

APPELLO DI BIOCHIMICA APPLICATA

23 settembre 2010

Per verificare la capacità del SNC di sintetizzare *in situ* ormoni steroidei, è stato disegnato un esperimento in cui un gruppo di ratti femmina (O1, O2, O3) sono stati ovariectomizzati e, dopo 4 mesi, sono stati prelevati plasma e corteccia cerebrale per la valutazione dei livelli di Progesterone (PROG). I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da plasma e cortecce di animali controllo (C1, C2, C3). Allo scopo 500 µl di plasma e 100 mg tessuto cerebrale sono stati addizionati con 5 ng/campione di PROG deuterato come composto di riferimento interno (PROG-D₉), estratti e purificati opportunamente e la valutazione quantitativa è stata effettuata mediante LC-APCI-MS/MS. I risultati sono riportati in tabella

	PLASMA		CORTECCIA	
	AREA PROG D	AREA PROG	AREA PROG D	AREA PROG
C1	708	11502	410	10833
C2	874	13100	465	13357
C3	815	13600	463	12842
O1	780	1072	556	4760
O2	591	564	508	5163
O3	847	1231	394	2791

Considerando l'equazione della retta (lineare in tutto l'intervallo di concentrazione in esame) pari a $y=3.81x + 0.11$, si chiede di:

1. calcolare i livelli di progesterone plasmatico e tissutale, esprimendo il dato come pg/µl e ng/mg tessuto, rispettivamente
2. mettere in grafico i risultati ottenuti
3. commentare i risultati alla luce dello scopo della sperimentazione.

Tratto da "Effects of short- and long-term gonadectomy on neuroactive steroid levels in the central and peripheral nervous system of male and female rats" pubblicato da Caruso et al, su J Neuroendocrinology, 2010.

plasma	PROG D	PROG	Area ratio	Pg/ μ l
C1	708	11502	16	42
C2	874	13100	15	39
C3	815	13600	17	44
O1	780	1072	1,37	3,3
o2	591	564	0,95	2,2
O3	847	1231	1,45	3,5

CORTE X	PROG D	PROG	area ratio	ng/mg camp	ng/mg
C1	410	10833	26,42	34,53	0,35
C2	465	13357	28,72	37,55	0,38
C3	463	12842	27,74	36,26	0,36
O1	556	4760	8,56	11,09	0,11
o2	508	5163	10,16	13,19	0,13
O3	394	2791	7,08	9,15	0,09

Nella cromatografia a scambio ionico gli scambiatori cationici:

- a) presentano gruppi funzionali che formano un legame covalente con gli analiti
- b) presentano gruppi funzionali che si caricano negativamente a pH acidi
- c) presentano gruppi funzionali basici
- d) **presentano gruppi funzionali acidi**

Quale/i delle seguenti affermazioni sulla cromatografia è/sono corretta/e

- a) La fase stazionaria è sempre solida
- b) **La fase mobile può essere liquida**
- c) L'efficienza della colonna dipende prevalentemente dalla fase mobile

II MALDI-TOF

- a) necessita di rivelatore elettrochimico
- b) genera prevalentemente ioni multicarica
- c) **si utilizza preferenzialmente per macromolecole**

Il tempo di dimezzamento di un radioisotopo

- a) è direttamente correlato all'energia della radiazione emessa
- b) è maggiore nei radioisotopi β -emittenti rispetto a quelli γ -emittenti
- c) **è un fattore che influenza l'attività specifica di un composto marcato**

L'electrophoretic mobility shift assay:

- a) permette di separare il DNA dalle proteine
- b) richiede l'uso di urea
- c) **permette di valutare l'interazione DNA-proteine**

Per determinare il punto isoelettrico di una proteina, la prima cosa da stabilire è se il gel:

- a) contenga un detergente denaturante che possa distribuire uniformemente una carica negativa sulla superficie della proteina
- b) **presenti un gradiente di pH stabile**
- c) possa essere successivamente trattato con l'anticorpo specifico per la proteina in esame
- d) permetta di correlare la proteina in esame con una serie di proteine marker a peso molecolare noto

Quale/i tra quelli elencati potrebbe/ro essere il/i tracciante/i nel RIA:

- a) un enzima
- b) l'anticorpo marcato con un isotopo stabile
- c) **l'anticorpo marcato con un isotopo radioattivo**

Una linea cellulare può andare incontro a:

- a) **senescenza e morte cellulare**
- b) sviluppo di una coltura cellulare primaria
- c) resistenza agli antibiotici

Si vuole studiare il ruolo della proteina Niemann Pick type C 2 (NPC2) nel differenziamento dei fibroblasti ad adipociti. A tale scopo si eseguono esperimenti utilizzando una linea cellulare di fibroblasti in cui l'espressione di NPC2 viene silenziata utilizzando l'approccio degli small interfering RNA. Gli effetti dell'inattivazione di NPC2 sul differenziamento vengono valutati con gli approcci sotto riportati.

CONTENUTO DI TRIACILGLICEROLI

Il contenuto di triacilgliceroli (TAG) nelle cellule intatte nelle diverse condizioni sperimentali viene determinato utilizzando un reagente fluorescente specifico per i TAG (AdipoRed). La fluorescenza associata viene misurata con un lettore di piastre a fluorescenza e dopo sottrazione del background viene normalizzata per il valore di fluorescenza associato ai nuclei misurata nello stesso pozzetto. Si chiede di completare la tabella sotto riportata e commentare brevemente i risultati.

Descrizione campione	Fluorescenza AdipoRed	Fluorescenza nuclei	AdipoRed/nuclei
Cellule non trasfettate	929392	48693	
Cellule trasfettate con siRNA aspecifici	943755	59624	
Cellule trasfettate con siRNA per NPC2	469228	58577	
background	84424	11231	

MISURAZIONE DELLA LIPOLISI

La quantità di glicerolo rilasciato dalle cellule nelle diverse condizioni sperimentali in seguito all'idrolisi dei TAG viene misurato mediante l'utilizzo di un kit che implica la formazione di un composto colorato. Con quale metodo sperimentale si può eseguire una determinazione quantitativa di un composto colorato? (motivare adeguatamente la risposta).

CAPTAZIONE DEL GLUCOSIO (completare il testo)

La captazione del glucosio mediata dal trasportatore GLUT4 nelle cellule sottoposte alle diverse condizioni sperimentali (vedi colonna 1 della tabella) viene misurato utilizzando $[^3\text{H}]$ deossiglucosio. La captazione del glucosio attraverso sistemi non specifici viene valutata incubando le cellule a La radioattività incorporata viene misurata mediante mentre la concentrazione proteica viene determinata con il Dopo sottrazione della captazione aspecifica i dati della captazione del glucosio vengono espressi come utilizzando nei calcoli

Spettrofotometria - l'attività specifica - $\text{nmoli} \times \text{mg prot}^{-1} \times \text{hr}^{-1}$ - il peso molecolare - metodo di Bradford - 4°C - $[^3\text{H}]$ deossiglucosio - ng/nmoli - 95°C - Sybr green - scintillazione in fase liquida - anticorpo antiGLUT4

STATO DI ATTIVAZIONE DI RECETTORI DI MEMBRANA (completare il testo)

Lo stato di attivazione dei recettori di membrana tirosin-chinasici nelle cellule nelle diverse condizioni sperimentali viene valutato utilizzando un "array kit" (array = collezione) in grado di identificare simultaneamente lo stato di fosforilazione di 42 recettori tirosin-chinasici. Il protocollo sperimentale prevede la separazione della frazione da quella Aliquote della frazione vengono quindi applicate su una contenente gli anticorpi anti recettori tirosin-chinasici. Dopo opportuna incubazione il materiale viene rimosso con un tampone di lavaggio. La forma fosforilata dei recettori tirosin-chinasici legati alla membrana viene rivelata con un anticorpo coniugato con Il segnale viene quindi rivelato mediante

Membrana di nitrocellulosa - IgG- pan-fosfotirosina - chemiluminescenza - citosolica - perossidasi di rafano (HRP) - non legato - colonna C18 reverse phase - spettrofotometria - nucleare - legato - pan-fosfoferina - mitocondriale -

Con quale tecnica possono essere confermati i dati ottenuti nel protocollo sopra descritto? (motivare adeguatamente la risposta). stato fosforilaz

Tratto da "Somatic Cell Plasticity and Niemann-Pick Type C2 Protein ADIPOCYTE DIFFERENTIATION AND FUNCTION" di C. Csepegi et al., The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285, 30347-30354

CONTENUTO DI TRIACILGLICEROLI

Il contenuto di triacilgliceroli (TAG) nelle cellule intatte nelle diverse condizioni sperimentali viene determinato utilizzando un reagente fluorescente specifico per i TAG (AdipoRed). La fluorescenza associata viene misurata con un lettore di piastre a fluorescenza e dopo sottrazione del background viene normalizzata per il valore di fluorescenza associato ai nuclei misurata nello stesso pozzetto. Si chiede di completare la tabella sotto riportata e commentare brevemente i risultati.

$$(929392-84424)/(48693-11231)= 22.56$$

Descrizione campione	Fluorescenza AdipoRed	Fluorescenza nuclei	AdipoRed/nuclei
Cellule non trasfettate	929392	48693	22.56
Cellule trasfettate con siRNA aspecifici	943755	59624	17,76
Cellule trasfettate con siRNA per NPC2	469228	58577	8,13
background	84424	11231	

MISURAZIONE DELLA LIPOLISI

La quantità di glicerolo rilasciato dalle cellule nelle diverse condizioni sperimentali in seguito all'idrolisi dei TAG viene misurato mediante l'utilizzo di un kit che implica la formazione di un composto colorato. Con quale metodo sperimentale si può eseguire una determinazione quantitativa di un composto colorato? (motivare adeguatamente la risposta).

CAPTAZIONE DEL GLUCOSIO (completare il testo)

La captazione del glucosio mediata dal trasportatore GLUT4 nelle cellule sottoposte alle diverse condizioni sperimentali (vedi colonna 1 della tabella) viene misurato utilizzando $[^3\text{H}]$ deossiglucosio. La captazione del glucosio attraverso sistemi non specifici viene valutata incubando le cellule a **4°C**. La radioattività incorporata viene misurata mediante **scintillazione in fase liquida** mentre la concentrazione proteica viene determinata con il **metodo di Bradford**. Dopo sottrazione della captazione aspecifica i dati della captazione del glucosio vengono espressi come **. nmoli x mg prot⁻¹ x hr⁻¹** utilizzando nei calcoli **l'attività specifica**..

STATO DI ATTIVAZIONE DI RECETTORI DI MEMBRANA (completare il testo)

Lo stato di attivazione dei recettori di membrana tirosin-chinasici nelle cellule nelle diverse condizioni sperimentali viene valutato utilizzando un "array kit" (array = collezione) in grado di identificare simultaneamente lo stato di fosforilazione di 42 recettori tirosin-chinasici. Il protocollo sperimentale prevede la separazione della frazione **citoplasmatica** da quella **nucleare**. Aliquote della frazione **citoplasmatica** vengono quindi applicate su una **Membrana di nitrocellulosa** contenente gli anticorpi anti recettori tirosin-chinasici. Dopo opportuna incubazione il materiale **non legato** viene rimosso con un tampone di lavaggio. La forma fosforilata dei recettori tirosin-chinasici legati alla membrana viene rivelata con un anticorpo **pan-fosfotirosina** coniugato con **perossidasi di rafano (HRP)**. Il segnale viene quindi rivelato mediante **chemiluminescenza**.

Con quale tecnica possono essere confermati i dati ottenuti nel protocollo sopra descritto? (motivare adeguatamente la risposta). Va studiato lo stato di fosforilazione