

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 7 de noviembre de 2018, de la Subsecretaría de Ciencia, Innovación y Universidades (BOE 23 de noviembre de 2018)

Programa: «Centros de referencia en biomedicina y salud humana. Enfermedades Raras»

TRIBUNAL Nº: 10

Formato: SUPUESTO PRÁCTICO relacionado con las materias específicas del programa « Centros de referencia en biomedicina y salud humana. Enfermedades Raras ».

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 DEL SUPUESTO:

Uno de los laboratorios del Instituto de Investigación de Enfermedades Raras ha establecido un cultivo de fibroblastos a partir de una biopsia de piel de un paciente con una enfermedad rara. Estudios previos han demostrado la presencia de una mutación en los fibroblastos del paciente en el gen IIER (el nombre del gen es ficticio) que codifica para una proteína de 314 aminoácidos. La mutación identificada produce un cambio de aminoácido Serina por Prolina en la posición 78 (S78P). Dado que la función del gen es poco conocida se decide iniciar un proyecto de investigación para profundizar en las bases moleculares de la enfermedad. A continuación se describen varias situaciones prácticas que van surgiendo a medida que se avanza en la investigación.

Conteste a las siguientes 10 preguntas (VALOR MÁXIMO DE CADA PREGUNTA: 3 PUNTOS):

1. La presencia de micoplasmas en los cultivos de células humanas altera la fisiología normal de la célula, por lo que es fundamental confirmar la ausencia de tales microorganismos en los cultivos celulares.
 - a) Describa al menos un método que se podría utilizar para determinar si los fibroblastos del paciente presentan contaminación por micoplasmas.
 - b) En caso de detectarse ¿cómo podrían eliminarse?
2. Para confirmar la presencia de la mutación se extrae el ADN de los fibroblastos en cultivo mediante un kit comercial basado en columnas de sílice. El ADN purificado se ha eluido en un volumen total de 200 μL de agua desionizada (ADN stock). Para calcular la concentración del ADN stock se preparan 0,5 mL de una dilución 1/100 del ADN stock en agua desionizada y se mide la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los valores de A^{260} y A^{280} fueron los siguientes: $A^{260} = 0,361$ y $A^{280} = 0,190$.

Responda a las siguientes cuestiones:

- a) ¿Considera que es un ADN de buena calidad? Razone la respuesta.
 - b) ¿Cuál es la concentración del ADN stock en $\mu\text{g/mL}$?
 - c) ¿Cuál es la cantidad total de ADN obtenida?
 - d) Indique como prepararía 100 μL de una dilución de ADN con una concentración final de 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$
3. Para evaluar la integridad del ADN obtenido en el paso anterior es necesario realizar una electroforesis en gel de agarosa. Para ello debe preparar tampón TBE 10x (TBE 10x = Tris-base 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 20 mM) para la electroforesis. Dispone para ello de Tris-base (peso molecular = 121,14) y ácido bórico (peso molecular = 61,83) en polvo y de una solución de EDTA 0,5 M.
 - a) Describa como procedería para preparar 5 litros de tampón TBE 10x
 - b) ¿Qué porcentaje de agarosa cree que sería el más adecuado para analizar el ADN aislado de los fibroblastos del paciente? Razone la respuesta.

4. Para profundizar en la función del gen IIER, nos proponemos clonar la secuencia codificante del gen mutado y del gen normal en un plásmido cuyo polylinker reside en el gen LacZ para posteriormente subclonarla en un vector de expresión. Dispone de las enzimas de restricción EcoRI y BamHI para realizar el clonaje, cuyas dianas no están presentes en la secuencia codificante del gen IIER.
- Describa los pasos que llevaría a cabo para clonar la secuencia codificante del gen IIER mutado y del gen normal en el vector de expresión.
 - ¿Qué técnicas usaría para comprobar la identidad de los plásmidos?
5. Utilizando los vectores de expresión obtenidos en el paso anterior se han establecido dos líneas de células HEK293, una de las cuales expresa de forma estable la proteína IIER mutada (HEK292-IIER-mutado) y la otra la proteína normal (HEK293-IIER-control). En este punto estamos interesados en analizar cómo afecta la mutación a la distribución subcelular de la proteína. (NOTA: para facilitar la detección de las proteínas sobreexpresadas y diferenciarlas de la proteína endógena, durante el proceso de clonaje se ha añadido una secuencia de 14 aminoácidos (V5) a la proteína IIER, detectable con anticuerpos específicos (anti-V5))

Indique si las técnicas enumeradas a continuación son adecuadas para este propósito. Razone la respuesta

- Extracción de proteínas totales seguida de western-blot.
 - Centrifugación diferencial seguida de western-blot.
 - Inmunocitoquímica seguida de microscopia confocal.
6. Existen indicios que la mutación identificada en el gen IIER pueda afectar a la proliferación celular. Para demostrar el efecto de la mutación sobre la proliferación celular se siembran 100.000 células de las células HEK293-IIER-control y de las células HEK293-IIER-mutado en placas de cultivo y se mantienen durante exactamente 5 días en condiciones de cultivo óptimas (crecimiento exponencial). Al final del experimento las células se tripsinizan, se resuspenden en 10 mL de PBS y se cuentan el número de células en una cámara Neubauer, obteniéndose los siguientes resultados por cuadrante (1 cuadrante = 16 cuadrados):

	1 ^{er} cuadrante	2 ^o cuadrante	3 ^{er} cuadrante	4 ^o cuadrante
HEK293-IIER-control	15	18	16	15
HEK293-IIER-mutado	8	7	8	9

Responda a las siguientes preguntas.

- ¿Cuál es el número de duplicaciones que ha experimentado cada línea celular durante el periodo de cultivo?. Justifique la respuesta.
- ¿Cuál es el tiempo de duplicación de cada línea celular en horas?. Justifique la respuesta.

7. Otro de los métodos para estudiar la proliferación celular es el estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo usando el reactivo yoduro de propidio. Teniendo en cuenta el resultado obtenido en el experimento anterior, ¿Qué resultado esperarías encontrar si utilizara la mencionada técnica de citometría de flujo? Razone la respuesta.
8. Estudios llevados a cabo por otro grupo de investigación sugieren que la proteína IIER es un regulador transcripcional que regula la expresión del gen CNM, por lo que existe la posibilidad que la mutación identificada en el gen IIER afecte a la expresión del gen CNM. Para demostrarlo se decide realizar un experimento de RT-PCR cuantitativa con sondas “Taqman” específicas para el gen CNM y el gen control GAPDH obteniéndose los siguientes valores de Ct (*Cycle threshold*) (NOTA: Se asume que la eficiencia de la reacción en cada ciclo de PCR es del 100%).

	Ct gen CNM	Ct gen GAPDH
HEK293-IIER-control	21	25
HEK293-IIER-mutado	24	25

Responda a las siguientes cuestiones:

- a) Indique si la mutación en el gen IIER afecta positiva o negativamente a la expresión del gen CNM y si es posible cuantifique dicho efecto con los datos disponibles. Explique y justifique el método empleado en los cálculos.
- b) Las técnicas de PCR son muy sensibles a la contaminación con amplicones procedentes de reacciones previas. Indique que tipo de controles negativos incluiría en el experimento para detectar la posible presencia de contaminaciones.
9. La mutación en el gen IIER afecta a uno de los residuos fosforilables de la proteína. Indique que tampón de los descritos a continuación sería según usted el más adecuado para obtener extractos de proteínas totales que posteriormente utilizaría para detectar la presencia de la proteína fosforilada mediante la técnica de western-blot. Justifique la respuesta.
- a) Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, 1 mM EDTA, 1% Nodidet P40, PMSF 0.1 mM, aprotinina 1 mg/ml y leupeptina 5 mg/ml.
- b) Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, 1 mM EDTA, 1% Nodidet P40, PMSF 0.1 mM, ortovanadato de sodio 250 mM, fluoruro de sodio 1M.
- c) Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, 1 mM EDTA, 1% Nodidet P40 y PMSF 0.1 mM, fosfato de sodio 250 mM.
10. Tras una búsqueda activa de pacientes con fenotipo similar al paciente estudiado, se reciben en el laboratorio tres muestras de sangre periférica en tubos EDTA procedentes de un niño, de la madre y del padre biológicos dentro de un sobre de correo acolchado a temperatura ambiente. Las muestras de sangre periférica se utilizarán para extraer ADN. Indique si la forma de envío de las muestras al laboratorio es adecuada o si por el contrario, considera que deberían haber sido empaquetadas de otra manera. Razone la respuesta.