



UNIVERSITETET I OSLO

DET MEDISINSKE FAKULTET

Konte/utsatt prøve, MEDSEM/ODSEM/ERNSEM2 – Vår 2010

Onsdag 11. august 2010, kl. 9.00-15.00

Oppgavesettet består av 5 sider

Viktige opplysninger:

Hjelpemidler: Norsk rettskrivningsordbok

Reseptor-tyrosinkinaser og cytokin-reseptorer er proteiner som er viktige signalveier for dannelsen av blodceller.

Oppgave A (Vekting; 18 %):

- 1. Hva slags signalmolekyler kan lede til aktivering av reseptor-tyrosinkinaser? Beskriv minst to signalveier, som kan genereres nedstrøms for aktivering av reseptoren.**
- 2. Hvordan kan signalet fra en aktivert reseptor-tyrosinkinase slås av?**

Tyrosinkinase-reseptorer har følgende domener: ekstracellulære globinlignende domener, et transmembrant domene og intracellulære tyrosinholdige domener.

- 3. Proteiners struktur kan deles inn i flere nivåer. Beskriv de ulike nivåene og forklar hva som bestemmer proteinenes endelige struktur.**
- 4. Hva slags reaksjoner katalyseres av en tyrosinkinase?**
- 5. Beskriv kort hvordan man kan bestemme kinetikken til et enzym og hva parametrene V_{\max} og K_m beskriver?**
- 6. Forklar hvordan signalsekvenser i et proteins primærstruktur bestemmer proteinets plassering i en celle.**

T-lymfocytter uttrykker insulinreseptorer når de blir aktivert *in vitro*. Insulin-binding til aktiverte T-lymfocytter øker glukose- og aminosyretransport over cellemembranen, samt omsetningen av glukose og laktat.

Oppgave B (Vekting; 20 %):

Pyruvat dehydrogenase katalyserer følgende reaksjon:



7. a) Bruk reguleringen av pyruvat dehydrogenasen som eksempel når du forklarer prinsippet for regulering av enzyms aktivitet ved fosforylering/defosforylering.
b) Angi hvordan allosteriske regulatormolekyler medvirker i reguleringen av enzymkompleksets aktivitet.
8. Beskriv og forklar hvordan glykogenmetabolismen i lever reguleres av glukagon/adrenalin.
9. Når aminosyrenes karbonskjeletter forbrukes, er syntese av urea også nødvendig. Begrunn utsagnet.
10. Hvilken rolle spiller enzymene aminortransferaser og glutamat dehydrogenase hva angår eliminering av kroppens nitrogenoverskudd? Beskriv og forklar.

Cytokinreseptoren aktiverer en Jak/Stat-mediert signalvei i lymfocytter. Denne signalveien kan være gjenstand for mutasjoner som fører til sykdommen B-celleprogenitor akutt lymfoblastisk leukemi (BCP-ALL).

Oppgave C (Vekting 10 %):

11. Vis (gjerne ved bruk av en figur) hva som skjer når et cytokin (f.eks. et interleukin) binder og aktiverer sin reseptor.
12. I noen pasienter med BCP-ALL er følgende kromosomavvik påvist: t(X;14)(p22;q32). Forklar hva betegnelsen beskriver.
13. Hos noen BCP-ALL pasienter har det blitt observert mutasjoner i genet *JAK2*. Forklar hvordan punktmutasjoner i dette genet kan få funksjonelle konsekvenser.
14. En frisk person er bærer av en translokasjon som er beskrevet slik: 45, XY, rob(14;22)(q10;q10). Forklar hva som skjer ved synapse (parring) i meiosen mellom de kromosomene som er involvert i translokasjonen, og hvilke gameter som kan bli dannet. Tegn gjerne en figur.

Replikasjon og transkripsjon av genomet i T-lymfocytter påvirkes av mange faktorer. Blant annet kan nevnes radioaktiv stråling og B-vitaminet folat.

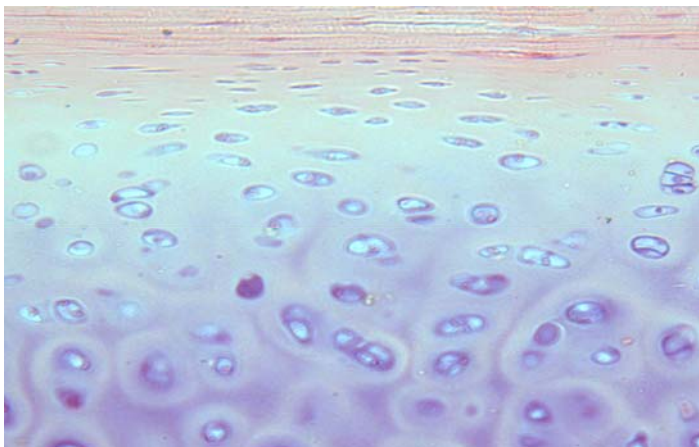
Oppgave D (Vekting 16 %):

15. Forklar hvordan folat påvirker purinsyntesen.
16. Hva er en pyrimidin-dimer, og hvordan blir den reparert?
17. Beskriv Northern blotting og forklar hva metoden brukes til.
18. Hvordan kan post-translasjonelle modifikasjoner av histoner påvirke transkripsjonen av gener?

Bloddannende stamceller celler fornyer seg kontinuerlig og kan differensiere til forskjellige modne blodceller. Slike stamceller kan også brukes i "cell engineering", eksempelvis til å lage chondrocytter som produserer bruskvev.

Oppgave E (Vekting 27 %):

19. Gjør rede for hovedtrinnene i replikasjonen av nukleært DNA i eukaryote celler.
20. Gjør rede for hovedtrinnene i replikasjonen av mitokondrielt DNA.
21. Beskriv kort ulike komponenter i ekstracellulær matriks (ECM). Angi en del ulike funksjoner av ECS i ulike vev.
22. Det er nå kjent at ulike celle-celle og celle-matriks kontakter ikke kun formidler adhesjon. Beskriv andre funksjoner slike kontakter kan ha.



Bildet til venstre viser et snitt fra ribbensbrusk farget med hematoksylin + eosin.

Forstørret bilde i farger: Se Vedlegg 1, side 5.

23. Det finnes to former for vekst i bruskvev. Hva heter de, og hva er forskjellene mellom dem.

24. Alt vi ser på snittet er bindevev. Øverst på figuren ses et område der den ekstracellulære matriksen farges rød, mens nederst ses et område der den farges blåilla. Forklarer disse forskjellene.

Lymfocytter er, som andre celler, gjenstand for endringer i DNA som kan føre til kreft. Blant annet er det ved akutt lymfoblastisk leukemi (ALL) påvist mutasjoner i genene som koder for CKIp16 og p53.

25. Hva slags endringer vil du anta er skjedd i nivået av de to genproduktene CKIp16 og p53 i kreftcellene? Begrunn svaret.

26. Gi eksempler på mutasjoner i proto-onkogener som kan overstyre restriksjonspunktet (R-punktet) i G1 av cellyklus.

27. Hvordan kan DNA-virus overstyre henholdsvis R-punktet i G1 og DNA skadeskjekkpunktet?

T-cellenes membraner inneholder spesielle transportører for laktat, noe som er viktig for cellenes pH-regulering. Videre har man oppdaget både Ca^{2+} -kanaler og K^+ -kanaler i den immunologiske synapsen (spalten mellom T-celler og antigen-presenterende celler).

Oppgave F (Vekting 9 %):

28. I kurset der vi studerte volumforandringer i røde blodceller observerte vi at celler plassert i en Ringer-acetat-løsning svullet hvis vi senket pH i løsningen. Eddiksyre ($pK_a=4,75$) foreligger nesten bare som acetat-ion ved nøytral pH. Gitt denne opplysningen, forklar hvorfor cellene svullet da pH ble senket?

Ionekanaler er ansvarlige for rask transport av ladete ioner gjennom cellulære membraner.

29. Beskriv de viktigste faktorene som bestemmer om ulike ioner passivt kan bli transportert gjennom sine spesifikke ionekanaler.

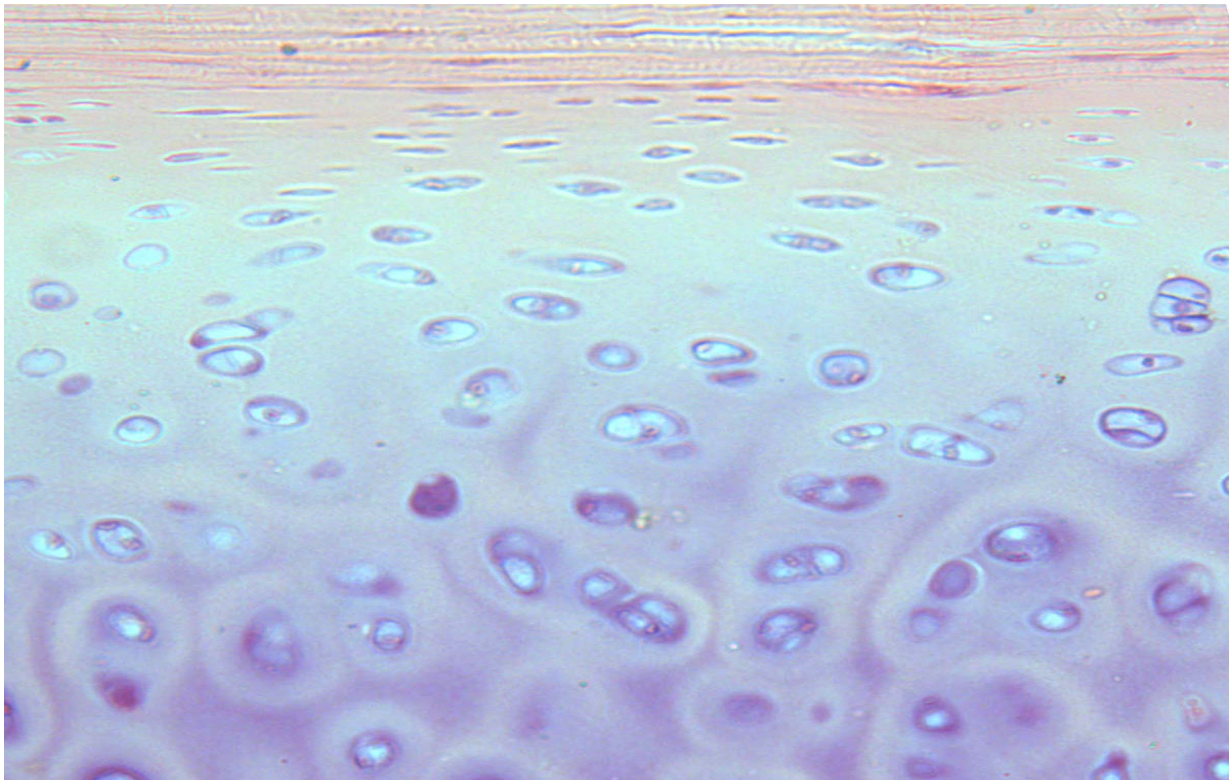
30. Sammenlign de molekylære mekanismene og de resulterende kinetikk-kurvene for membrantransport som foregår via ionekanaler med membrantransport som foregår via fasilisert diffusjon.

Det medisinske fakultet, Oslo, 12. juli, 2010

Jan O. Gordeladze
Signatur leder av eksamenskommissjon

Vedlegg 1.

Bildet under viser et snitt fra ribbensbrusk farget med hematoksylin + eosin.



Sensorveiledning til konte/utsatt prøve, MEDSEM/ODSEM/ERNSEM2 – vår 2010

Onsdag 11. august 2010, kl. 9.00-15.00

Oppgavesettet med svarskisser består av 16 sider

Viktige opplysninger:

Hjelpemidler: Norsk rettskrivningsordbok

Reseptor-tyrosinkinaser og cytokin-reseptorer er proteiner som er viktige signalveier for dannelsen av blodceller.

Oppgave A (Vekting; 18 %):

- 1. Hva slags signalmolekyler kan lede til aktivering av reseptor-tyrosinkinaser? Beskriv minst to signalveier som kan genereres nedstrøms for aktivering av reseptoren.**

Signalveier som kan genereres er:

a) MAPK kaskaden: Når en vekstfaktor, for eksempel PDGF, binder til sin reseptor vil reseptoren dimeriseres og reseptorens tyrosin-kinase domene aktivert. Reseptoren vil auto-kryssfosforyleres på flere seter. Ett av de fosforylerte setene binder et adaptorprotein Grb2 via dette proteinets SH2 domene. Grb2 bindes så til en GDP/GTP utbyttingsfaktor (SOS) som fører til at et lite G-protein (Ras) bytter ut GDP med GTP. Dette fører til aktivering av Ras proteinet som igjen aktiverer MAPKKK (RAF). Aktiv MAPKKK fosforylerer og aktiverer MAPKK (MEK) som igjen fosforylerer og aktiverer MAPK (ERK). Aktivert MAPK fosforylerer og aktiverer mange substrater, hvoriblant transkripsjonsfaktorer som er nødvendig for å føre cellen inn i cellyklus.

b) Fosfolipase C γ kan bindes til aktivert reseptor via sitt SH2-domene. Bindingen fører til aktivering av Fosfolipase C γ , som derved spalter fosfatidylinositol 4,5 bisfosfat til IP $_3$ og diacylglyserol. IP $_3$ bindes til IP $_3$ reseptoren i endoplasmatisk retikulum og åpner dette proteinets Ca $^{2+}$ -kanal slik at Ca $^{2+}$ strømmer ut i cytoplasma. Ca $^{2+}$ kan sammen med diacylglyserol aktivere PKC og sammen med kalmodulin aktivere flere enzymer (CaM-kinaser, NO-syntetase, Fosforylase kinase med flere).

c) Aktivert reseptor tyrosinkinase kan binde og aktivere PI3-kinase som i sin tur fosforylerer fosfatidylinositol 4,5 bisfosfat til fosfatidyl 3,4,5 trisfosfat. Dette fosfolipidet fungerer som bindingssete for to kinaser, PDK1 og Akt. Binding fører til at PDK1 blir aktivert og dette enzymet fosforylerer og aktiverer Akt som derved blir aktivert og dissosierer fra membranen. Akt fosforylerer og inaktiverer et apoptosefremmende protein Bad. Sistnevnte signalvei er forelest som "til orienterings stoff".

2. Hvordan kan signalet fra en aktivert reseptor-tyrosinkinase slås av?

Aktivert reseptor vil etter stund endocytteres. Både reseptor og ligand brytes så ned i lysosomer. Alternativt brytes liganden ned, mens reseptoren resykleres i defosforlyert tilstand tilbake til membranen. Avhengig av hvilken signalvei som ble aktivert, må også alle leddene i signalveien inaktiveres. Ras må for eksempel inaktiveres ved at GTP hydrolyseres til GDP, kinasene i MAPK kaskaden må inaktiveres ved hjelp av fosfataser osv.

Tyrosinkinase-reseptorer har følgende domener: ekstracellulære globulinlignende domener, et transmembrant domene og intracellulære tyrosinholdige domener.

3. Proteiners struktur kan deles inn i flere nivåer. Beskriv de ulike nivåene og forklar hva som bestemmer proteinenes endelige struktur.

Primærstruktur: Aminosyrer koplet sammen i kjede ved peptidbindinger (kovalente). Sekundærstruktur: Regulære arrangementer av polypeptidkjeden innen molekylet, f. eks α -heliks (spiralstruktur) og β -foldestruktur (bølgeblikk-lignende struktur der parallelle kjeder stabiliseres av H-bindinger mellom kjedene). Tertiærstruktur: Den 3-dimensjonale struktur av proteinet. Kan inneholde såkalte domener som kan foldes uavhengig av resten av molekylet. Kvaternærstruktur: To eller flere polypeptidkjeder koplet sammen (dimer, tetramer, oligomerer). Aminosyrenes sidekjeder er avgjørende for proteinets endelige struktur da de kan inngå i ulike bindinger, f. eks hydrogen-bindinger (Et proton danner en bro mellom to elektronegative atomer), Ionebindinger (Negativt ladet gruppe (COO^-) trekkes til positivt ladet gruppe (NH_3^+)), Hydrofobe interaksjoner (hydrofobe sidekjeders tendens til å tiltrekkes hverandre, f.eks., Ala, Val), Disulfidbindinger (mellom to CysSH), Van der Waalske krefter (Svake induktive bindinger som oppstår ved at elektronskyer polariserer hverandre), som påvirker polypeptidkjedens sekundær- og tertiærstruktur.

4. Hva slags reaksjoner katalyseres av en tyrosinkinase?

Tyrosinkinaser setter fosfat på en tyrosin-sidekjede i substratproteiner ved hjelp av ATP. Tyrosinkinaser: Generelt navn på enzymer som katalyserer reaksjoner hvor en fosfat-gruppe overføres fra et molekyl til en $-\text{OH}$ gruppe i aminosyren tyrosin på et annet molekyl.

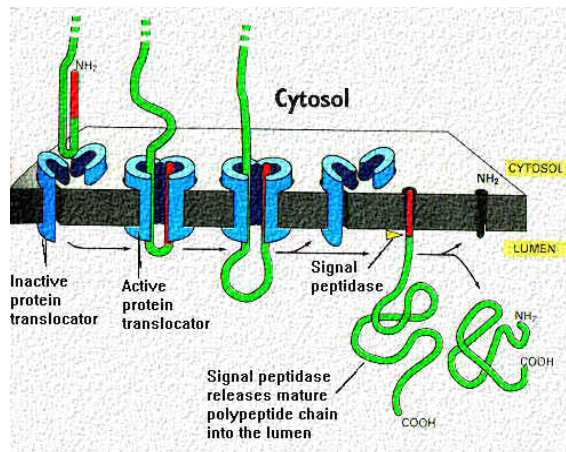
5. Beskriv kort hvordan man kan bestemme kinetikken til et enzym og hva parametrene V_{\max} og K_m beskriver?

Enzymkinetik = kvantitativ beskrivelse av enzymkatalyserte reaksjoner basert på hastighetsmålinger. Ved å måle produktdannelse per tidsenhet ved en gitt enzymkonsentrasjon som funksjon av substratkonsentrasjonen kan man ved hjelp av matematiske modeller (Michaelis' Menton og Linewaver-Burk likningene) beregne V_{\max} og K_m (Michaelis' konstant). Vanskelig å bestemme den [S] som gir maks enzym hastighet (V_{\max}) ut fra Michaelis' Menton kurven (v mot [S]). Plotter derfor $1/v$ mot $1/[S]$ (Linewaver-Burk) for lettere kunne bestemme V_{\max} og K_m . Skjæringspunktet med y-aksen = $1/V_{\max}$. Skjæringspunktet med x-aksen = $-1/K_m$.

V_{max} : hastigheten der enzymet er mettet med substrat. Jo høyere substrat konsentrasjon jo raskere reaksjon ved en gitt enzymkonsentrasjon, inntil et punkt = V_{max} . V_{max} -verdien er et uttrykk for antallet enzymer og turnover tallet (k_2); hvor raskt et enzym kan omsette et substrat ($V_{max} \cdot [\text{enzym}] = k_2$) (ofte ca 1000/sek) (range 1-10,000)

K_m (Michaelis' konstant): den substrat konsentrasjonen som gir halvparten av max hastighet. Lav K_m : substratet binder sterkt til enzymet. Høy K_m : svak binding av substrat til enzym

6. Forklar hvordan signalsekvenser i et proteins primærstruktur bestemmer proteinets plassering i en celle.



A signal peptide is a short (3-60 amino acids long) peptide chain that directs the transport of a protein. Signal peptides may also be called targeting signals, signal sequences, transit peptides, or localization signals.

There is some confusion relating to the precise meaning of the term 'signal peptide'. Some sources refer to signal peptides as only the pre-sequence that targets the propeptide to the endoplasmic reticulum and through the secretory pathway. Used in this system it does not refer to 'transit peptides'. A 'transit peptide' used in this system refers to

the part of the pre-sequence that targets the protein to other organelles, such as mitochondria, chloroplasts and apicoplasts.

The amino acid sequences of signal peptides direct proteins (which are synthesized in the cytosol) to certain organelles such as the nucleus, mitochondrial matrix, endoplasmic reticulum, chloroplast, apoplast and peroxisome. Some signal peptides are cleaved from the protein by *signal peptidase* after the proteins are transported.

Almost all proteins that are transported to the endoplasmic reticulum have a sequence consisting of 5-10 hydrophobic amino acids on the N-terminus.

The protein is guided to the ER by a signal-recognition particle (SRP), which moves between the ER and the cytoplasm. It binds to the signal peptide. The SRP binds to the signal peptide as soon as it is synthesized and extruded from the ribosome. This causes a pause in protein synthesis, most probably allowing the ribosome-SRP complex time to bind to the SRP receptor on the target ER membrane. The SRP is thought to be a regulatory GTP protein. Conformational changes may therefore lead to the SRP release. The protein may then be threaded through the ER membrane by a translocator pore.

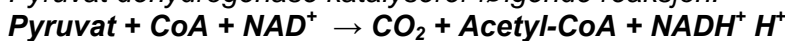
Most of these proteins are transported from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. If these proteins have a particular 4-amino-acid retention sequence, KDEL (lys-asn-glu-leu), on the C-terminus, they are retained in the endoplasmic reticulum or are routed back to the ER (in instances where they escape) via interaction with the KDEL receptor in the Golgi apparatus.

Bemerk: Studentene bør kunne vise kunnskap om signalpeptidet og at det har en delsekvens som bestemmer lokalisasjon til forskjellige organeller. Videre bør studentene ha nevnt SRP og signalpeptidasens funksjoner, samt ha beskrevet kort hvordan transportgangen av proteinet fra cytosol til organeller for å få bestått.

T-lymfocytter uttrykker insulinreseptorer når de blir aktivert *in vitro*. Insulin-binding til aktiverte T-lymfocytter øker glukose- og aminosyretransport over cellemembranen, samt omsetningen av glukose og laktat.

Oppgave B (Vekting; 20 %):

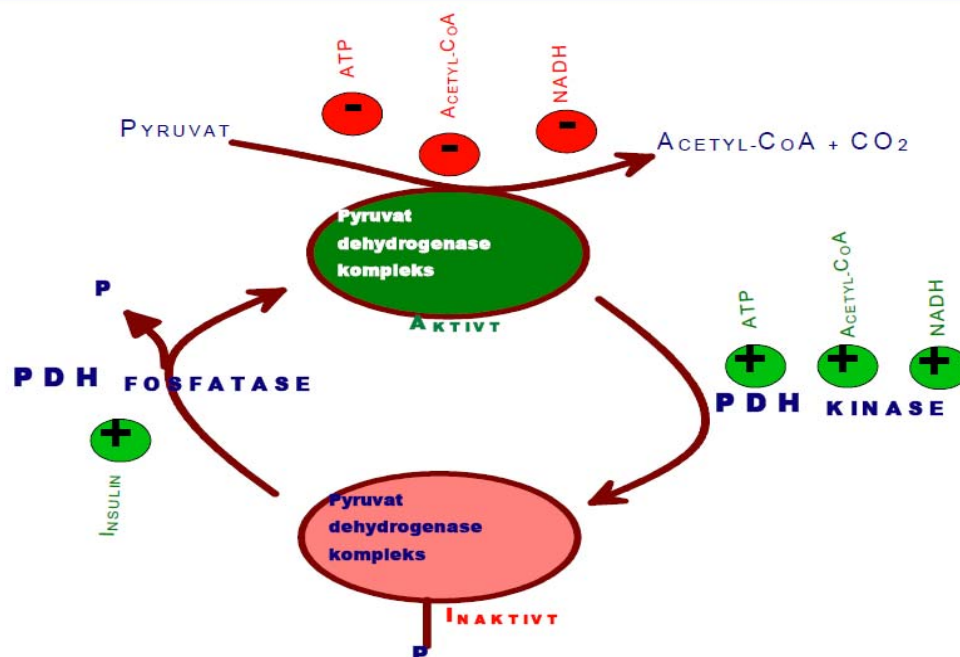
Pyruvat dehydrogenase katalyserer følgende reaksjon:



7. a) Bruk reguleringen av pyruvat dehydrogenasen som eksempel når du forklarer prinsippet for regulering av enzyms aktivitet ved fosforylering/defosforylering.
b) Angi hvordan allosteriske regulatormolekyler medvirker i reguleringen av enzymkompleksets aktivitet.

Figuren under angir momenter som forventes i korrekt svar.

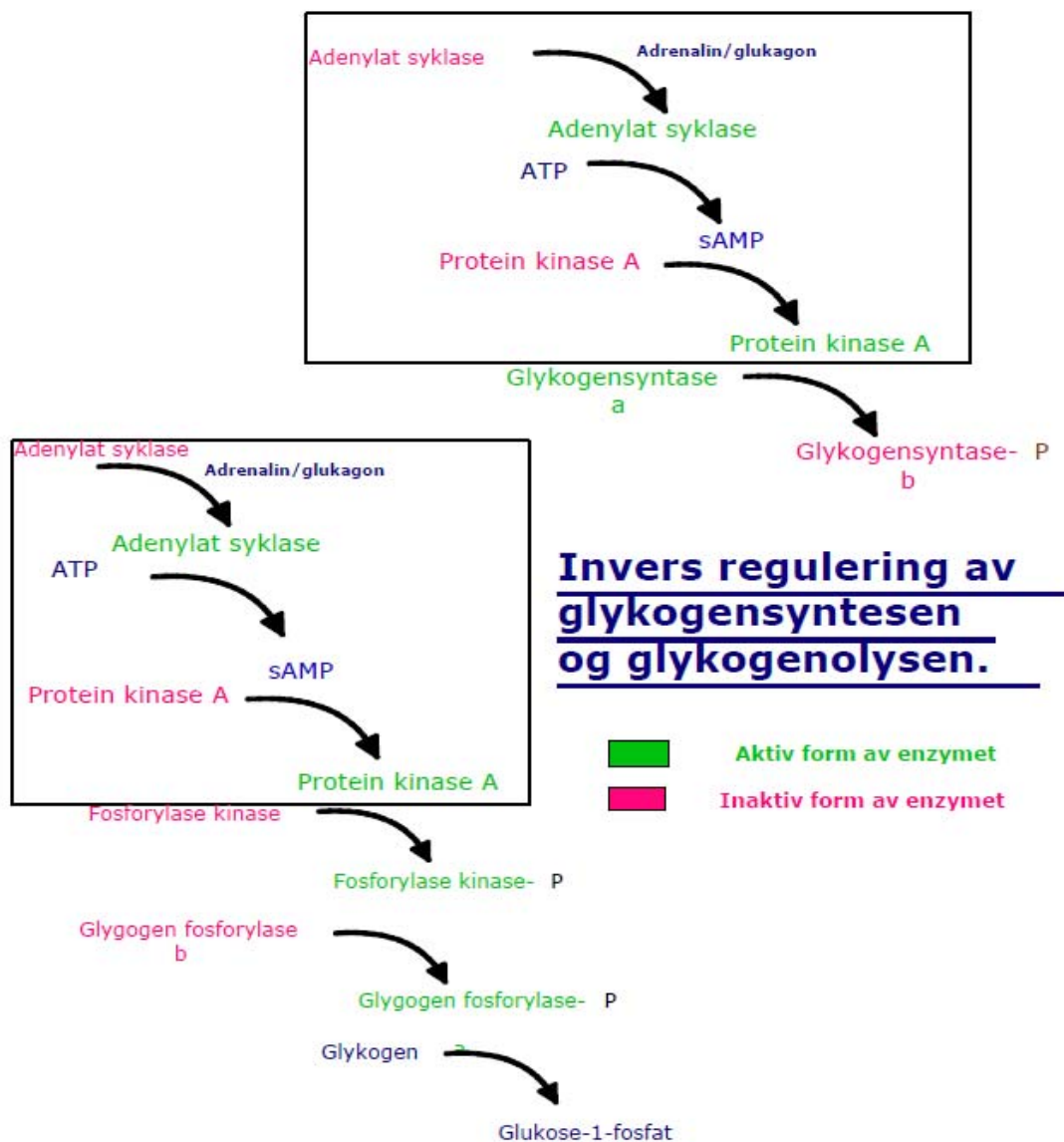
REGULERING AV PYRUVAT DEHYDROGENASEKOMPLEKSET



U NDER SULT ER DET MESTE AV **PDH**-KOMPLEKSET I INAKTIV FORM, **A** NDEL I AKTIV FORM VIL VÆRE ALLOSTERISK HEMMET AV **ACETYL-CoA**, **NADH** OG **ATP**

8. Beskriv og forklar hvordan glykogenmetabolismen i lever reguleres av glukagon/ adrenalin.

Invers regulering av syntese og degradering via en kaskademekanisme. Figuren angir relevante poeng i korrekt svar:

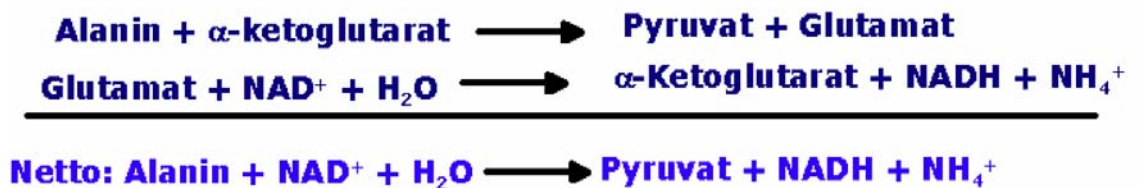


9. Når aminosyrenes karbonskjeletter forbrukes, er syntese av urea også nødvendig. Begrunn utsagnet.

Alle aminosyrer inneholder en eller flere aminogrupper. Skal en aminosyre kataboliseres må α -aminogruppen fjernes ved hjelp av en aminotransferase. Det oppstår derfor et nitrogenoverskudd, dvs. det vil foreligge aminogrupper som kroppen ikke har bruk for. Når mengden aminosyrer som forbrukes øker blir derfor nitrogenoverskuddet tilsvarende større. Overskudd av aminogrupper kan ende opp som NH_3 , som er toksisk. Overskudd av nitrogen må derfor omdannes til en ikke-toksisk metabolitt – urea. Følgelig øker ureasyntesen når forbruket av aminosyrenes karbonskjeletter øker.

10. Hvilken rolle spiller enzymene aminosyrettransferaser og glutamat dehydrogenase hva angår eliminering av kroppens nitrogenoverskudd? Beskriv og forklar.

De to enzymene har til sammen en sentral funksjon hva angår å sørge for at overskudd av nitrogen fra katabolismen av aminosyrer blir anvendt i syntesen av urea. Dette illustreres ved å se på summen av de to reaksjonene:



Aminosyrenes aminogruppe blir ved hjelp av disse to reaksjonene frigjort som NH_4^+ . Siden glutamat DH bare finnes i mitokondrienes matriks blir NH_4^+ nå bare dannet i mitokondriematriks. Her finnes også karbamoylfosfat syntetase, som er den innledende reaksjonen i urea syklus. Følgelig sørger disse to reaksjonene for at NH_4^+ bare frigjøres hvor NH_4^+ raskt kan bli detoksifisert.

De to reaksjonene blir derfor et metabolsk verktøy som sørger for at overskudd av aminogrupper trygt føres inn i ureasyntesen.

Cytokinreseptoren aktiverer en Jak/Stat-mediert signalvei i lymfocytter. Denne signalveien kan være gjenstand for mutasjoner som fører til sykdommen B-celleprogenitor akutt lymfoblastisk leukemi (BCP-ALL).

Oppgave C (Vekting 10 %):

11. Vis (gjærne ved bruk av en figur) hva som skjer når et cytokin (f.eks. et interleukin) binder og aktiverer sin reseptor.

Cytokin-reseptorer har ikke selv tyrosinkinase-aktivitet, men er assosiert med en tyrosinkinase (Jak) på innsiden av membranen. Når et cytokin bindes vil reseptoren dimerisere og to tyrosinkinase-molekyler vil kryssfosforylere og aktivere hverandre. Aktiverte Jak-molekyler vil først fosforylere de to reseptorsubenheterne på et spesifikt tyrosin. Til disse fosfotyrosinene bindes Stat via sitt SH2-domene, og blir deretter fosforylert.

12. I noen pasienter med BCP-ALL er følgende kromosomavvik påvist: $t(X;14)(p22;q32)$. Forklar hva betegnelsen beskriver.

Svar: Betegnelsen beskriver et translokasjonskromosom inneholdende materiale fra to ikke-homologe kromosomer, i dette tilfellet kromosom X og 14. Translokasjonsbruddpunktene er lokalisert i kromosombåndene Xp22 og 14q32. Dette kalles en resiprok translokasjon.

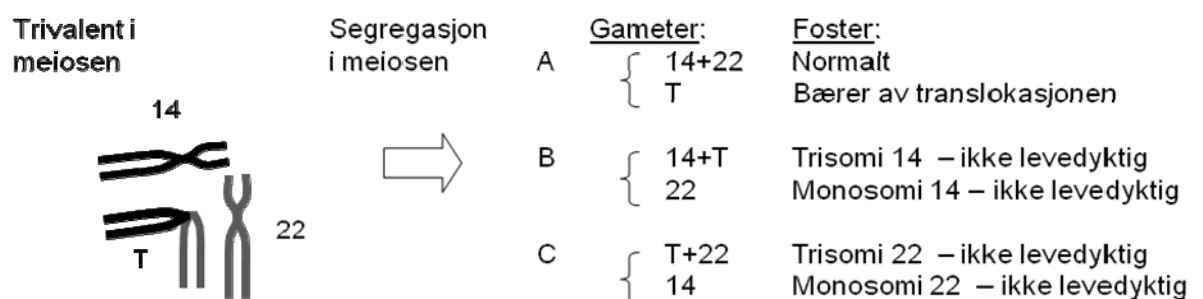
13. Hos noen BCP-ALL pasienter har det blitt observert mutasjoner i genet JAK2. Forklar hvordan punktmutasjoner i dette genet kan få funksjonelle konsekvenser.

Svar: Missense-mutasjon gir utskiftning av én aminosyre med en annen; ellers uendret aminosyresammensetning. Nonsense-mutasjon introduserer et for tidlig stoppkodon, som resulterer i et kortere protein. Rammeskift-mutasjoner vil gi endret primærsekvens fra det punktet mutasjonen er lokalisert og vil ofte i tillegg innføre et stoppkodon i den nye leserammen. 3bp delesjoner vil resultere i at én aminosyre mangler i produktet. Endret primærsekvens vil kunne påvirke proteinets funksjon.

Spleisesete-mutasjoner ødelegger et spleisesete og gjør at spleisingen ikke blir utført på korrekt måte. Resultatet kan være at sekvensen fra et ekson uteblir i det bearbejdede transkriptet (exon skipping). Alternativt kan transkriptet spleises ved et sete som har likhet med et spleiset (kryptiske spleiseseter). Spleising til slike seter innebærer ofte at intronsekvenser inkluderes i det ferdige mRNA. Fordi disse delene av transkriptet ofte inneholder stopp-kodoner, fører dette vanligvis til produksjon av et for kort protein. I tillegg kan mutasjoner i regulatoriske sekvenser påvirke mengden av genprodukt. Noen studenter vil også nevne at større delesjoner kan gi tap av f eks hele ekson eller hele gener.

14. En frisk person er bærer av en translokasjon som er beskrevet slik: 45, XY, rob(14;22)(q10;q10). Forklar hva som skjer ved synapse (parring) i meiosen mellom de kromosomene som er involvert i translokasjonen, og hvilke gameter som kan bli dannet. Tegn gjerne en figur.

Svar: Translokasjonskromosomet vil inngå i en trivalent i metafase I i meiosen slik det er oppsummert i figuren under. Etter segregasjon av de kromosomene som er involvert i translokasjonen vil de seks gametene i figuren bli dannet. I tillegg vil det forekomme 3:0 segregasjon av kromosomene. Konsekvensene for et foster, etter befruktning med en normal gamet, er også vist i figuren.



Replikasjon og transkripsjon av genomet i T-lymfocytter påvirkes av mange faktorer. Blant annet kan nevnes radioaktiv stråling og B-vitaminet folat.

Oppgave D (Vekting 16 %):

15. Forklar hvordan folat påvirker purinsyntesen.

Folat er et vitamin. Tetrahydrofolat er en bærer av en-karbon-fragmenter. Disse en-karbon-fragmentene får tetrahydrofolat fra aminosyrer og inkorporerer de i purinringen i forbindelse med syntese av purinnukleotider. Lave nivåer av folat vil redusere syntesen av purinnukleotider.

16. Hva er en pyrimidin-dimer, og hvordan blir den reparert?

En pyrimidin-dimer er en struktur hvor det er blitt dannet en kovalent binding mellom 2 naboliggende pyrimidiner (thymin og cytosin) i DNA. UV-lys katalyserer dannelsen av pyrimidin-dimerer. Disse pyrimidin-dimerene blir reparert ved at spesifikke endonukleaser gjenkjenner og fjerner området hvor skaden er; deretter vil DNA-polymerase og DNA-ligase fullføre reparasjonen.

17. Beskriv Northern blotting og forklar hva metoden brukes til.

Northern blotting er et RNA-blott der man ønsker å studere ekspresjon av et gen eller se på lengden av transkriptene.

Hovedtrinnene i Northern blotting:

1. Isolerer RNA fra celler.
2. RNA separeres etter størrelse ved gelelektroforese.
3. Etter elektroforesen blottes RNA over fra gelen til et filter, som binder RNA fast.
4. Tilsetter probe for det gen man ønsker å studere. Proben er merket enten radioaktivt eller med en luminiserende markør.
5. Filteret inkuberes med en følsom film, som deretter fremkalles. Plassering og intensitet av sverting forteller henholdsvis om transkriptets størrelse og mengde.

18. Hvordan kan post-translasjonelle modifikasjoner av histoner påvirke transkripsjonen av gener?

Den N-terminale enden av histoner kan gjennomgå flere typer post-translasjonelle modifikasjoner, blant annet kan lysiner bli acetylet og metylet. Studentene bør kunne nevne at acetylering av lysiner vil fjerne den positive ladningen til sidekjeden til lysin og dermed gjøre interaksjonen mellom histoner og DNA svakere. Dette gjør at DNA blir løsere pakket og lettere tilgjengelig for transkripsjonsregulering. Det forventes ikke at studentene skal kunne navnene på de involverte enzymene (histon-acetyltransferase, histon-deacetylase).

Bloddannende stamceller celler fornyer seg kontinuerlig og kan differensiere til forskjellige modne blodceller. Slike stamceller kan også brukes i "cell engineering", eksempelvis til å lage chondrocytter som produserer bruskvev.

Oppgave E (Vekting 27 %):

19. Gjør rede for hovedtrinnene i replikasjonen av nukleært DNA i eukaryote celler.

Følgende elementer bør være med i en besvarelse:

DNA-replikasjonen foregår i S-fasen av celledyklus

En rekke proteiner er med på å finne startstedene for replikasjonen og å initiere replikasjonen

DNA-helikaser og DNA-topoisomeraser

Multiple startsteder for replikasjonen

Replikasjonsgaffel

Leading strand og lagging strand

En kort RNA tråd lages og fungerer som primer for DNA-polymerasen

DNA-polymeraser katalyserer polymerisering i 5'- til 3'-retning

Okazaki-fragmenter på "lagging strand"

DNA-ligase

Korrekturlesning ved hjelp av 3'- til 5'-exonukleaseaktivitet

Endene av kromosomene replikeres ved hjelp av telomeraser

20. Gjør rede for hovedtrinnene i replikasjonen av mitokondrielt DNA.

Det finnes flere identiske kopier av mitokondrielt DNA i hvert mitokondrium.

Mitokondrielt DNA er sirkulært og replikasjonen starter på ett spesifikt sted.

DNA-replikasjonen av mitokondrielt DNA har mange felles trekk med DNA-replikasjonen i prokaryoter.

Følgende elementer bør videre være med i en besvarelse:

Replikasjonsgaffel

Leading strand og lagging strand

En kort RNA tråd lages og fungerer som primer for DNA-polymerasen

DNA-polymeraser katalyserer polymerisering i 5'- til 3'-retning

Okazaki-fragmenter på "lagging strand"

DNA-ligase

Korrekturlesning ved hjelp av 3'- til 5'-exonukleaseaktivitet

DNA-polymerasen som katalyserer replikasjonen av mitokondrielt DNA er forskjellig fra de DNA-polymerasene som katalyserer replikasjonen av nukleært DNA.

21. Beskriv kort ulike komponenter i ekstracellulær matriks (ECM). Angi en del ulike funksjoner av ECM i ulike vev.

In biology, the extracellular matrix (ECM) is the extracellular part of animal tissue that usually provides structural support to the animal cells in addition to performing various other important functions. The extracellular matrix is the defining feature of connective tissue in animals.

Extracellular matrix includes the interstitial matrix and the basement membrane. Interstitial matrix is present between various animal cells (i.e., in the intercellular spaces). Gels of polysaccharides and fibrous proteins fill the interstitial space and act as a compression buffer against the stress placed on the ECM. Basement membranes are sheet-like depositions of ECM on which various epithelial cells rest.

Due to its diverse nature and composition, the ECM can serve many functions, such as providing support and anchorage for cells, segregating tissues from one another, and regulating intercellular communication. The ECM regulates a cell's dynamic behavior. In addition, it sequesters a wide range of cellular growth factors, and acts as a local depot for them. Changes in physiological conditions can trigger protease activities that cause local release of such depots. This allows the rapid and local growth factor-mediated activation of cellular functions, without *de novo* synthesis.

Formation of the extracellular matrix is essential for processes like growth, wound healing and fibrosis. An understanding of ECM structure and composition also helps in comprehending the complex dynamics of tumor invasion and metastasis in cancer biology as metastasis often involves the destruction of extracellular matrix by enzymes such as serine and threonine proteases and matrix metalloproteinase.

Components of the ECM are produced intracellularly by resident cells, and secreted into the ECM via exocytosis. Once secreted, they then aggregate with the existing matrix. The ECM is composed of an interlocking mesh of fibrous proteins and glycosaminoglycans (GAGs).

Proteoglycans

GAGs are carbohydrate polymers and are usually attached to extracellular matrix proteins to form proteoglycans (hyaluronic acid is a notable exception, see below). Proteoglycans have a net negative charge that attracts water molecules, keeping the ECM and resident cells hydrated. Proteoglycans may also help to trap and store growth factors within the ECM.

Described below are the different types of proteoglycan found within the extracellular matrix.

Heparan sulfate

Heparan sulfate (HS) is a linear polysaccharide found in all animal tissues. It occurs as a proteoglycan (PG) in which two or three HS chains are attached in close proximity to cell surface or extracellular matrix proteins. It is in this form that HS binds to a variety of protein ligands and regulates a wide variety of biological activities, including developmental processes, angiogenesis, blood coagulation and tumour metastasis.

In the extracellular matrix, especially basement membranes, the multi-domain proteins perlecan, agrin and collagen XVIII are the main proteins to which heparan sulfate is attached.

Chondroitin sulfate

Chondroitin sulfates contribute to the tensile strength of cartilage, tendons, ligaments and walls of the aorta. They have also been known to affect neuroplasticity.

Keratan sulfate

Keratan sulfates have a variable sulfate content and unlike many other GAGs, do not contain uronic acid. They are present in the cornea, cartilage, bones and the horns of animals.

Non-proteoglycan polysaccharide

Hyaluronic acid

Hyaluronic acid (or "hyaluronan") is a polysaccharide consisting of alternative residues of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine, and unlike other GAGs is not found as a proteoglycan. Hyaluronic acid in the extracellular space confers upon tissues the ability to resist compression by providing a counteracting turgor (swelling) force by absorbing significant amounts of water. Hyaluronic acid is thus found in abundance in the ECM of load-bearing joints. It is also a chief component of the interstitial gel. Hyaluronic acid is found on the inner surface of the cell membrane and is translocated out of the cell during biosynthesis.^[8]

Hyaluronic acid acts as an environmental cue that regulates cell behavior during embryonic development, healing processes, inflammation and tumor development. It interacts with a specific transmembrane receptor, CD44.

Fibers

Collagen

Collagens are, in most animals, the most abundant protein in the ECM. In fact, collagen is the most abundant protein in the human body^{[10][11]} and accounts for 90% of bone matrix protein content.^[12] Collagens are present in the ECM as fibrillar proteins and give structural support to resident cells. Collagen is exocytosed in precursor form (procollagen), which is then cleaved by procollagen proteases to allow extracellular assembly. Diseases such as osteogenesis imperfecta and epidermolysis bullosa are linked with genetic defects in collagen-encoding genes. The collagen can be divided into several families according to the types of structure they form:

1. Fibrillar (Type I,II,III,V,XI)
2. Facit (Type IX,XII,XIV)
3. Short chain (Type VIII,X)
4. Basement membrane (Type IV)
5. Other (Type VI,VII, XIII)

Elastin

Elastins, in contrast to collagens, give elasticity to tissues, allowing them to stretch when needed and then return to their original state. This is useful in blood vessels, the lungs, in skin, and the ligamentum nuchae, and these tissues contain high amounts of elastins. Elastins are synthesized by fibroblasts and smooth muscle cells. Elastins are highly insoluble, and tropoelastins are secreted inside a chaperone molecule, which releases the precursor molecule upon contact with a fiber of mature elastin. Tropoelastins are then deaminated to become incorporated into the elastin strand. Diseases such as cutis laxa and Williams syndrome are associated with deficient or absent elastin fibers in the ECM.

Other

Fibronectin

Fibronectins are proteins that connect cells with collagen fibers in the ECM, allowing cells to move through the ECM. Fibronectins bind collagen and cell surface integrins, causing a reorganization of the cell's cytoskeleton and facilitating cell movement. Fibronectins are secreted by cells in an unfolded, inactive form. Binding to integrins unfolds fibronectin molecules, allowing them to form dimers so that they can function properly. Fibronectins

also help at the site of tissue injury by binding to platelets during blood clotting and facilitating cell movement to the affected area during wound healing.

Laminin

Laminins are proteins found in the basal laminae of virtually all animals. Rather than forming collagen-like fibers, laminins form networks of web-like structures that resist tensile forces in the basal lamina. They also assist in cell adhesion. Laminins bind other ECM components such as collagens, nidogens, and entactins.

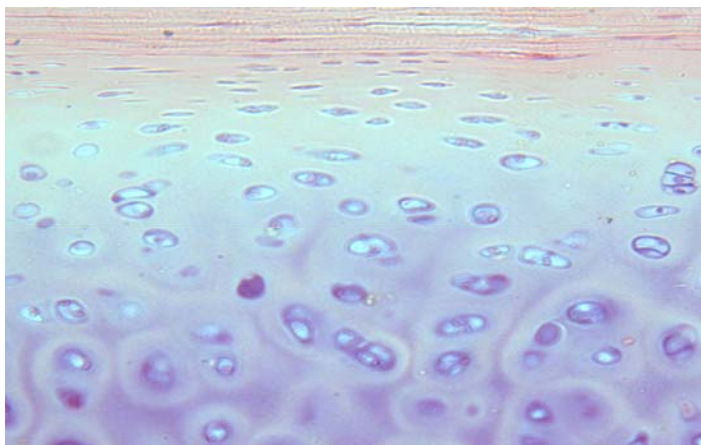
Bemerk: Studentene bør kunne nevne og beskrive komponenter som: proteoglykaner (GAGs), kondroitin-sulfat, hyaluronsyre og diverse kollagener, samt elastin, fibronektin og laminin, og nevne de vev som inneholder dem og deres hoverfunksjon hva gjelder struktur for å få 100 % score på denne oppgaven.

22. Det er nå kjent at ulike celle-celle og celle-matriks kontakter ikke kun formidler adhesjon. Beskriv andre funksjoner slike kontakter kan ha.

En rekke funksjoner som: kompresjonsbuffer, støtte og forankring for celler, adskillelse av vev fra hverandre, regulering av intercellulær kommunikasjon, sekvestrering ("lagring") av vekstfaktorer (eksempelvis TGF β i benvev), vekst og sårtilheling, utvikling av vev på fosterstadiet, angiogenese, blodkoagulasjon, innflytelse på metastasering av cancere, markør for strekkstyrke av bindevev (eksempelvis ligamenter og aortavegg), interaksjon med cytoskjelettet m.m., er nevnt ovenfor og det er nødvendig at studentene kan angi minst 4-5 av disse for å få bestått.

Studenten skal kunne nevne noen av disse fenomenene for å kunne få bestått. Noen studenter vil kanskje komme inn på mekanostimulering av vev hvis ECM bidrar til å aktivere intracellulær signalering som: tyrosinkinase-kaskaden, Jak/Stat-mediert signalering, G-protein-mediert signalering og åpning av Ca²⁺-kanaler i cellemembranen.

Det vil kanskje være en del studenter som ønsker å besvare oppgave 21 og 22 under ett, og det er ikke urimelig at så skjer. Oppgavene kan da bedømmes sammen.



Bildet til venstre viser et snitt fra ribbensbrusk farget med hematoksylin + eosin.

Forstørret bilde i farger: Se Vedlegg 1, side 16.

23. Det finnes to former for vekst i bruskvev. Hva heter de, og hva er forskjellene mellom dem.

Interstitiell og apposisjonell vekst.

Interstitiell vekst skjer inn i vevet ved deling av chondrocytter. Den er hovedform for vekst i brusk hos fosteret.

Apposisjonell vekst skjer på overflaten av brusk, og skjer ved differensiering av fibroblast-lignende celler i perikondrium til chondroblaster og så chondrocytter. Den er hovedform for vekst i brusk etter fødsel.

24. Alt vi ser på snittet er bindevev. Øverst på figuren ses et område der den ekstracellulære matriksen farges rød, mens nederst ses et område der den farges blå. Forklarer disse forskjellene.

Øverst har vi perikondrium. ECM her består av stort sett kollagenfibre som er positivt ladde (lysinrik protein) og derfor binder til eosin (rød). Inn i selv brusket har vi veldig mange proteoglykanaggregater. Disse er negativt ladde (særlig rik i sulfaterte polysakkarider) og derfor binder til hematoksylin (blå).

Lymfocytter er, som andre celler, gjenstand for endringer i DNA som kan føre til kreft. Blant annet er det ved akutt lymfoblastisk leukemi (ALL) påvist mutasjoner i genene som koder for CKIp16 og p53.

25. Hva slags endringer vil du anta er skjedd i nivået av de to genproduktene CKIp16 og p53 i kreftcellene? Begrunn svaret.

Både CKI p16 og p53 er tumor-suppressorgener. For å bidra til kreftutvikling må nivået av disse reduseres.

26. Gi eksempler på mutasjoner i proto-onkogener som kan overstyre restriksjonspunktet (R-punktet) i G1 av celledyklusen.

Mutasjoner i proto-onkogener som kan overstyre R-punktet i G1 er mutasjoner som direkte eller indirekte gir økt aktivering av celledyklusmaskineriet. Eksempler på mutasjoner som direkte aktiverer celledyklusmaskineriet er økt antall kopier av gener for cycliner, CDKer og E2F.

R-punktet kan også overstyres ved mutasjoner i proto-onkogener som indirekte aktiverer

cellesyklusmaskineriet. Myc er en transkripsjonsfaktor for cdc25, en fosfatase som aktiverer CDKer. Ved mutasjoner i Myc (økt antall kopi av genet, eller ved 8;14-translokasjon) vil det bli økt nivå av cdc25, og CDKene blir aktive. Punktmutasjoner som hindrer at Ras skrues av vil også kunne overstyre R-punktet. Dette vil resultere i at Ras kontinuerlig aktiverer MAP-kinasene, noe som i sin tur indirekte vil kunne øke nivået av cykliner, hemme nivået av CKlene eller føre til aktiverende fosforylering av CDKer. Studenter som også nevner at mutasjoner i proto-onkogener som koder for vekstfaktorer, vekstfaktor-reseptorer og andre proteiner langs de normale signalveiene også kan bidra til å overstyre R-punktet, vil få et pluss.

27. Hvordan kan DNA-virus overstyre henholdsvis R-punktet i G1 og DNA skadesjekkpunktet?

DNA virus har ofte gener som koder for proteiner som inaktiverer vertcellens tumor suppressorgener. Eksempel er HPV som koder for E6 og E7. E6 binder i "lommen" til pRB og vil dermed føre til kontinuerlig frigjøring av E2F. Dette resulterer i at R-punktet i G1 passerer uten behov for vekstfaktorer. E7 binder til p53 og fører til destabilisering av proteinet. Dermed vil DNA-skade ikke kunne føre til stabilisering/aktivering av p53, og p53 vil ikke kunne transkribere sine målgener. Cellens DNA-skade sjekkpunkt er dermed overstyrt.

T-cellenes membraner inneholder spesielle transportører for laktat, noe som er viktig for cellenes pH-regulering. Videre har man oppdaget både Ca^{2+} -kanaler og K^+ -kanaler i den immunologiske synapsen (spalten mellom T-celler og antigen-presenterende celler).

Oppgave F (Vekting 9 %):

28. I kurset der vi studerte volumforandringer i røde blodceller observerte vi at celler plassert i en Ringer-acetat-løsning svullet hvis vi senket pH i løsningen. Eddiksyre ($pK_a=4,75$) foreligger nesten bare som acetat-ion ved nøytral pH. Gitt denne opplysningen, forklar hvorfor cellene svullet da pH ble senket?

En syre HA som har en pK_a -verdi på rundt 5 (syrekonstanten for dissosiasjonslikevekten er på 10^{-5}) vil være 50 % dissosiert ved $pH = 5$. Ved å øke pH til 7, vil konsentrasjonen av A^- øke til nesten 100 %. Udissosiert eddiksyre er fettløselig og vil penetrere cellemembraner. Ved å senke pH i en Ringer-acetat-løsning vil man overføre mer acetat til udissosiert eddiksyre og dermed øke fluxen av eddiksyre inn i røde blodceller. Pga loven om osmose, vil vann følge med og de røde blodcellene vil svulle.

Ionekanaler er ansvarlige for rask transport av ladete ioner gjennom cellulære membraner.

29. Beskriv de viktigste faktorene som bestemmer om ulike ioner passivt kan bli transportert gjennom sine spesifikke ionekanaler.

Bestemmende egenskaper er ionenes størrelse og ladning (med deres assosierte vannkapper rundt), samt elektrokjemiske gradient (ladningsforskjell, positive vs. negative ioner og relevante kjemiske konsentrasjonsgradienter). Bruk av Nernsts ligning er et pluss (for et monovalent ion X: $V_m = -61 \log_{10} [X_{\text{cytoplasma}}] / [X_{\text{utside}}]$).

30. Sammenlign de molekylære mekanismene og de resulterende kinetikk-kurvene for membrantransport som foregår via ionekanaler med membrantransport som foregår via fasilitert diffusjon.

Ionekanaltransport foregår som fri diffusjon via vannfylte porer i membranen, dette gir en kinetikk som viser en lineær avhengighet av tid og konsentrasjonsgradient for ionet som skal transporteres. - Transport via fasilitert diffusjon foregår derimot ved at forbindelsen som skal transporteres bindes på en side av membranen til et spesielt område (bindingssete) på et transportørprotein. Dette proteinets konformasjon endres og forbindelsen overføres derved til den andre siden av membranen før forbindelsen tilslutt frigjøres fra transportøren. Denne transporten vil vise metningskinetikk, med transportmaksimum og affinitet ($1/K_m$) slik de tilsvarende defineres i Michaelis-Mentens enzymkinetikk.

Det medisinske fakultet, Oslo, 12. juli, 2010



Signatur leder av eksamenskommissjon

Vedlegg 1.

Bildet under viser et snitt fra ribbensbrusk farget med hematoksylin + eosin.

