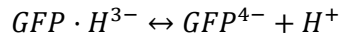
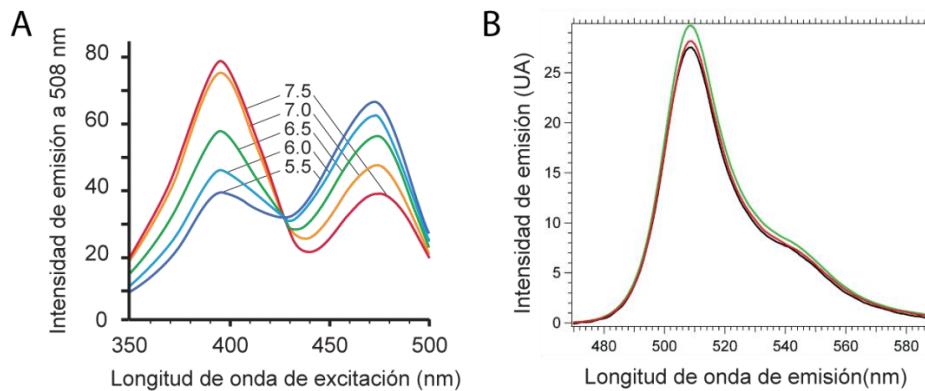


Justifique claramente sus respuesta y entregue cada problema en hojas separadas.

**Problema 1:** En el año 1998, Miesenböck y colaboradores publicaron el desarrollo de la “pHluorina ratiométrica”, una variante de la GFP que es sensible al pH (PM = 27kDa). Esta proteína cambia sus propiedades de fluorescencia dependiendo si está o no protonada una histidina particular de su secuencia. Podemos esquematizar esta reacción en la siguiente ecuación (los superíndices denotan la carga neta del compuesto):

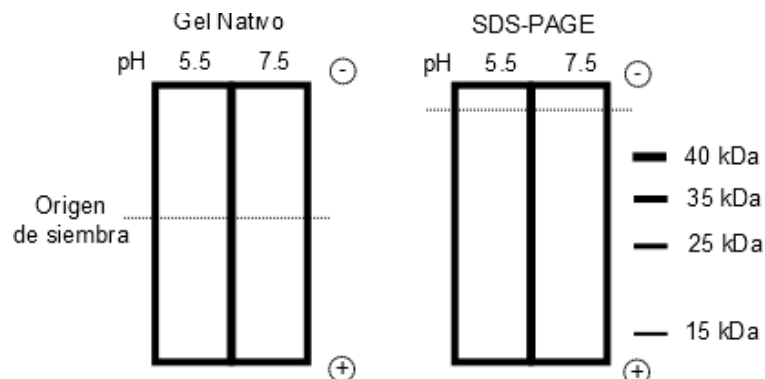


- a) Si el pKa de esta reacción es de 6.5, encuentre una expresión para el cociente  $[GFP \cdot H^{3-}]/[GFP^{4-}]$  en función del pH (desprecie la autoionización del agua).
- b) En la figura 1A se muestra el espectro de excitación de la pHluorina ratiométrica a diferentes pH. Interprete este resultado. ¿Por qué hay dos máximos? ¿Puede determinar a qué forma de la GFP corresponde cada uno? ¿Por qué hay una longitud de onda (~425nm en este caso) en la que la intensidad de fluorescencia no depende del pH?

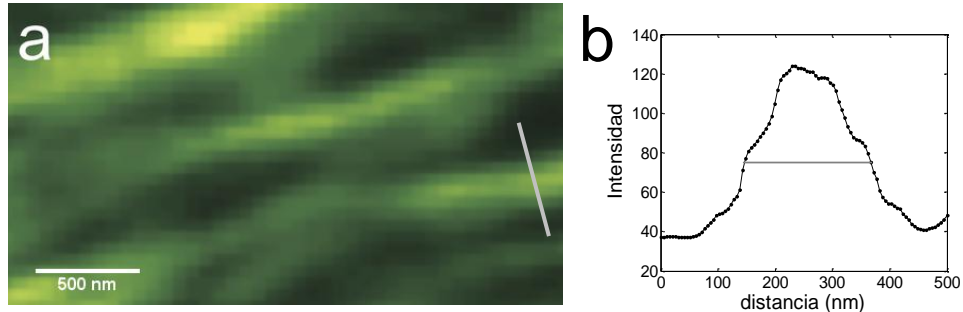


**Figura 1:** (A) Espectro de excitación de la pHluorina ratiométrica a diferentes valores de pH. (B) Espectro de emisión de la pHluorina (excitando de 380 a 480 nm), para pH 7.5, 6.5 y 5.5.

- c) En base a los espectros de excitación y emisión de la figura 1, diseñe un cubo para detectar fluorescencia de  $GFP \cdot H^{3-}$  y otro para detectar fluorescencia de  $GFP^{4-}$ . Indique los espectros de transmitancia de los filtros excitación, emisión y espejo dicróico que usaría en cada caso.
- d) ¿Qué es el sangrado espectral? ¿Qué controles haría para determinar la magnitud del mismo en el caso de la pHluorina, con los cubos que diseñó?
- Opcional)** ¿Cómo mediría el pH citoplasmático *in vivo* usando la pHluorina y los cubos que diseñó?
- e) Suponga que usted cuenta con pHluorina purificada y corre una electroforesis en gel de poliácridamida de la proteína nativa (sin SDS) y otro con SDS, cada uno a pH 5.5 y a pH 7.5. Indique en el esquema las bandas que espera ver si tiñe el gel con azul de coomasie (marca proteína total). ¿Qué bandas verá si en lugar de usar una tinción ilumina el gel a 400 nm?



**Problema 2:** Con un microscopio de fluorescencia se tomaron imágenes de células de la línea HeLa cuyos microtúbulos fueron inmunomarcadas con el fluoróforo Alexa 488. En la Figura se muestra una imagen de dicho preparado (a) y un perfil de intensidad (b) de una línea de la imagen atravesando un microtúbulo. El ancho mitad del perfil de intensidad resultó de alrededor de 220nm.



**Figura 2.** (a) Imagen obtenida por microscopía de fluorescencia de microtúbulos en células HeLa inmunomarcados con Alexa 488. (b) Perfil de intensidad sobre la línea marcada en (a). Adaptado de Min *et al.*, *Scientific Reports* 3: 2075 (2013).

- a) ¿Puede afirmar que un microtúbulo de este tipo celular tiene un diámetro aproximado de 220nm? Justifique.
- b) ¿Puede mejorar la resolución de las imágenes aumentando el número de píxeles al adquirirla? Justifique.

### Preguntas teóricas:

1. ¿Cuál es el dogma central de biología molecular?
2. Las interacciones entre dos proteínas tales como un anticuerpo y un antígeno o una hormona y su receptor, son fuertes más allá del hecho de que estas interacciones consisten en uniones no covalentes relativamente débiles. ¿Cómo lo explicaría?
3. Se quiere estudiar la interacción entre dos moléculas en una célula para lo cual se marcará cada proteína con una sonda fluorescente. ¿Qué técnica de microscopía elegiría para evaluar la interacción? ¿Qué tendría en cuenta al momento de elegir el par de sondas fluorescentes?