

## APPELLO DI BIOCHIMICA APPLICATA

### 22 giugno 2010

E' stato ipotizzato che il rapporto tra colesterolo ed alcuni steroli plasmatici possano essere predittivi della reazione del paziente al trattamento con statine. Per verificare quale metabolita risulta essere il più predittivo, sono stati selezionati 10 pazienti ipercolesterolemici classificati come reattivi (R, pazienti 1-5) e non reattivi (NR, pazienti 6-10) ai quali sono stati effettuati dosaggi di colesterolo, desmosterolo e latosterolo (markers della sintesi di colesterolo) e prima e dopo 16 settimane di trattamento con simvastatina. Per brevità, tutti i metaboliti in esami sono stati riportati in mg/dl mentre viene chiesto il calcolo della concentrazione di colesterolo. Il dosaggio del colesterolo è stato effettuato su 250 µl di plasma con metodica colorimetrica e i valori, espressi come densità Ottica (OD) sono riportati in tabella.

	Tempo 0			Tempo 16 settimane		
	Colesterolo (Abs)	Desmosterolo (mg/dl)	Latosterolo (mg/dl)	Colesterolo (Abs)	Desmosterolo (mg/dl)	Latosterolo (mg/dl)
1	198	415	525	138	122	182
2	178	438	522	126	89	191
3	155	438	602	105	95	177
4	201	448	485	138	101	121
5	190	451	475	148	112	133
6	177	201	384	157	112	188
7	189	142	395	168	135	167
8	212	158	302	182	128	177
9	281	188	363	253	179	257
10	188	158	399	167	148	198

Considerando il valore del fattore di correzione pari a 1.75 mg/dl, si chiede

1. Calcolare la concentrazione plasmatica del colesterolo nei pazienti.
2. Verificare quale metabolita, in relazione alla concentrazione di colesterolo, è il più rappresentativo della responsività del paziente al farmaco.

Tratto da "Applicability of non-cholesterol sterols in predicting response in cholesterol metabolism to simvastatin and fluvastatin treatment among hypercholesterolemic men" pubblicato da Nissinen et al. su [Nutr Metab Cardiovasc Dis.](#) 2010 Jun;20(5):308-16.

Il numero di piatti teorici:

- a) è indice dell'efficienza di una colonna
- b) dipende solo dalla natura chimica della matrice
- c) non è influenzato dalla dimensione delle particelle della fase stazionaria

La cromatografia a scambio ionico:

- a) si applica a molecole che possono assumere una carica
- b) separa sempre piccole molecole da molecole ad alto peso molecolare
- c) separa acidi grassi liberi da trigliceridi

L'ESI-MS

- a) si deve utilizzare solo per analisi qualitativa
- b) genera ioni multicarica
- c) produce ioni prodotto
- d) si utilizza solo per piccole molecole

Nella Real time PCR la quantità iniziale di DNA è proporzionale:

- a) alla fluorescenza massima
- b) al ciclo soglia
- c) alla concentrazione dei primers

L'ibridazione DNA-RNA

- a) è un passaggio nella tecnica di Northern blotting
- b) è un passaggio nella tecnica di Western blotting
- c) avviene solo in corrispondenza di regioni ricche di GC

La struttura primaria delle proteine può essere ottenuta con

- a) LC-MS/MS
- b) GC-MS
- c) IEF

La zimografia

- a) permette l'individuazione delle proteasi in base alla loro attività biologica
- b) è una corsa elettroforetica effettuata in condizioni native
- c) serve per individuare mutazioni puntiformi sul DNA

Quale/i tra quelli elencati potrebbe/ro essere il/i tracciante/i nell'ELISA:

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

Si vogliono caratterizzare dei nuovi composti con attività inibitoria nei confronti delle istone deacetilasi. A tale scopo si eseguono esperimenti utilizzando gli approcci sperimentali sotto riportati.

**Saggio ex-vivo dell'attività istone deacetilasica** (Completare testo e tabella)

Per saggiare la capacità dei composti in esame di inibire l'attività istone deacetilasica, si utilizzano cellule derivanti da adenocarcinoma colo-rettale umano (Caco-2) coltivate in terreno addizionato di ..... La cellule Caco-2 crescono adese pertanto vengono amplificate dopo distacco dalla piastra con ..... Le cellule vengono incubate in presenza di un substrato fluorogenico che, in seguito all'azione delle istone deacetilasi sviluppa fluorescenza con emissione a ..... dopo eccitazione a ..... I risultati ottenuti sono riportati in tabella.

trattamento	Substrato fluorogenico	Fluorescenza (unità arbitrarie)	Inibizione dell'attività deacetilasica (%)
Veicolo	-	3021	
Veicolo	+	24705	
Inibitore di riferimento	+	7768	
Inibitore 1	+	13019	
Inibitore 2	+	23773	
Inibitore 3	+	9820	
Inibitore 4	+	11294	

Tripsina - 450 nm - Siero fetale bovino + antibiotici - 365 nm - dimetilformammide - Lisozima

**Analisi di Western Blot** (Completare il testo e la tabella)

Per valutare lo stato di acetilazione delle proteine si utilizzano analisi di Western blot. Le cellule vengono lisate e la concentrazione totale delle proteine viene determinata mediante ..... I risultati sono riportati nella tabella.

Campione	Assorbanza	Volume corrispondente a 20 µg
Std 5 µg	0.081	
Std 10 µg	0.157	
Std 25 µg	0.345	
Std 50 µg	0.680	
Cellule trattate con veicolo (10 µl)	0.213	

Cellule trattate con inibitore di riferimento (10 µl)	0.246
Cellule trattate con Inibitore 1 (10 µl)	0.189
Cellule trattate con Inibitore 2 (10 µl)	0.205
Cellule trattate con Inibitore 3 (10 µl)	0.232
Cellule trattate con Inibitore 4 (10 µl)	0.052

Aliquote corrispondenti a 20 µg totali vengono caricate su un gel di ..... Al termine della separazione elettroforetica le proteine vengono trasferite su membrane di ..... Per verificare la qualità del trasferimento le membrane vengono trattate con ....., colorante specifico per le proteine. La rivelazione viene effettuata usando appropriati anticorpi primari e secondari, questi ultimi coniugati con perossidasi di rafano.

Metodo di Bradford - HPLC - Sybr green - SDS-PAGE al 12% - sefariosio - nitrocellulosa - Ponceau - gelatina

Tratto da "Biological and Biophysical Properties of the Histone Deacetylase Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid Are Affected by the Presence of Short Alkyl Groups on the Phenyl Ring", J. Med. Chem., **2010**, 53 (5), pp 1937-1950