Esempio di Esame scritto

1

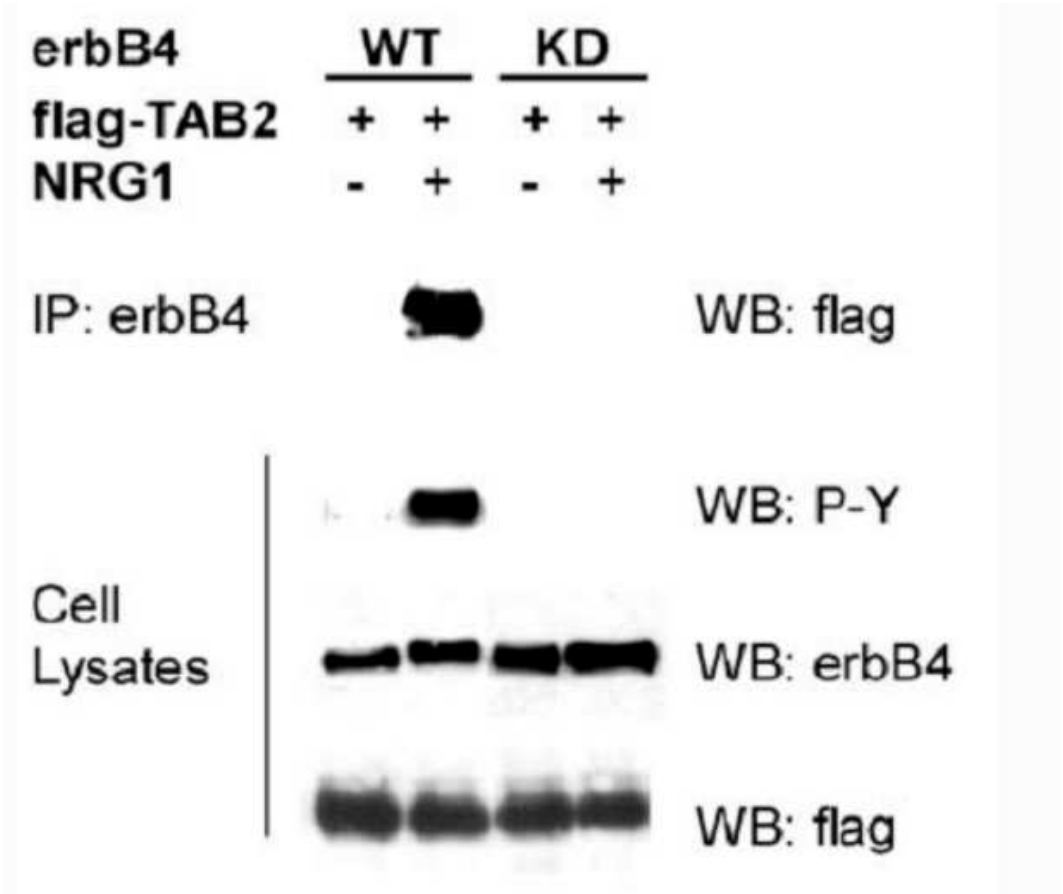
Punti: 4

1-Nell'esperimento illustrato nella figura, hanno trasfettato il costrutto che codifica il recettore ErbB4 intero o solo il dominio citoplamatico ?

2-Da cosa lo puoi dedurre?

3-Quale controllo importante manca all'IP?

4-Quali conclusioni si possono trarre osservando questa figura?



2

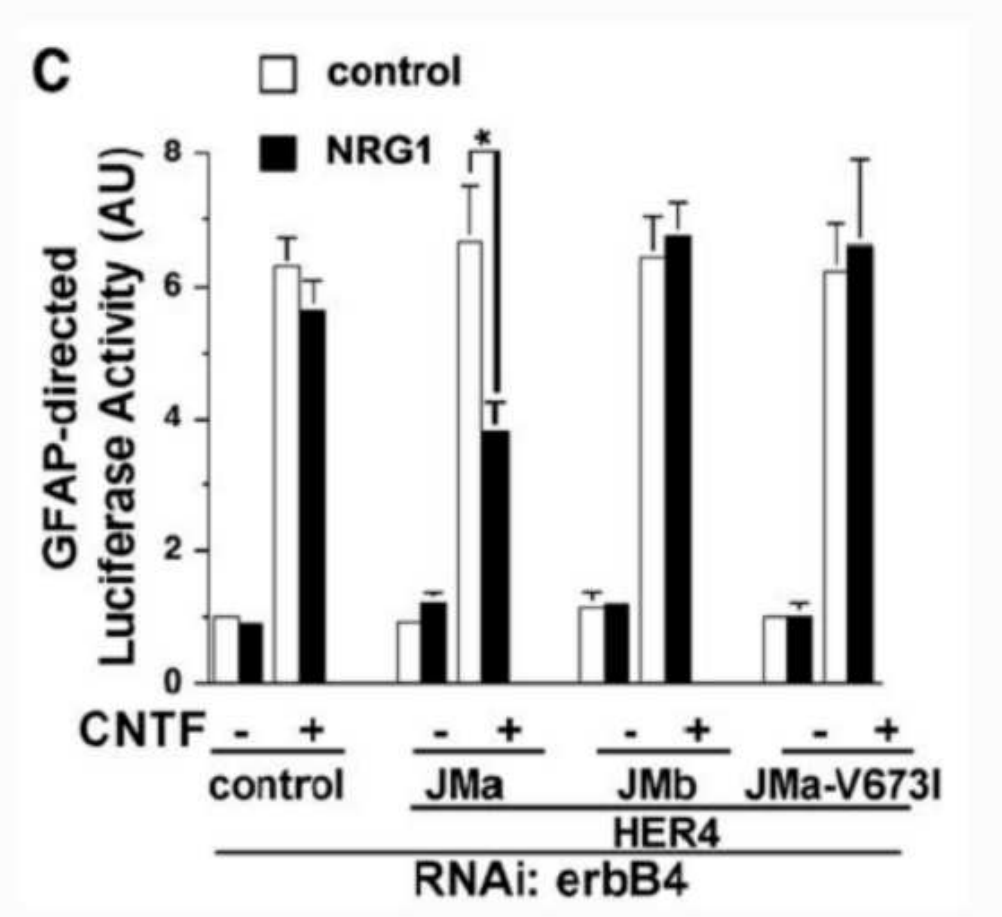
Punti: 3

Negli esperimenti in cui si utilizza l'*RNA interference*, per minimizzare il rischio di falsi positivi o falsi negativi, gli esperti consigliano di introdurre come controlli il *rescue* o la *siRNA redundancy*.

1 -cos'è la "siRNA redundancy"?

2 - cos'è il "rescue" ?

3 - Per quale motivo i costrutti ErbB4 JMa, JMb, JMaV673I - trasfettati esogenamente - sono resistenti all'azione dei siRNA anti ErbB4 ed il loro RNA non viene degradato?

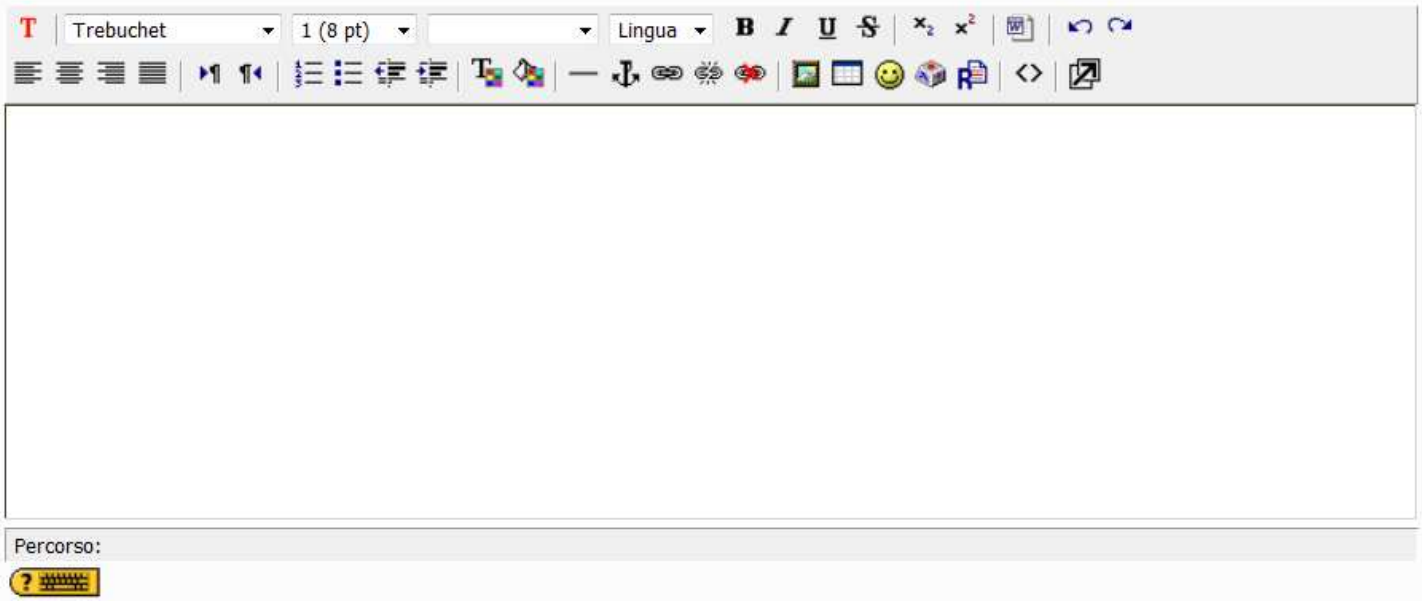


3

Punti: 1

Chi attiva la fosfolipasi C beta e chi la fosfolipasi C gamma?

Risposta:



5

Punti: 2

Avete estratto dell'RNA. Valutate la concentrazione dell'RNA leggendone un'aliquota allo spettrofotometro: mettete in una cuvetta di quarzo 2 µl di RNA diluiti in 1ml di H2O e misurate l'assorbanza allo spettrofotometro;

la lettura allo spettrofotometro è 0,05 OD

Sapendo che il fattore di conversione è 1OD=40µg RNA / ml

Nella provetta, quanti µg/µl di RNA avete? _____ .

Quanti µl devo prendere per avere 1 µg? _____ .

Usate il punto al posto della virgola per i decimali.

7

Punti: 1

Vuoi marcare radioattivamente il prodotto della PCR. Devi inserire nella mix un nucleotide radioattivo. Compri dell'ATP. Quale dei tre gruppi fosfato (alfa, beta o gamma) deve essere marcato radioattivamente?

figura 6

Scegliere una risposta.

- a. gamma
- b. alfa
- c. beta

9

Punti: 1

Volete amplificare TUTTA la regione di sequenza sottostante, dal primo all'ultimo nucleotide. Disegnate solo il primer **ANTISENSO**, lungo 12 basi.

5'-TGAAGCTGGCGCACGGGACTGTGGGTCTGGGGGAGCCTTCCCAGCGCTTCTCAGTCAGTGTGTGCCGGAACAGAGA-3'

Risposta:

3

Punti: 3

ingredienti	concentrazione stock	quantità(in ul)	concentrazione finale (o quantità finale)
DNA	0.2 ug/ul		1ug
NaCl	0.5 M		25 mM
Tris HCL1M	0.5 M		40 mM
buffer	10 x	10 ul	1x
H_20			q.b. a 100 ul
enzima PstI	1 u/ul	2 ul	1 u/ug DNA
totale		100 ul	

Se necessario, usate il punto al posto della virgola

5

Punti: 3

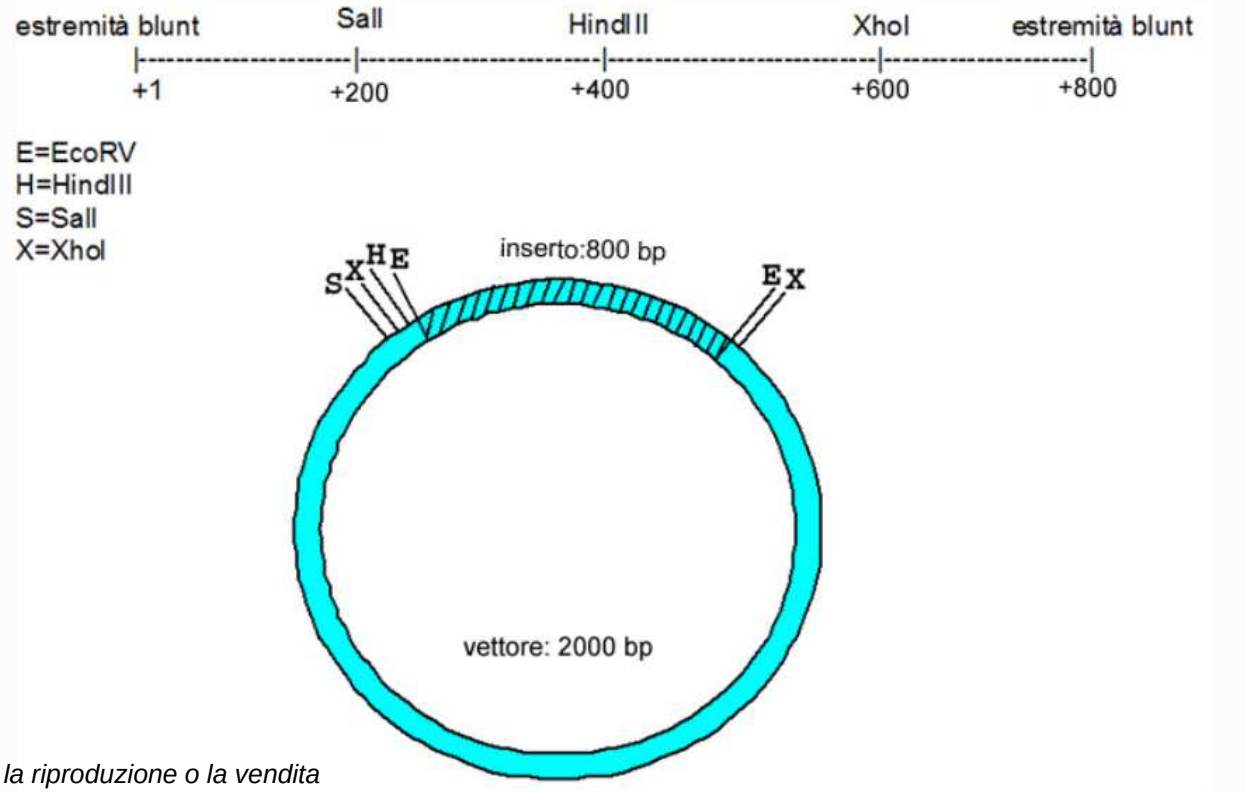
Avete clonato un inserto lungo 800 bp con estremità blunt dentro il sito EcoRV (blunt) di un vettore lungo 2000 bp.

1-per stabilire l'orientamento dell'inserto, con quale enzima digerite il DNA plasmidico che avete ottenuto?

2-se digerite con quell'enzima il vostro costrutto, quanto sono lunghe (in bp) le bande che ottenete se l'inserto è senso ?

3-se digerite con quell'enzima il vostro costrutto, quanto sono lunghe (in bp) le bande che ottenete se l'inserto è antisenso?

(non tenete conto dei nucleotidi che ci sono fra un sito di restrizione e l'altro nel multiple cloning site del plasmide: considerate i siti di restrizione per XhoI, SalI, HindIII ed EcoRV tutti vicini fra loro)



14

Punti: 5

Abstract: During the process of autophagy, cytoplasmic materials are sequestered by double-membrane structures, the autophagosomes, and then trans- ported to a lytic compartment to be degraded. One of the most fundamental questions about autophagy involves the origin of the autophagosomal membranes. In this study, we focus on the intracellular dynamics of Atg9, a multispanning membrane protein essential for autophagosome formation in yeast. We found that the vast majority of Atg9 existed on cytoplasmic mobile vesicles (designated Atg9 vesicles) that were derived from the Golgi apparatus in a process involving Atg23 and Atg27. We also found that only a few Atg9 vesicles were required for a single round of autophagosome formation. During starvation, several Atg9 vesicles assembled individually into the preautophagosomal structure, and eventually, they are incorporated into the autophagosomal outer membrane. Our findings provide conclusive linkage between the cytoplasmic Atg9 vesicles and autophagosomal membranes and offer new insight into the requirement for Atg9 vesicles at the early step of autophagosome formation.

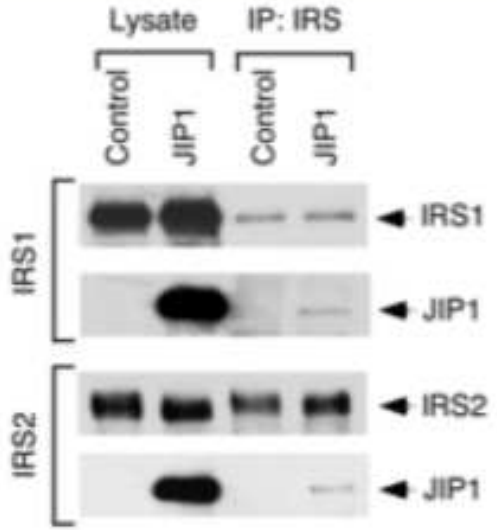
Scrivete (in italiano) un paragrafo introduttivo all'articolo corrispondente a questo abstract dando un inquadramento generale sul ruolo o i ruoli dell'autofagia, sulle sue caratteristiche morfologiche e molecolari e infine evidenziate gli elementi di novità introdotti da questo articolo (non una mera traduzione dell'abstract).

10

Punti: 5

Interaction of IRS and JIP proteins.

(A) Immunoprecipitates of endogenous IRS1 and IRS2 were prepared from Rin-5F cells (Control) and Rin-5F cells expressing EE-tagged JIP1. These immunoprecipitates were probed using the EE monoclonal antibody and antibodies to IRS1 and IRS2. Immunoblot analysis of cell lysates (100% of the amount used for the coimmunoprecipitation) is also shown.



Complete:

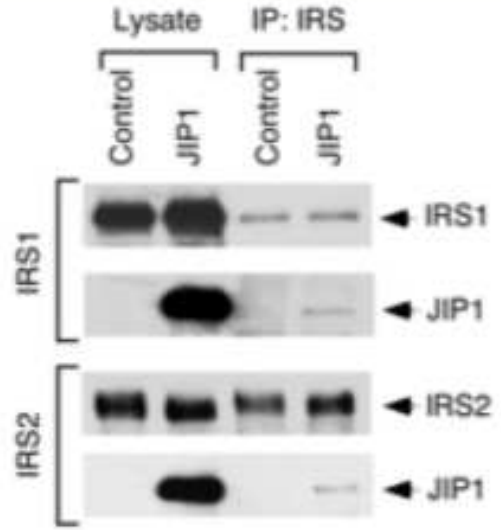
1. Rin-5F cells have been transfected with a molecular construct coding for [ ];
2. Cell lysate was immunoprecipitated with antibodies to [ ]
3. JIP1 coimmunoprecipitates with IRS1 as shows in the lane N. [ ] of the [ ]
4. JIP1 coimmunoprecipitates with IRS2 as shows in the lane N. [ ] of the [ ].

10

Punti: 5

Interaction of IRS and JIP proteins.

(A) Immunoprecipitates of endogenous IRS1 and IRS2 were prepared from Rin-5F cells (Control) and Rin-5F cells expressing EE-tagged JIP1. These immunoprecipitates were probed using the EE monoclonal antibody and antibodies to IRS1 and IRS2. Immunoblot analysis of cell lysates (100% of the amount used for the coimmunoprecipitation) is also shown.



Complete:

1. Rin-5F cells have been transfected with a molecular construct coding for [ ];
2. Cell lysate was immunoprecipitated with [ ] antibodies to [ ]
3. JIP1 coimmunoprecipitates with IRS1 as shows in the lane N. [ ] of the [ ]
4. JIP1 coimmunoprecipitates with IRS2 as shows in the lane N. [ ] of the [ ].

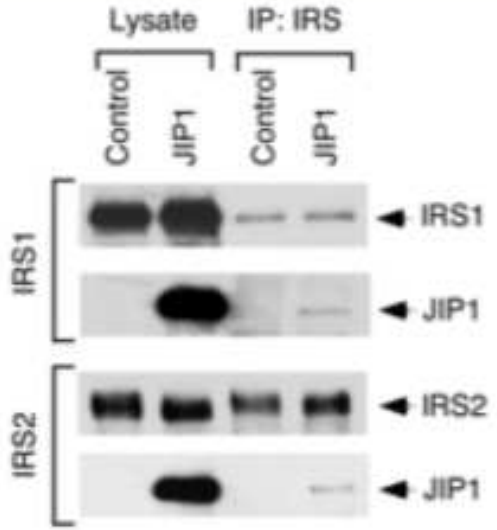
IRS1
IRS2
EE-tagged JIP1
IP-IRS

10

Punti: 5

Interaction of IRS and JIP proteins.

(A) Immunoprecipitates of endogenous IRS1 and IRS2 were prepared from Rin-5F cells (Control) and Rin-5F cells expressing EE-tagged JIP1. These immunoprecipitates were probed using the EE monoclonal antibody and antibodies to IRS1 and IRS2. Immunoblot analysis of cell lysates (100% of the amount used for the coimmunoprecipitation) is also shown.



Complete:

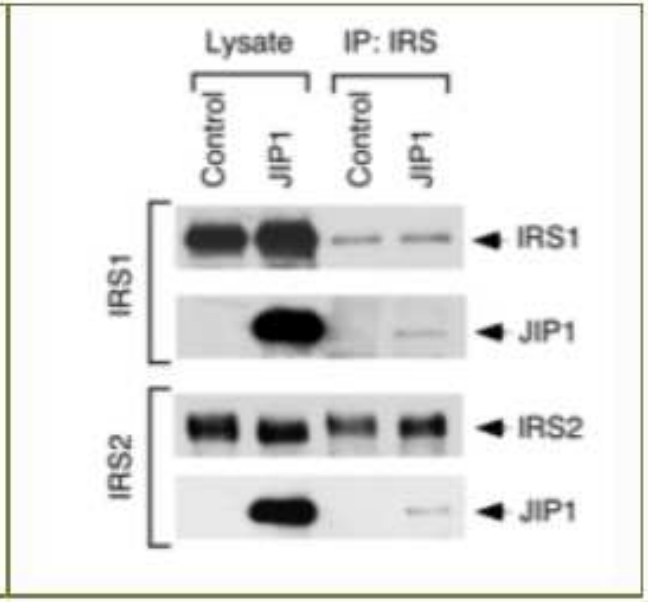
1. Rin-5F cells have been transfected with a molecular construct coding for [ ];
2. Cell lysate was immunoprecipitated with [ ] antibodies to [ ]
3. JIP1 coimmunoprecipitates with IRS1 as shows in the lane N. [ ] of the [ ]
4. JIP1 coimmunoprecipitates with IRS2 as shows in the lane N. [1 / 2 / 3 / 4] of the [1°western blot / 2°western blot / 3°western blot / 4°western blot].

10

Punti: 5

Interaction of IRS and JIP proteins.

(A) Immunoprecipitates of endogenous IRS1 and IRS2 were prepared from Rin-5F cells (Control) and Rin-5F cells expressing EE-tagged JIP1. These immunoprecipitates were probed using the EE monoclonal antibody and antibodies to IRS1 and IRS2. Immunoblot analysis of cell lysates (100% of the amount used for the coimmunoprecipitation) is also shown.



1. Rin-5F cells have been transfected with a molecular construct coding for [ ];
2. Cell lysate was immunoprecipitated with antibodies to [ ]
3. JIP1 coimmunoprecipitates with IRS1 as shows in the lane N. [ ] of the [ ]
4. JIP1 coimmunoprecipitates with IRS2 as shows in the lane N. [ ] of the [ ].

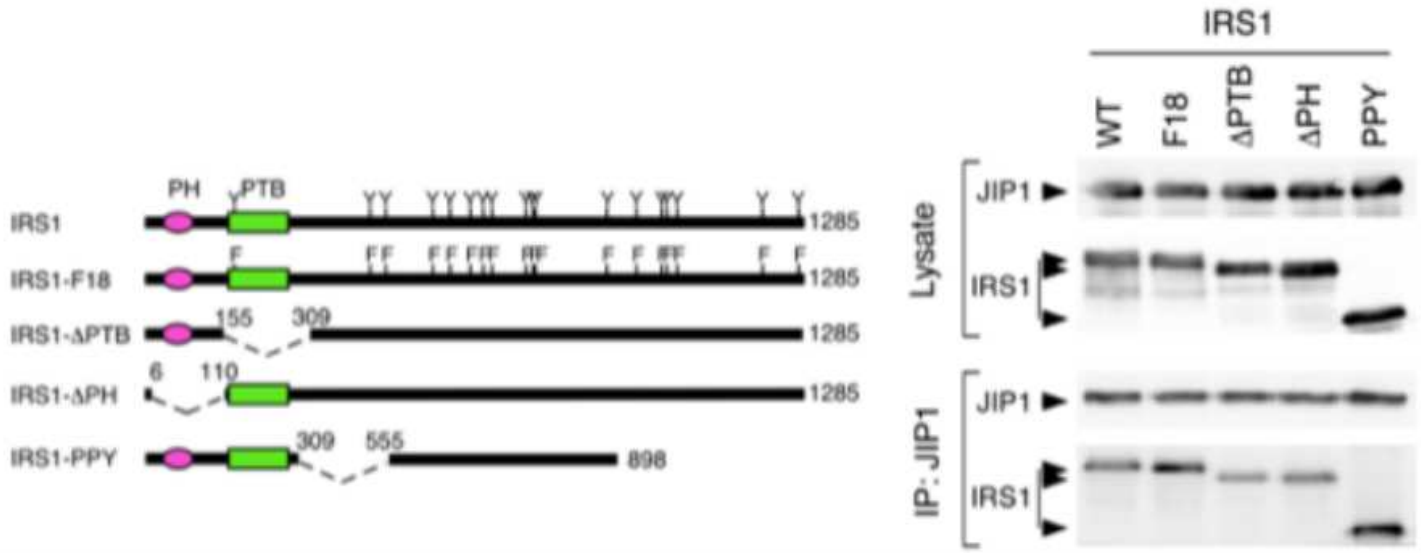
1	1°western blot
2	2°western blot
3	3°western blot
4	4°western blot

11

Punti: 1

Legend of the figure: Hemagglutinin-tagged IRS1 proteins were coexpressed with T7-tagged JIP1 in COS7 cells. The effect of IRS1 mutations was examined, including the replacement of all 18 sites of Tyr phosphorylation with Phe (F18), deletion of the PH domain (deltaPH), deletion of the PTB domain (deltaPTB), and deletion of portions of the COOH-terminal region of IRS1 (PPY). JIP1 was immunoprecipitated using a T7 monoclonal antibody. The presence of IRS1 and JIP1 in the lysate and immunoprecipitate was examined by immunoblot analysis.

Il risultato di queste immunoprecipitazioni dimostra che l'interazione tra la proteina IRS1 e la proteina JIP1 richiede la presenza di:



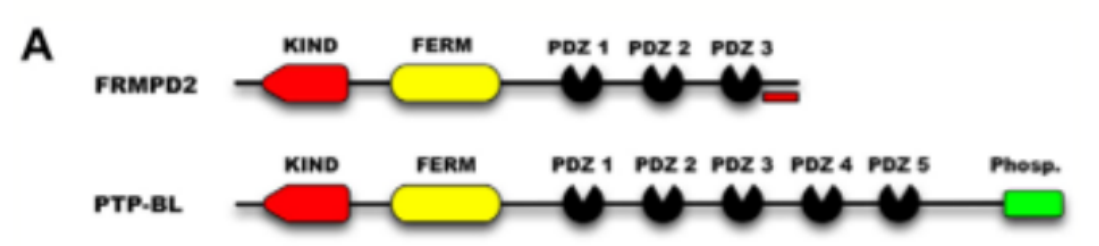
Scegliere almeno una risposta.

- ☐ almeno una delle 18 tirosine indicate in figura
- ☐ del dominio PTB
- ☐ del dominio PH
- ☐ del dominio COOH-terminale
- ☐ nessuna delle risposte proposte

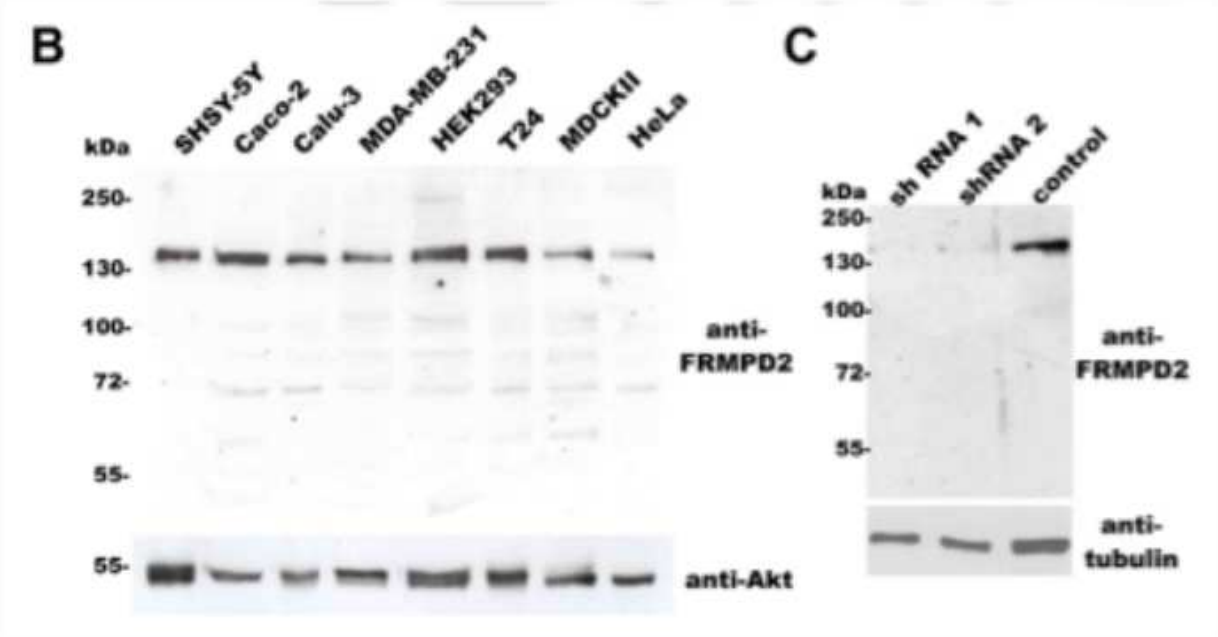
10

Punti: 2

PDZ (PSD-95/Discs large/Zonula-occludens-1)-domain-mediated interactions play an important role in the localization of many integral membrane proteins.
The novel multi-PDZ domain protein FRMPD2 is a potential scaffolding protein consisting of an N-terminal KIND domain,
a FERM domain and three PDZ domains.
Its modular structure resembles the modular structure of the protein tyrosine phosphatase PTP-BL but lacks two PDZ domains and a tyrosine phosphatase domain:



note: the red bar indicates the region used to produce FRMPD2-specific polyclonal antibodies



(B) Endogenous expression of FRMPD2 in several cell lines. Total lysates of indicated cell lines were separated by SDS-PAGE and the proteins transferred to nitrocellulose FRMPD2 was detected using a polyclonal anti-FRMPD2 antibody.

(C) SHSY-5Y cells were transiently transfected with FRMPD2-specific shRNA and corresponding control shRNA. Total lysates were separated by SDS-PAGE and the proteins transferred to nitrocellulose and probed with an anti-FRMPD2 antibody.

Domanda:

- La tecnica utilizzata per i risultati riportati nelle figure B e C prende il nome di
- La parte inferiore della figura C permette di verificare
- L'approccio sperimentale che consiste nella trasfezione con shRNA può essere più generalmente chiamata

Domanda:

- La tecnica utilizzata per i risultati riportati nelle figure B e C prende il nome di
-
- ura C permette di verificare
- L'approccio sperimentale che consiste nella trasfezione con shRNA può essere più generalmente chiamata

pulldown
western blotting
immunoprecipitation
co-immunoprecipitation

Domanda:

- La tecnica utilizzata per i risultati riportati nelle figure B e C prende il nome di

- La parte inferiore della figura C permette di verificare

- NA può essere più

l'efficienza della trasfezione
l'efficienza del trasporto della proteina ricombinante FRMPD2
la quantità relativa di proteine caricate sul gel
la quantità relativa di proteine immunoprecipitate
l'interazione di FRMP2 con la tubulina

Domanda:

- La tecnica utilizzata per i risultati riportati nelle figure B e C prende il nome di
- La parte inferiore della figura C permette di verificare
- L'approccio sperimentale che consiste nella trasfezione con shRNA può essere più generalmente chiamata

dominant negative
pulldown
knockdown
knockout
knockin