



## **Programa “Instrumentación en biofísica”. Cuarto ejercicio fase oposición TSE Acceso Libre (BOE 31.12.2020)**

### **Supuesto práctico I**

**Estudio de la interacción entre dos proteínas integrales de la membrana plasmática, A y B, en células vivas que expresan las proteínas marcadas A-EGFP y B-mCherry. Comparación entre las metodologías INT-FRET y FLIM-FRET.**

Indicar qué ventajas introduce la incorporación de los métodos de adquisición de imágenes de VIDAS MEDIAS de FLUORESCENCIA (FLIM), frente a los métodos de adquisición de imágenes de INTENSIDAD de FLUORESCENCIA en estado estacionario (INT), en un estudio de TRANSFERENCIA de ENERGÍA por RESONANCIA tipo FÖRSTER (FRET) realizado en un MICROSCOPIO CONFOCAL.

Incluir en la comparación los siguientes aspectos:

a) Descripción de las características del láser de excitación y del sistema de detección que requiere el estudio FLIM-FRET.

b) Diseño del estudio, realización e interpretación de los experimentos utilizando los métodos INT-FRET y FLIM-FRET

- Preparación y caracterización de las muestras
- Controles FRET
- Secuencia de medidas a realizar
- Cuantificación de la eficiencia del proceso de transferencia de energía por resonancia FRET
- Interpretación de los resultados en términos de eficiencia de la interacción (identificación de especies moleculares, fracción de moléculas que interaccionan, ... )



## Programa “Instrumentación en biofísica”. Cuarto ejercicio fase oposición TSE Acceso Libre (BOE 31.12.2020)

### Supuesto práctico II

Análisis funcional de la proteína **reticulón** (RTNL) en el retículo endoplasmático (RE). Comprobación experimental del potencial rol de RTNL como antagonista a la proteína **atlastina** (Atl) en el mantenimiento de la estructura reticular RE liso durante el ciclo celular.

En este supuesto se plantea la sobreexpresión heteróloga de RTNL en una línea celular con dos fines:

- Observar cómo afecta la sobreexpresión a la morfología del retículo endoplasmático liso.
- Observar y cuantificar los eventos de fusión (se conoce que la Atl provoca la fusión de los túbulos del RE) y el posible aumento de los eventos de fisión de los túbulos del RE.

Se cuenta con las siguientes herramientas experimentales

- Línea celular: COS-7
- Plásmido RFP-KDEL con secuencia codificante de la proteína fluorescente roja (*red fluorescent protein*,  $\lambda_{\max}$  excitación = 555 nm,  $\lambda_{\max}$  emisión = 584 nm) seguida de la secuencia KDEL, señal clásica de retención en el RE. La expresión del RFP-KDEL nos permitirá visualizar el ER.
- Plásmido RTNL-NLS-CFP que codifica para RTNL. Tras su expresión, RTNL se localiza en la membrana de los tubos del RE. Además, el plásmido codifica para la proteína fluorescente cian (*cyan fluorescent protein*,  $\lambda_{\max}$  excitación = 433 nm;  $\lambda_{\max}$  emisión = 475 nm) combinada con una señal de localización nuclear que se expresaría de forma independiente como marcadora el núcleo celular. Los núcleos azules nos indicarán que efectivamente RTNL se está expresando en la célula.

La expresión de las proteínas empieza a ser visible a las 12 horas tras la transfección. Las células control, transfectadas sólo con RFP-KDEL, sobreviven 48 horas.

Los eventos de fusión duran unos 100 ms y se pueden observar alrededor de tres eventos por minuto. El túbulo del RE se prolonga a lo largo de unas 2-3 micras y luego se fusiona a otro. Por otro lado los eventos de fisión son casi inexistentes.

**Describir el diseño experimental: protocolo de adquisición de imágenes y datos, para documentar la evolución morfológica del RE liso y cuantificar los eventos de fusión y fisión y sus características cinéticas.**