

CONCORSO PUBBLICO, PER TITOLI ED ESAMI, PER LA COPERTURA DI UN POSTO DI COLLABORATORE PROFESSIONALE DI RICERCA SANITARIA (ex CAT. D), A TEMPO DETERMINATO, AREA PER LE ATTIVITÀ TECNICHE E DI LABORATORIO (B.U.R. F.V.G. N. 27 DEL 05.07.2023; G.U. N. 6 DEL 05.09.2023)

Come stabilito dall'art. 19 del D.Lgs. 14 marzo 2013, n. 33, così come modificato dal D.Lgs. 25 maggio 2016, n. 97, si pubblicano di seguito i criteri di valutazione e le tracce della prova teorico-pratica e i quesiti della prova orale stabiliti dalla Commissione esaminatrice, come risulta dal verbale del concorso in oggetto:

• **PROVA TEORICO-PRATICA**

Criteri di valutazione:

“... La Commissione, sempre al completo, stabilisce ora i **criteri e le modalità di valutazione delle prove concorsuali** al fine di assegnare i punteggi da attribuire successivamente alle singole prove: decide di evidenziare nei sotto elencati criteri ciò che sarà oggetto di valutazione nella **prova teorico-pratica** che consisterà nella soluzione di **tre quesiti a risposta sintetica**, finalizzati ad evincere la competenza applicativa e in una **quarta domanda** aperta volta a valutare il grado di conoscenza scientifico-teorica in merito all'area di riferimento, sorteggiati tra una terna proposta.

Il candidato dovrà rispondere in maniera sintetica ma facendo in modo che:

- le risposte siano esaustive e adeguatamente articolate nell'ambito della sinteticità richiesta;
- le risposte evidenziano la capacità di inquadramento degli argomenti trattati;
- la grafia sia chiaramente leggibile.

Tracce:

Prova teorico-pratica n. 1

1a). La ricetta per il 10x loading buffer per DNA è la seguente:

- 5.0 mL glicerolo;
 - 500 μ L 10% SDS;
 - 500 μ L 0.2 M EDTA;
 - 0.020 g blu di bromofenolo;
 - 0.020 g xilene cianolo;
 - 0.025 Orange G.
- Portare a 10 ml con acqua demineralizzata.

Si indichi quale sarà, nella soluzione ottenuta di 10x loading buffer, la concentrazione finale dei soluti sottoindicati specificando chiaramente i calcoli effettuati e le formule utilizzate per effettuare i calcoli:

i) SDS

ii) EDTA

1b). Si vuole valutare l'espressione del gene JEAN (J) mediante real-time PCR e rapportarla a quella del gene housekeeping di controllo H. L'esperimento viene condotto in decuplicato. Si ottengono i seguenti valori:

- La quantità relativa media del gene J $\Rightarrow J_m$
- La quantità relativa media del gene di controllo H $\Rightarrow H_m$
- La deviazione standard della distribuzione delle misure di quantità relativa di J $\Rightarrow \text{devst}J$
- La deviazione standard della distribuzione delle misure di quantità relativa di H $\Rightarrow \text{devst}H$
- L'errore standard (se) della quantità relativa media di J $\Rightarrow \text{se}J$
- L'errore standard (se) della quantità relativa media di H $\Rightarrow \text{se}H$

i) si indichi la formula per calcolare l'espressione media di J normalizzata sul gene housekeeping H;

ii) si indichi l'errore standard del valore di espressione media normalizzata calcolato sopra.

Si vuole ora calcolare il valore di Jm normalizzandolo su 3 geni housekeeping (H1, H2, H3).

iii) Si indichi come convenzionalmente si calcola il valore medio aggregato di più geni housekeeping (3 in questo caso).

1c). Si vuole clonare il gene CRO nel vettore pFLASH in modo tale da taggarlo con la proteina fluorescente GFP (GFP Tag) creando una proteina chimerica.

L'obiettivo è transfettarlo in cellule di sarcoma HT1080 e valutarne interattoma e localizzazione cellulare mediante microscopia a fluorescenza.

Vengono fornite:

1) la sequenza essenziale del gene CRO (con indicazione di ATG, codone di Stop, e nucleotidi fiancheggianti);

2) la mappa del vettore pFLASH con la sequenza nucleotidica comprendente la GFP e siti di taglio a monte e a valle di questa.

Indicare che strategia di clonaggio si potrebbe impiegare, motivando chiaramente:

i) il razionale nella scelta degli enzimi individuati per effettuare il clonaggio;

ii) i motivi che hanno portato ad escludere gli altri enzimi indicati in figura;

Sequenza essenziale del gene CRO

G **GAA TTC** **GGA TCC** CTG **CGC GAT CGC** GGG **AAG CTT** AAT **CTC GAG** TTT **ATG** GGG AAG TAC TTA **TAG** TTA **GGT ACC** **GGA TCC** **AGC GGC CGC** TGA **CAG CTG** AA
EcoRI BamHI SfaI HindIII XhoI KpnI BamHI NotI PvuII

pFLASH

Enzimi di restrizione compresi tra il CMV promoter ed il PolyA del vettore pFLASH

EcoRV: GAT / ATC
 EcoRI: G / AATTC
 KpnI: GGAC / C
 BamHI: G / GATCC
 SfaI: GCGAT / CGC
 HindIII: A / AGCTT
 SpeI: A / CTAGT
 NotI: GC / GGCCGC
 XhoI: C / TCGAG

ATA **CGA TAT** **CCT** ATA GGG CGG CCG **GGA ATT** **CGT** **GGT ACC** **CTG** **GAT CCA** AAG AGG AGA TCT **GCC ACC** **ATG** GAA AGT GAC GAG AGC GGC CTG
GFP-Tag

... GAT GCA GAT GCC GGT GAG GAG AGA **GCG ATC** **GCC** GGC CCA GAT CTC **AAG CTT** **AAC** TAG TTA GTT AAG **CGG CCG** **CAC** CAC **TCG** **AGG** TTT AAA
SfaI HindIII SpeI NotI XhoI

1d) scRNA sequencing e bulk RNA sequencing: descrivere per punti le principali caratteristiche di questi approcci e relativi vantaggi e svantaggi.

Prova teorico-pratica n. 2

2a). Si stanno conducendo degli esperimenti di immunoprecipitazione e si rende necessario variare la composizione del Buffer utilizzato, al fine di ridurre il background.

La composizione del Buffer in uso è:

0.5 M Tris-HCl pH 7.4,

1.0 M NaCl,
10% Nonidet,
10 mM EDTA,
10 mM KCl.

A 90 ml di questo Buffer si aggiungono 10 ml di una soluzione di NaCl 4M.

Si indichi quale sarà, nel Buffer finale ottenuto, la concentrazione dei soluti sottoindicati specificando chiaramente i calcoli effettuati e le formule utilizzate per effettuare i calcoli:

i) NaCl

ii) Nonidet

2b). Si deve effettuare il subclonaggio del cDNA del gene JEAN (600 bp) dal vettore pBak4 al vettore di espressione lentivirale pLentiZ per valutarne l'effetto antiapoptotico in cellule di mammifero.

Il cDNA di JANE presenta a monte del sito ATG la sequenza di HpaI (GTT↓AAC) e a valle del codone di STOP la sequenza dell'enzima SfoI (GGC↓GCC).

La sequenza dell'enzima SfoI (GGC↓GCC) è presente anche nel polylinker di pLentiZ.

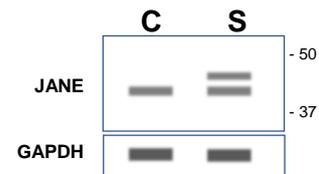
Elencare per punti i vari passaggi procedurali da effettuare per ottenere questo clonaggio finalizzato all'espressione di JEAN in cellule di mammifero, fornendo una brevissima ma chiara spiegazione per ciascun passaggio (indicare la finalità di ciascun passaggio).

2c). Si intende analizzare l'espressione per il gene JEAN in una coltura cellulare primaria andata in senescenza replicativa (S) confrontandola con quella di cellule proliferanti di controllo (C).

Si effettua un western blot su lisato cellulare totale utilizzando un anticorpo monoclonale per la proteina JEAN.

Le cellule di controllo C presentano la banda al peso molecolare atteso di JEAN.

Invece, nelle cellule in condizione di Senescenza (S) si osserva, oltre alla banda attesa, una banda a peso molecolare lievemente superiore.



Tra le opzioni sottoelencate, indicare quale/quali possono essere le fonti più plausibili di tale fenomeno, riportando il numero corrispondente, la risposta alternativa (a, b o entrambe), e dandone una breve ma chiara spiegazione:

1) Esposizione del blot:

1a) in eccesso

oppure

1b) in difetto;

2) Impiego di anticorpo primario:

2a) in eccesso

oppure

2b) in difetto;

3) Impiego di anticorpo secondario:

3a) in eccesso

oppure

3b) in difetto;

4) Variante di splicing del trascritto:

4a) repressa dalla senescenza

oppure

4b) indotta dalla senescenza;

5) Impiego di buffer di corsa con pH:

5a) troppo elevato

oppure

5b) troppo basso;

6) Modificazione della proteina:

6a) pre-traduzionale

oppure

6b) post-traduzionale;

7) Taglio triptico della proteina indotto da:

7a) senescenza

oppure

7b) arresto proliferativo;

8) Carica nel gel del campione S:

- 8a) in eccesso rispetto al campione C oppure 8b) in difetto rispetto al campione C;
 9) Cross-reazione dell'anticorpo con altra proteina espressa dalle cellule in condizioni:
 9a) basali oppure 9b) di stress cellulare;
 10) Cross-reazione dell'anticorpo secondario con le catene:
 10a) pesanti dell'anticorpo primario oppure 10b) leggere dell'anticorpo primario

2d). Real-time PCR e digital PCR: descrivere per punti le principali caratteristiche di questi due approcci ed indicarne applicazioni, vantaggi e svantaggi.

Prova teorico-pratica n. 3

3a). A causa di un eccessivo background osservato in un esperimento di immunoblotting, si intende modificare la composizione di un Wash Buffer in modo da renderlo più stringente.

La composizione iniziale del Wash Buffer è:

- 10 mM Tris-HCl pH 7.6,
- 200 mM NaCl,
- 0.01% SDS,
- 0.1% Na desossicolato.

A 80 ml di questa soluzione si aggiungono 20 ml di una soluzione 0.1% SDS.

Si indichi quale sarà, nel Buffer finale ottenuto, la concentrazione dei soluti sottoindicati specificando chiaramente i calcoli effettuati e le formule utilizzate per effettuare i calcoli:

i) SDS

ii) NaCl

3b). Delle cellule sono state sottoposte ad un trattamento di deprivazione di siero e si intende valutare la variazione nell'espressione del gene JEAN a seguito di questo trattamento.

Si è quindi allestita una reazione di RT-qPCR per valutare l'espressione di JEAN normalizzata su un gene housekeeping H.

In tabella sono forniti i valori medi del Ct dei vari replicati tecnici per il gene JEAN e per il gene housekeeping H, con relativa deviazione standard, nelle condizioni di trattamento per deprivazione serica (T) e nelle condizioni basali di controllo (C).

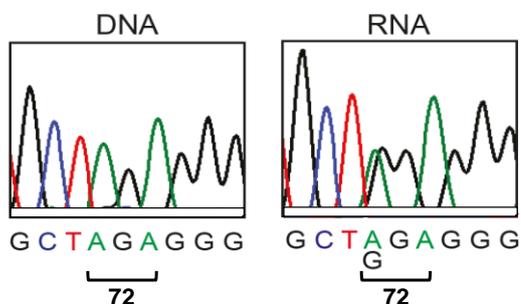
Calcolare il “fold-change” del gene JEAN (“di quante volte cambia”) nella condizione di deprivazione serica rispetto alle condizioni basali di controllo usando il metodo del “delta-delta Ct”, indicando chiaramente la formula utilizzata per questo calcolo.

Campione	Gene	Condizione	Media dei Ct dei replicati	Dev. St
JT	JEAN	trattato (deprivazione serica)	26	0.18
HT	housekeeping	trattato (deprivazione serica)	23	0.12
JC	JEAN	controllo (non trattato)	22	0.07
HC	housekeeping	controllo (non trattato)	21	0.14

3c). Analizzando un campione tumorale archiviato (campione fissato in formalina e incluso in paraffina) si nota che il 3° esone del gene JEAN presenta una sequenza diversa nell'RNA rispetto al DNA. In particolare, a livello del primo nucleotide del codone 72 (AGA) il DNA presenta una A mentre l'RNA presenta contestualmente una A ed una G. Il fenomeno è ben rappresentato e riscontrato in prelievi diversi della lesione tumorale in esame.

Selezionare quale/quali tra gli eventi sottoelencati può giustificare questa variazione selettivamente osservata

4



nella sequenza del trascritto, spiegando chiaramente la motivazione alla base della scelta/delle scelte ed il perché delle eventuali esclusioni.

- a) Metilazione della Guanina
- b) Deaminazione della Guanina
- c) Metilazione della Timina
- d) Deaminazione della Timina
- e) Metilazione della Adenina
- f) Deaminazione della Adenina
- g) Metilazione della Citosina
- h) Deaminazione della Citosina
- i) Cambiamento indotto da Proofread editing
- l) Cambiamento indotto da RNA editing
- m) Cambiamento indotto da CRISPR/Cas editing
- n) Ossidazione indotta dalla formalina.

3d). Si intende indagare la presenza di potenziali trascritti chimerici in un campione tumorale. Indicare utilità, vantaggi e svantaggi in questo contesto dei seguenti approcci: FISH, fusion-specific RT-PCR e whole RNA-sequencing.

• PROVA ORALE

Criteri di valutazione:

La Commissione decide che nella **prova orale**, costituiranno elemento di valutazione, al fine di attribuire il relativo punteggio:

- *esaustività e correttezza della risposta;*
- *chiarezza espositiva..*

Quesito n. 1

Principali problematiche legate all'analisi NGS di campioni tumorali FFPE

Quesito n. 2

PCA, Unsupervised hierarchical clustering e tSNE nell'analisi trascrittomiche di campioni tumorali: cosa rappresentano

Quesito n. 3

Caratteristiche di un gene/proteina housekeeping ottimale

Quesito n. 4

Strategie per inibire l'espressione di un gene in una linea cellulare

Quesito n. 5

Trascritti di fusione: cosa sono e come possono essere identificati