

APPELLO DI BIOCHIMICA APPLICATA del 16 dicembre 2010

L'autismo è un disordine dello sviluppo neuronale di cui ancora poco sono note sia l'eziologia che la patologia. Lo studio in oggetto ha voluto verificare se, almeno in parte, queste alterazioni potessero essere dovute a stress ossidativi, non controllati per una carenza enzimatica. Pertanto sono stati valutati i livelli della superossido dismutasi (SOD), un enzima che gioca un ruolo centrale nella risposta dell'organismo alla tossicità dei sottoprodotti metabolici dell'ossigeno, nei globuli rossi di bambini autistici (1-5). I dati sono stati confrontati con quelli ottenuti da bambini non affetti dalla patologia (6-10, controlli).

Allo scopo a 5 bambini con una diagnosi clinica di autismo (definita secondo i criteri della Childhood Autism Rating Scale, CARS) e 5 bambini controllo sono stati prelevati 5 ml di sangue intero dai quali sono stati isolati i globuli rossi per centrifugazione, effettuata una lisi osmotica con acqua e infine diluiti 1:100 per la determinazione spettrofotometrica dell'attività della SOD. La procedura prevede che a 0.05 ml di lisato diluito venga aggiunta la miscela di reagenti. Sono state effettuate due letture (30 sec e 3 minuti), come riportato in tabella:

soggetto	Abs a 30 sec	Abs a 3 min
1	0,05	0,665
2	0,04	0,705
3	0,045	0,802
4	0,024	0,805
5	0,011	0,83
6	0,042	1,05
7	0,025	1,35
8	0,011	1,36
9	0,009	0,996
10	0,036	1,55

Considerando un fattore di correzione pari a 1.26 U/ μ l, si chiede:

- di calcolare la concentrazione della SOD espressa in U/ml
- commentare i dati ottenuti, in riferimento allo scopo del lavoro.

tratto da "Evaluation of Oxidative Stress in Autism: Defective Antioxidant Enzymes and Increased Lipid Peroxidation" di N. A. Meguid pubblicato su Biol Trace Elem Res, 2010, DOI 10.1007/s12011-010-8840-9.

$$(0.665-0.05) \times 1.26 \text{ U}/\mu\text{l} = 0.77 \text{ U}/\mu\text{l} \times 1000 = 770 \text{ U/ml}$$

sogget to	Abs a 30 sec	Abs a 3 min	U/ul		U/ml
1	0,05	0,665	0,77		
2	0,04	0,705	0,84		
3	0,045	0,802	0,95		
4	0,024	0,805	0,98		
5	0,011	0,83	1,03		
				0,92	917
6	0,042	1,05	1,27		
7	0,025	1,35	1,67		
8	0,011	1,36	1,70		
9	0,009	0,996	1,24		
10	0,036	1,55	1,91		
				1,56	1558

Quale/quali tra queste affermazioni sulla gascromatografia è/sono false:

- a) l'eluizione differenziale degli analiti di una miscela dipende dal peso molecolare
- b) si possono rivelare solo molecole alogenate
- c) l'identificazione di una molecola si basa sul tempo di ritenzione relativo
- d) il miglior composto di riferimento interno, è l'analita stesso marcato con isotopi stabili

In un sistema cromatografico la risoluzione

- a) definisce la sensibilità nella rilevazione degli analiti
- b) si basa anche sulla distanza tra due picchi
- c) è maggiore nel caso di analiti che vengono eluiti con elevati tempi di eluizione

Nella spettrometria di massa, gli ioni molecolari

- a) Corrispondono al PM esatto della molecola
- b) Non sono sempre i più intensi negli spettri di massa
- c) Corrispondono a qualsiasi ione presente nello spettro di massa riconducibile alla molecola in esame

Nell'autoradiografia la lastra si impressiona in seguito

- a) all'emissione di fotoni
- b) ad una reazione di riduzione
- c) all'eccitazione dei componenti presenti nel film che ricopre la lastra

Nella real time PCR il ciclo soglia

- a) è il ciclo al quale si raggiunge il plateau del segnale
- b) è proporzionale quantità di primers utilizzati
- c) è proporzionale alla quantità di template

Nell'elettroforesi con gel di agarosio

- a) si separano frammenti di DNA da frammenti di RNA
- b) una bassa percentuale di agarosio (0.7%) permette di separare frammenti molto piccoli (~200-300 bp)
- c) la rivelazione del DNA si basa sull'utilizzo di coloranti intercalanti

Una library a cDNA

- a) è una collezione di sequenze di DNA complementari e identiche al DNA genomico
- b) è caratteristica di uno specifico tipo di tessuto o di cellula
- c) richiede l'impiego di primers specifici per la sequenza da amplificare

Il frazionamento cellulare:

- a) si può ottenere con l'ultracentrifugazione
- b) si applica solo alle cellule eucariote
- c) si può ottenere con la gel cromatografia

L'enzima nicotinammide mononucleotide (NMN) adeniltrasferasi 2 (Nmnat2) catalizza la sintesi di NAD da NMN e ATP ed è espresso nel cervello. Per comprendere meglio la funzione di questo enzima si vuole studiare come Nmnat2 interagisce con l'apparato del Golgi, la sua espressione proteica a livello cellulare e durante lo sviluppo e la sua localizzazione in cellule cerebrali.

A tale scopo si utilizzano i protocolli sperimentali sotto riportati

Analisi dell'espressione di Nmnat2 in cellule e tessuti (completare il testo)

I campioni di cellule e tessuti vengono opportunamente lisati con un opportuno tampone contenente per prevenire la degradazione delle proteine. La concentrazione proteica dei lisati viene determinata mediante Aliquote fisse di proteine totali vengono caricate su in presenza di Per rivelare la presenza di Nmnat2 si utilizza come anti- Nmnat2 e come IgG coniugate con fosfatasi alcalina. La rivelazione avviene in presenza di un substrato della fosfatasi alcalina. Per controllare l'omogeneità del caricamento dei campioni si esegue la rivelazione di una proteina normalmente nei campioni in esame.

Bromuro di cianogeno; espressa a livelli costanti; chemiluminescente; anticorpo secondario; SDS; metodo spettrofotometrico; gel di poliacrilamide; specifico; azoto liquido; anticorpo primario; Inibitori delle proteasi; gas-cromatografia; up-regolata

Saggio di palmitilazione (completare il testo e rispondere alle domande)

Cellule HEK293 vengono prima trasfettate transientemente con un che codifica per la proteina Nmnat2 recante all'estremità C-terminale una sequenza denominata FLAG e successivamente incubate per 6 h in presenza di un terreno contenente [9,10-³H(N)]acido palmitico (concentrazione finale 0.4 mCi/ml). Al termine dell'incubazione le cellule vengono lisate ed i lisati vengono incubati in presenza di per recuperare la frazione arricchita di proteina Nmnat2. Le proteine associate alle particelle vengono separate mediante e le bande radioattive vengono rivelate mediante

Plasmide; spettrofluorimetria; SDS-PAGE; TLC; autoradiografia; genoma; particelle di anti-FLAG agarose; nitrocellulosa

- Sapendo che l'attività specifica del [9,10-³H(N)]acido palmitico utilizzato è 55.1 mCi/mole, calcolarne la concentrazione molare nel terreno.
- Indicare a quale/i i destini metabolici può andare incontro [9,10-³H(N)]acido palmitico in seguito all'incubazione con colture cellulari.
- Sapendo che la palmitilazione avviene a livello di residui di cisteina, proporre dei metodi (almeno 2) che permettano di individuare le cisteine coinvolte nella palmitilazione di Nmnat2. Mutagenesi sito specifica, spettrometria di massa

Estrazione della frazione di membrane postnucleari (completare il testo)

Cervelli di topo vengono omogeneizzati in ghiaccio utilizzando un in tampone contenente e inibitori delle proteasi. Per eliminare la contaminazione di l'omogenato viene centrifugato a 900 x g per 10 min. Il surnatante viene ulteriormente centrifugato a per ottenere la frazione citosolica ed un pellet contenente

Cell scraper; fosfolipidi; Saccarosio; membrane citoplasmatiche; 100.000 x g per 1 h; potter-elvehjem; batteri; sodio cloruro; nuclei e cellule non frammentate; 10.000 x g

Tratto da "Expression, Localization, and Biochemical Characterization of Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase 2" pubblicato su THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 285, NO. 51, pp. 40387-40396, December 17, 2010

Analisi dell'espressione di Nmnat2 in cellule e tessuti (completare il testo)

I campioni di cellule e tessuti vengono opportunamente lisati con un opportuno tampone contenente **Inibitori delle proteasi** per prevenire la degradazione delle proteine. La concentrazione proteica dei lisati viene determinata mediante **metodo spettrofotometrico**. Aliquote fisse di proteine totali vengono caricate su **gel di poliacrilamide** in presenza di **SDS**. Per rivelare la presenza di Nmnat2 si utilizza come **anticorpo primario** anti- Nmnat2 e come **anticorpo secondario** IgG coniugate con fosfatasi alcalina. La rivelazione avviene in presenza di un substrato **chemiluminescente** della fosfatasi alcalina. Per controllare l'omogeneità del caricamento dei campioni si esegue la rivelazione di una proteina normalmente **espressa a livelli costanti** nei campioni in esame.

Saggio di palmitilazione (completare il testo e rispondere alle domande)

Cellule HEK293 vengono prima trasfettate transientemente con un **Plasmide** che codifica per la proteina Nmnat2 recante all'estremità C-terminale una sequenza denominata FLAG e successivamente incubate per 6 h in presenza di un terreno contenente [9,10-³H(N)]acido palmitico (concentrazione finale 0.4 mCi/ml). Al termine dell'incubazione le cellule vengono lisate ed i lisati vengono incubati in presenza di **particelle di anti-FLAG agarose** per recuperare la frazione arricchita di proteina Nmnat2. Le proteine associate alle particelle vengono separate mediante **SDS-PAGE** e le bande radioattive vengono rivelate mediante **autoradiografia**.

- Sapendo che l'attività specifica del [9,10-³H(N)]acido palmitico utilizzato è 55.1 mCi/mmol, calcolarne la concentrazione molare nel terreno.
- Indicare a quale/i i destini metabolici può andare incontro [9,10-³H(N)]acido palmitico in seguito all'incubazione con colture cellulari.
- Sapendo che la palmitilazione avviene a livello di residui di cisteina, proporre dei metodi (almeno 2) che permettano di individuare le cisteine coinvolte nella palmitilazione di Nmnat2.

Estrazione della frazione di membrane postnucleari (completare il testo)

Cervelli di topo vengono omogeneizzati in ghiaccio utilizzando un **potter-elvehjem** in tampone contenente **Saccarosio** e inibitori delle proteasi. Per eliminare la contaminazione di **nuclei e cellule non frammentate** l'omogenato viene centrifugato a 900 x g per 10 min. Il surnatante viene ulteriormente centrifugato a **100.000 x g per 1 h** per ottenere la frazione citosolica ed un pellet contenente **membrane citoplasmatiche**.