

# APPELLO DI BIOCHIMICA APPLICATA

## 25 MAGGIO 2010

1. A livello mitocondriale il piruvato può alimentare il ciclo degli acidi tricarbossilici mediante la reazione anaplerotica catalizzata dalla piruvato carbossilasi. Questo porta di conseguenza all'efflusso di citrato, isocitrato e malato nel citoplasma. A livello citosolico l'isocitrato può andare incontro alla reazione catalizzata dall'isocitrico deidrogenasi citosolica (ICDc) NADP-dipendente che genera  $\alpha$ -chetoglutarato (2-ossal-glutarato) e NADPH. Studi precedenti hanno dimostrato che questa reazione svolge un ruolo importante nella secrezione di insulina indotta dal glucosio da parte delle cellule  $\beta$  del pancreas.

Resta tuttavia da stabilire in modo chiaro il destino dell' $\alpha$ -chetoglutarato prodotto a livello citosolico. Una possibilità è che l' $\alpha$ -chetoglutarato venga trasportato nei mitocondri attraverso un carrier specifico (mitochondrial 2-oxo-glutarate carrier, OGC), antiporto bidirezionale in grado di trasportare contemporaneamente sia 2-ossal-glutarato che malato in direzioni opposte, sia all'esterno che all'interno della matrice mitocondriale.

Si vuole pertanto studiare il ruolo di OGC sul metabolismo e la secrezione di insulina in colture di insulinoma (modello di cellule  $\beta$  pancreatiche).

### Sovraespressione di OGC mediante Adenovirus

Il gene codificante OGC viene amplificato mediante PCR utilizzando come

..... cDNA ottenuto da cellule  $\beta$  pancreatiche utilizzando il primer forward 5' AATC GAATTC CAA AGC CGA GGG CCA TCA AG 3', contenente il sito di restrizione ..... (scegliere dall'elenco sotto riportato) e il primer reverse 5' AATC AAGCTT TGG AAA CCC TGG CAC ACG AG 3' contenente il sito di restrizione ..... (scegliere dall'elenco sotto riportato). Il prodotto dell'amplificazione viene clonato in un opportuno vettore digerito con ..... e ..... Il costrutto così ottenuto viene utilizzato per la preparazione dell'Adenovirus Ad-OGC. Cellule di insulinoma vengono quindi trattate con Ad-OGC e l'entità della sovraespressione del trasportatore viene determinata misurando l'mRNA corrispondente mediante ..... ed i livelli di proteina mediante .....

BamHI (5' → 3')	GGATCC	BglII (5' → 3')	AGATCT
EcoRI (5' → 3')	GAATTC	Hind III (5' → 3')	AAGCTT

### Saggi metabolici

- L'utilizzo del glucosio attraverso la glicolisi viene determinato incubando cellule di insulinoma in presenza di glucosio 2 mM (condizione A) o 12 mM (condizione B) e quantità traccianti di glucosio radioattivo. A tale scopo si utilizza  $[5\text{-}^3\text{H}]\text{glucosio}$  (attività specifica della soluzione di partenza 0.06 Ci/mol) alla concentrazione di 0.5  $\mu\text{Ci/ml}$  di terreno. Si chiede:

calcolare l'attività specifica del glucosio nel terreno di coltura nelle due condizioni soprariportate

- I livelli intracellulari di ATP si misurano utilizzando un saggio che richiede l'utilizzo dell'enzima luciferasi. Si chiede:

In base a quale principio è possibile misurare l'ATP con l'impiego della luciferasi?

Quale segnale è associato alla reazione catalizzata dalla luciferasi?

- Sulla base delle tecniche conosciute

Proporre un metodo per la determinazione dei livelli di  $\text{NADP}^+$  (instabile a pH elevati) e NADPH (instabile a pH acidi) descrivendo brevemente un possibile protocollo

Tratto da "The Mitochondrial 2-Oxoglutarate Carrier Is Part of a Metabolic Pathway That Mediates Glucose- and Glutamine-stimulated Insulin Secretion" J. Biol. Chem. 2010 285: 16530-16537.

### **Nella gel-filtrazione una molecola di forma globulare:**

- a) viene eluita prima di una molecola di pari peso molecolare ma di struttura lineare
- b) viene eluita dopo una molecola di pari peso molecolare ma di struttura lineare
- c) viene eluita come una molecola di pari peso molecolare ma di struttura lineare

### **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, lo ione molecolare**

- a) Corrisponde al PM esatto della molecola
- b) Non è sempre il più intenso nello spettro di massa
- c) E' qualsiasi ione presente nello spettro di massa riconducibile alla molecola in esame

### **I radioisotopi $\beta$ -emittenti**

- a) generano fotoni in seguito all'interazione con solventi aromatici
- b) sono caratterizzanti in media da tempi di dimezzamento di 7-90 giorni
- c) hanno un potere di penetrazione superiore rispetto ai raggi  $\gamma$

### **Nel sequenziamento del DNA secondo il metodo di Sanger**

- a) il DNA in esame viene degradato enzimaticamente in corrispondenza di specifiche basi
- b) si utilizza una DNA polimerasi termostabile
- c) si utilizzano desossiribonucleotidi modificati

### **Un gene reporter**

- a) viene utilizzato in saggi di trasfezioni transienti
- b) viene utilizzato per normalizzare i valori di mRNA
- c) viene utilizzato per clonare un gene di interesse

### **L'elettroforesi su gel di agarosio viene utilizzata preferenzialmente:**

- a) per sequenziare molecole ad elevato PM
- b) per la sua elevata risoluzione
- c) per molecole ad elevato PM

**Quale di questi parametri è monitorato dal terreno di coltura?**

- a) La temperatura
- b) Il pH
- c) L'umidità

2. La blonanserina (B) è un nuovo potente antagonista di dopamina D<sub>2</sub> e serotonina 5-HT<sub>2</sub> utilizzato nel trattamento della schizofrenia. Scopo del lavoro è stato di investigare l'effetto dell'assunzione di cibo sull'esposizione sistemica alla B in soggetti volontari sani. Allo scopo 3 volontari hanno assunto una singola dose orale (2 mg) di B in giorni diversi e nelle condizioni riportate: a digiuno (giorno 1), 30 minuti prima (giorno 2), 2 ore (giorno 3) e 4 ore (giorno 4) dopo l'assunzione di un normale pasto. Il sangue (4 ml) è stato prelevato dopo 4 ore dall'assunzione del farmaco e centrifugato per l'isolamento del plasma. A 500 µl di plasma sono stati aggiunti 150 pg/ml di <sup>13</sup>C-B, come composto di riferimento interno e quindi i campioni hanno subito le opportune procedure di purificazione. La concentrazione della B plasmatica è stata valutata con metodiche validate di cromatografia liquida-spettrometria di massa. I risultati sono riportati in tabella

soggetto	digiuno		30 min prima del prelievo		2h dopo il prelievo		4ore dopo il prelievo	
	Area B	area <sup>13</sup> C-B	Area B	area <sup>13</sup> C-B	Area B	area <sup>13</sup> C-B	Area B	area <sup>13</sup> C-B
1	4990	9765	15890	7600	11690	7650	8970	8320
2	4710	8800	17400	8200	12400	8100	8120	7980
3	4208	7900	16570	7850	12189	7760	9760	9870

Considerando il valore della pendenza della curva di calibrazione, lineare in tutto l'intervallo di concentrazioni in esame, pari a 0.88 si chiede

1. Calcolare la concentrazione della B nei pazienti a digiuno e dopo 4 ore dalla somministrazione del farmaco, esprimendo il dato come pg/ml di plasma.
2. Commentare i dati ottenuti alla luce dello scopo dell'esperimento

Tratto da "Effect of dose timing in relation to food intake on systemic exposure to blonanserine" pubblicato da Saruwatari et al. su Eur J Clin Pharmacol on line May 2010