 g de NaCl a la solución.
3. Añade 200 mg de KCl a la solución.
4. Añade 1.44 g de Na₂HPO₄ a la solución.
5. Añade 245 mg de KH₂PO₄ a la solución.
6. Ajusta la solución al pH deseado (pH ≈ 7.4). Llevar a 1 litro con agua destilada.

Pesos moleculares de cada componente:

- NaCl: 58,4 g/mol
KCl: 74,5 g/mol
Na₂HPO₄: 142 g/mol
KH₂PO₄: 136 g/mol

5.- Para profundizar en la función del gen X, nos proponemos clonar la secuencia codificante del gen normal y del gen mutado a partir de las muestras de fibroblastos del individuo sano y del paciente (que portan la mutación).

- 5a) Describe los componentes básicos que tendría que tener el plásmido de clonaje para poder expresar dichos genes posteriormente en células eucariotas (1 punto).
- 5b) Si el plásmido contiene dos sitios de corte para las enzimas EcoR1 y Xba1, describe los pasos que seguirías para clonar dichos genes en el vector de expresión (1 punto).
- 5c) ¿Cómo verificarías el correcto clonaje de los genes? (1 punto).

6.- Necesitamos saber más sobre la función de la proteína UFIEX. Tenemos cultivos celulares tanto del paciente con la enfermedad (UFIEX mutado) como del individuo sano control (UFIEX wild-type). Sospechamos que la mutación Serina → Cisteína puede afectar a la fosforilación de la proteína y producir un cambio en la movilidad electroforética. Hemos comprado un anticuerpo que puede reconocer la proteína fosforilada y no fosforilada. Teniendo en cuenta el tamaño de la proteína y la importancia de la posible fosforilación, describe qué factores son relevantes para la realización del gel y el western-blot a partir de esos cultivos celulares. ¿Qué resultados esperarías en el western-blot si se confirma la hipótesis del cambio de fosforilación?

7.- Queremos hacer un análisis de la proteína por diferentes técnicas, pero antes nos han dicho que tenemos que digerir la proteína con distintas enzimas para tener péptidos. Es imprescindible que obtengamos menos de 10 péptidos. Disponemos en el laboratorio de dos enzimas proteolíticas que potencialmente podemos usar (tripsina y quimiotripsina). En la secuencia de aminoácidos sabemos que nuestra proteína tiene los siguientes aminoácidos:

aa	Nº	aa	Nº	aa	Nº	aa	Nº
Glicina	40	Serina	30	Acido Aspártico	10	Arginina	4
Alanina	40	Treonina	30	Asparagina	10	Histidina	4
Valina	35	Cisteína	15	Acido Glutámico	10	Fenilalanina	3
Leucina	35	Metionina	15	Glutamina	10	Tirosina	3
Isoleucina	30	Prolina	10	Lisina	4	Triptófano	3

¿Qué enzima o enzimas utilizarías para la proteólisis de la proteína? Razona la respuesta, incluyendo el número de péptidos que obtendrías.

8.- Tu gen está implicado claramente en la proliferación celular. Describe brevemente qué experimentos diseñarías para conocer si es un efecto positivo o negativo en la proliferación en los fibroblastos en cultivo.

9.- Sabiendo que la proteína UFIEX es un factor de transcripción, ¿qué experimentos de microscopia diseñarías para determinar el efecto de la mutación en la localización subcelular de la proteína?

10.- Unos colaboradores han generado un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa el gen X mutado en neuronas adultas y nos ha cedido el modelo para el estudio de su fenotipo.

10a) Describe los permisos que tú personalmente y tu laboratorio deberíais obtener para poder realizar un procedimiento con dichos animales (1 punto).

10b) Describe brevemente qué experimentos alternativos realizarías en tu laboratorio, sin usar animales, para estudiar el fenotipo neural del gen mutado (2 puntos).