Eksamensopgaver i Biokemi
Januar 2002-

MR Forlag

De Medicinstuderendes Faglige Forlag
Medicinerhuset - Ole Worms allé
Bygning 161 - 8000 Århus C
Tlf.:89422811; Fax:86137225
e: mr@studmed.au.dk
URL: http://www.studmed.au.dk/mr

Eksamen i biokemi januar 2002

Essayopgave: ***Fedtopløselige vitaminer***

Besvarelsen skal indeholde:

1. En angivelse af vigtige næringskilder for de enkelte vitaminer samt en redegørelse for deres optagelse, transport og metabolisme.

2. En beskrivelse af vitaminernes funktion i organismen og af eventuelle mangelsymptomer samt forhold, der eventuelt kan disponere til udvikling heraf.

3. En vurdering af risici for overdosering og en beskrivelse af eventuelle symptomer herpå.

Forslag til besvarelse

Ad 1. De fedtopløselige vitaminer omfatter A-, D-, E- og K-vitaminer. Vigtige næringskilder for:
vitamin A er lever, æg, smør og mælk, samt grønne og gule grøntsager (β-caroten),
vitamin D er fede fisk, æg, fedtstoffer og kød,
vitamin E er vegetabilske olier, nødder, linser og bønner,
vitamin K er alle grøntsager og kød
Vitamin A aktive næringsstoffer er retinol og retinylpalmitat i animalsk føde samt carotener i grøntsager. Retinylpalmitat hydrolyseres i tarmkanalen til retinol og palmitat. Retinoler og carotener bindes til blandingsmiceller, hvorfra de diffunderer ind i tarmepithelcellerne. I tarmen omdannes carotener til retinol, evt. til retinsyre (retinoic acid). Retinol esterificeres med palmitat og transporteres til leveren med chylomikroner. I leveren kan retinylpalmitat deponeres eller atter spaltes, hvorefter retinol transporteres i plasma bundet til et specifikt protein (serum retinol binding protein).

Vitamin D aktive næringsstoffer er ergocalciferol (vegetabilsk oprindelse) og cholecalciferol (animalsk oprindelse). De optages fra tarmen sammen med kostens øvrige lipider og transporteres til leveren med chylomikroner. Cholecalciferol kan desuden syntetiseres i organismen ud fra cholesterol, idet cholesterol i leveren omdannes til 7-dehydrocholesterol, der ved påvirkning af ultraviolet lys i huden omdannes til cholecalciferol. Det er således kun ved utilstrækkelig eksposition for sollys, at der er behov for en egentlig tilførsel af D-vitamin med kosten. I leveren, der samtidig fungerer som depot for D-vitamin, hydroxyleres cholecalciferol til 25(OH)cholecalciferol. Sidstnævnte transporteres med blodet bundet til vitamin-D bindende protein til nyrerne, hvor der sker en hydroxylering i stilling 1 med dannelse af 1,25$(OH)_2$ cholecalciferol, den mest aktive form af D-vitamin. Processen katalyseres af 1α-hydroxylase, hvis aktivitet reguleres af parathyreoideahormon, fosfatkoncentrationen i plasma og produktet selv. Processen er samtidig det hastighedsbegrænsende trin i syntesen af 1,25$(OH)_2$ cholecalciferol.

Vitamin E aktive næringsstoffer udgøres af en blanding af såkaldte tocoferoler. De absorberes sammen med kostens øvrige lipider og transporteres i organismen bundet til lipoproteiner.

Vitamin K findes som nævnt i grøntsager og kød, men normalt dækkes behovet for vitamin K ved mikrobiel syntese i tarmen. Absorptionen sker sammen med de øvrige lipider, hvorefter K-vitaminerne deponeres, hovedsageligt i leveren.

Ad 2. *Vitamin A's funktioner*: mest kendt er retinols rolle i synsprocessen, hvor de vigtigste trin er en række cis-trans isomeriseringer og redoxprocesser. Endvidere er vitamin A-derivater nødvendige for den normale vækst og differentiering af epithelvæv og for opretholdelsen af normalt fungerende epithelvæv. Desuden er det for nylig påvist, at β-carotener spiller en rolle som antioxidanter. På basis af ovennævnte funktioner er det derfor forståeligt, at der optræder en række symptomer på vitamin A mangel, bl.a.:

1) nedsat syn i tusmørke, populært kaldet "natteblindhed",
2) epithelcelleforandringer i form af hyperkeratinisering med tørre og vulnerable slimhinder, der giver øget infektionsrisiko. Svær vitamin A mangel fører til progressiv keratinisering af cornea med blindhed til følge. I den vestlige verden ses vitamin A mangel sjældent, og kun i tilfælde af lipidmalabsorption og leversygdomme.

Vitamin D's funktioner: den aktive form af vitamin D, 1,25$(OH)_2$cholecalciferol, regulerer koncentrationen af ioniseret Ca^{2+} i ECV sammen med parathyreoideahormon (PTH). Ved lav [Ca^{2+}] i ECV stimulerer PTH syntesen af 1,25$(OH)_2$cholecalciferol ved at stimulere 1α-hydroxylasen. 1,25$(OH)_2$-cholecalciferol fremmer syntesen af calciumtransporterende proteiner i tyndtarmen og øger dermed kapaciteten for absorption af Ca^{2+} og fosfat. I knoglevæv virker 1,25$(OH)_2$cholecalciferol og PTH synergistisk med henblik på at fremme resorptionen af knoglevæv (demineraliseringen) og øger dermed afgiften af Ca^{2+} og fosfat til blodet.

Ved mangel på vitamin D ses tendens til hypocalcæmi og nedsat mineralisering af knoglevæv, hos børn kaldes tilstanden rachitis og er karakteriseret ved knogledeformiteter, hos voksne kaldes tilstanden osteomalaci, der medfører risiko for spontanfrakturer. Tilstanden medfører udvikling af sekundær hyperparathyreoidisme (forøget PTH), hvorfor serum [Ca^{2+}] kan være næsten normal, mens demineraliseringen af knoglevæv fortsat er udtalt.

På grund af kroppens egen syntese af vitamin D og på grund af kostens indhold af vitaminet ses mangelsymptomer sjældent her i landet. Kun ved insufficient kost (ældre, streng vegetabilsk kost, alkoholikere) især i forbindelse med ringe udsættelse for sollys kan mangelsympomer optræde. Sidstnævnte gælder især indvandrere, der bærer traditionel klædedragt. Endelig har gravide, ammende kvinder og børn et øget behov.

Vitamin E's funktioner: tocoferolernes hovedfunktion er at virke som antioxidanter ved en række processer, hvor de forhindrer kaskadiske radikalreaktioner, f.eks. i forbindelse med polyumættede fedtsyrer i cellemembraner. Der ses ikke vitamin E mangel hos mennesker bortset fra tilfælde af hæmolytisk anæmi hos gravide og præmature børn, der indtager en E-vitaminfattig kost.

Vitamin K's funktioner: K-vitamin fungerer som cofaktor ved den posttranslatoriske carboxylering af visse glutamatsidekæder i forstadier til en række koagulationsfaktorer (faktor II, VII, IX, X, protein S og protein C) i leveren. Herved skabes der mulighed for binding via Ca^{2+} til fosfatidylserin på overfladen af aktiverede thrombocytter, og dermed en opkoncentrering af koagulationsfaktorerne ved læsionsstedet. Som nævnt dækkes behovet for vitamin K ved mikrobiel syntese i tarmen, hvorfor man ikke ser kostbetinget mangel på vitamin K. Kun hos patienter med lipidmalabsorption og/eller leversygdomme og hos nyfødte (steril tarm) ses symptomer på vitamin K mangel, der viser sig som forlænget blødningstid (= forlænget prothrombintid).

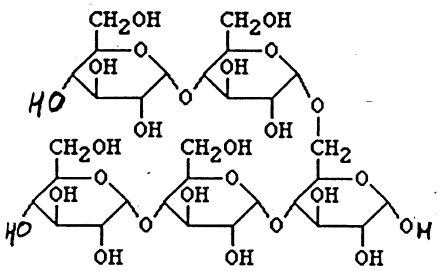
Ad 3. Der er ikke blevet rapporteret forgiftningssymptomer ved overdosering af vitamin E og K. Kun for vitamin A's og D's vedkommende er der risiko for overdosering og kun ved indtagelse af store mængder vitamin A og D præparater gennem længere tid (hvem

spiser store mængder isbjørnelever hver dag?). Symptomer på vitamin A forgiftning er bl.a. kvalme, opkastning, diarré, led- og knoglesmerter og evt. kronisk leversygdom. Symptomer på vitamin D forgiftning er betinget af den resulterende hypercalcæmi som følge af den forøgede absorption i tarmkanalen og den forstærkede knogleresorption og viser sig som kvalme, opkastning, diarré, men - mest alvorligt - som metastatiske Ca-aflejringer i form af nyresten og forkalkninger i karvægge og ligamenter.

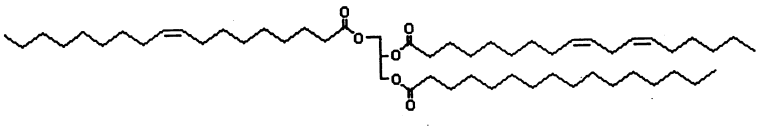
Kortsvarsopgaver

1. Beskriv fordøjelsen af de nedenfor anførte fødeemner, herunder med angivelse af hvor og hvordan absorptionen finder sted i fordøjelsessystemet.

a. Fragment af stivelse



b. En triacylglycerol



Svar:

Ad a. *Spytamylase og pancreasamylase* katalyserer hydrolysen af alfa 1-4 glycosidbindinger (men ikke alfa 1-6 bindinger) i stivelse, og ovennævnte fragment vil således kunne blive spaltet til glucose, maltose, maltotriose og forgrenet glucoseoligomer (alfa-dextriner). Spytamylasens biologiske betydning er dog ringe. Den videre spaltning af hydrolyseprodukterne katalyseres af enzymer i tyndtarmens mikrovilli idet maltosen spaltes af *maltase (disaccaridase, alfa-glucosidase)* og alfa-dextrin (forgrenet glucoseoligomer) spaltes af *isomaltase (alfa-dextrinaser)* der både spalter alfa 1-4 og alfa 1-6 bindinger. De omtalte enzymer katalyserer tilsammen omdannelsen af stivelsesfragmentet til glucose.

Ad b. Triacylglycerolets fordøjelse omfatter hydrolyse katalyseret af *spyt-*, *ventrikel-* og kvantitativt primært *pancreas lipase*. Der foregår en emulgering i ventriklen, hvor syrestabil lipase katalyserer hydrolyse af en del af triacylglycerol til monoacylglycerol (C-2 position) og fedtsyrer. I duodenum tilføres galdesalte, der med sin amfifile natur emulgerer triacylglycerol yderligere, således at galdelipasen sammen med colipase katalyserer hydrolyse af resterende triacylglycerol til en blanding af monoacylglycerol (C-2 position), glycerol og fedtsyrer. Hydrolyseprodukterne danner blandingsmiceller med galdesaltene, der muliggør diffusion af hydrolyseprodukterne over den luminale

plasmamembran i tyndtarmen (jejunum) hvor der kan ske en reesterifikation af hydrolyseprodukterne. Transporten af lipid fra tarmepithelcellerne sker ved exocytose af vandopløselige molekylaggregater kaldet chylomikroner. Galdesaltene absorberes i ileum og returneres til leveren (entero-hepatiske kredsløb).

2.a. Forklar, hvorfor linolensyre regnes for en essentiel kostfaktor.

b. Angiv to typer farmaka, der kan reducere syntesen af thromboxaner og forklar deres virkemåde.

c. Giv en mulig forklaring på, at en kost rig på linolensyre - eller C-20:5 fedtsyren med den for linolensyre karakteristiske placering af dobbeltbindinger regnet fra den terminale CH_3-gruppe - kan nedsætte tendensen til aggregation af blodplader.

Svar:

Ad a. Humane enzymer kan ikke introducere de dobbeltbindinger, der karakteriserer dannelsen af n-6 og n-3 langkædede fedtsyrer (det drejer sig om dobbeltbindinger udover C10 regnet fra COOH). Det gælder således for linolensyre, der er en n-3 fedtsyre. Linolensyre (C-18:3) eller C-20:5 (eicosapentaensyre, EPA) er forstadier til en nødvendig serie eicosanoider (3-serie).

Ad b. Non-steroide antiinflammatoriske droger (NSAID), f.eks. acetylsalisylsyre, hæmmer cyclooxygenase irreversibelt (oftest både COX-1 og COX-2) og dermed syntesen af thromboxaner og prostaglandiner. Glucocorticoider hæmmer phospholipase A_2 aktivitet og dermed dannelse af substrat for cyclooxygenasen.

Ad c. Arachidonsyre (C-20:4, n-6) er normalt det dominerende substrat for dannelse af eicosanoider (2-serien). Det hertil svarende thromboxan, TXA2, virker kraftigt plade-aggregerende og vasokonstriktorisk. Man kan forestille sig, at thromboxan deriveret fra C-20:5, n-3, virker mindre aggregatorisk. Tilsvarende kan man forestille sig, at prostacyclin PGI3 er en mere effektiv inhibitor af aggregering end PGI2.

Det i parentes angivne forlanges ikke.

3. Under langvarig faste baseres energiproduktionen i stort omfang på forbrænding af fedtsyrer, mens forbrænding af sukker begrænses og i det væsentlige reserveres ganske bestemte væv.

a. I hvilke væv spiller omsætningen af sukker fortsat en betydelig eller afgørende rolle selv under faste?

b. Forklar hvordan en betydelig øget β-oxidation, via reaktionsprodukter i mitochondrierne, kan virke hæmmende på glykolysen.

Svar:

Ad a. Erythrocytter og hjernevæv.

Ad b. Forbrænding af fedtsyrer medfører en stigning i mitochondriernes indhold af acetyl-CoA.

Acetyl-CoA virker hæmmende på *pyruvat dehydrogenasen* og forårsager samtidig en stigning i koncentrationen af *citrat* via kondensering med oxaloacetat. En øget koncentration af cytosolær citrat hæmmer fosfofruktokinasen hvorfor G6F/F6F ophobes hvilket igen medfører nedsat fosforylering af glucose. Resultatet er et fald i såvel forbrug som optag af glucose.

4.a. En person udvikler spontant en høj egen produktion af et antistof mod TSH receptoren. Angiv hvilke teoretiske virkninger det kan have på gld. thyroidea, den basale energiomsætning, hypofysen og hypothalamus.

b. Tyrosinrester i thyroglobin molekylet er udgangspunkt for syntesen af T3 og T4. Syntesen er kun delvis effektiv så i thyroidea-follikellumen vil kun ca. 3 mol T4 og 0.33 mol T3 blive dannet pr. mol thyroglobulin.
Hvor meget T3 vil et mol thyroglobulin i follikellumen give ophav til i resten af organismen?

Svar:

Ad a. Et antistof mod receptoren kan principielt have en af følgende effekter på TSH receptoren.

1. Ingen effekt og hermed ingen effekt på hypothalamus-hypofyse-thyroidea aksen og energiomsætning.
2. Stimulerende effekt på thyroidea, T3 og T4 produktionen stiger, den basale energiomsætning øges. TSH produktionen i hypofysen og TRH produktionen i hypothalamus falder på grund af negativ feedback.
3. Hæmmende effekt på thyroidea, T3 og T4 produktionen falder, den basale energiomsætning falder. TSH produktionen i hypothalamus og TRH produktionen i hypothalamus stiger på grund af bortfald af negativ feedback.

Ad b. Det antages at 100% af T3 og T4 syntetiseret i follikellumen fraspaltes thyroglobulin og ender op i plasma. I vævene omdannes 80% af T4 under normale omstændigheder til omtrent lige dele T3 og reverse T3. Dvs. at et mol thyroglobulin giver ophav til 0.33 + 0.4 × 3 mol = 1.53 mol T3.

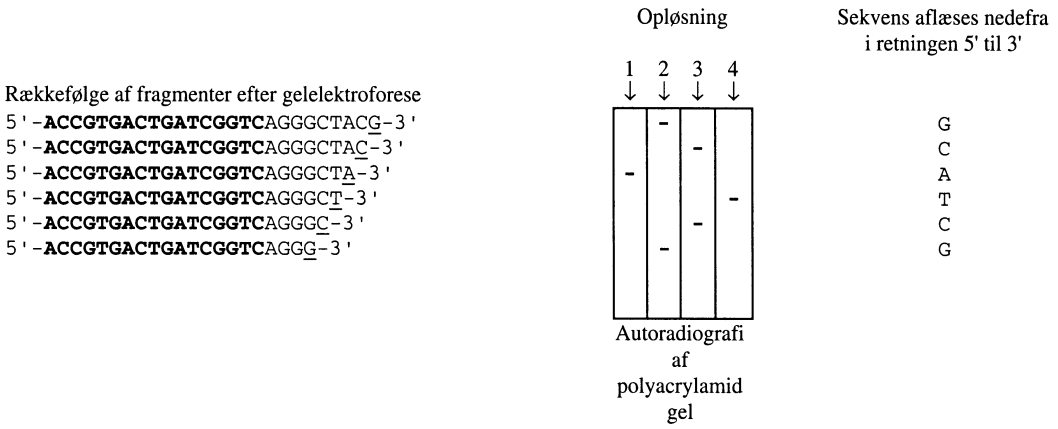
5. Redegør for princippet ved bestemmelse af nukleotidsekvensen i en DNA streng ved hjælp af dideoxynukleotid-sekventeringsteknikken.
Besvarelsen skal indeholde en tegning af et eksempel på en sekvensgel og en forklaring på, hvordan resultatet er fremkommet.

Svar:

DNA stykket med ukendt sekvens sættes sammen med et DNA stykke med kendt sekvens (f.eks. et plasmid). Der laves en primer, der er komplementær til et DNA stykke udenfor det ukendte DNA, således at primeren vil kunne fungere med hensyn til DNA syntese hen over det ukendte stykke DNA (i retning 5' til 3' som vist i figuren). Primeren mærkes med radioaktivitet eller med et fluorescerende stof (se eksempel i figuren).

```
    3'-TGGCACTGACTAGCCAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' DNA stykke (template)
32P-5'-ACCGTGACTGATCGGTC-3'                      Primer
```

Der skal nu laves 4 opløsninger (1, 2, 3 og 4) indeholdende DNA stykket (template eller skabelon), primeren, de fire dNTP'er (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) og DNA polymerase. Til opløsning 1 tilsættes desuden en lille mængde af 2',3' dideoxyadenosin triphosphat (ddATP). Denne mangler hydroxylgruppen i 3' positionen af deoxyribose. ddATP kan bruges af DNA polymerasen under DNA syntesen og sættes ind i strengen på tilsvarende måde som dATP, men når ddATP'en endelig indsættes, kan DNA strengen ikke forlænges yderligere, da den ikke har nogen 3'-OH gruppe, hvortil det næste nucleotid ellers skulle kobles med 5'-phosphatgruppen. Hver gang DNA polymerasen skal indsætte et A i strengen i opløsning 1, er det tilfældigt, om der benyttes en dATP eller en ddATP. Tilsvarende tilsættes ddGTP til opløsning 2, ddCTP til opløsning 3 og endelig ddTTP til opløsning 4. Ideelt set vil der i opløsning 1 blive syntetiseret DNA strenge af varierende længde og alle nysyntetiserede strenge vil ende på en ddATP. Ligeledes vil de nysyntetiserede strenge i opløsning 2 alle ende på ddGTP, i opløsning 3 på ddCTP og endelig i opløsning 4 på ddTTP. De syntetiserede strenge adskilles fra hinanden på en polyacrylamidgel. Det korteste fragment vil vandre hurtigst, og herefter følger det fragment, der har en base mere, efterfulgt af fragmentet med to baser mere, osv. Da fragmenterne er radioaktivt mærkede, kan man ved autoradiografi få et aftryk af gelen. Sekvensen læses fra "de korte stykker" op mod de længere stykker som vist i figuren.



Eksamen i biokemi juni 2002

Essayopgave

Huntingtons sygdom (HD) er en nedarvet neurodegenerativ sygdom. Mutationen som forårsager HD findes i genet for proteinet Huntingtin og er en ekspansion i antallet af tri-nukleotid sekvensen CAG som koder for glutamin. Hos raske individer findes der 15 til 30 CAG repeats inde i genet for Huntingtin. Hvis genet derimod indeholder ca. 40 eller flere af disse CAG repeats vil personen udvikle sygdommen Huntington. Jo længere polyglutamin sekvensen er i proteinet Huntingtin (dvs. hvor mange gange CAG sekvensen er repeteret i genet) des tidligere vil individet udvikle sygdommen.

Det skal oplyses, at hele DNA sekvensen af genet for Huntingtin kendes.

Sekvensen i den kodende streng omkring CAG repeatene ser således ud:

5' . . . AAG TCC TTC CAG $(CAG)_x$ CAG CAA CAG CCG CCA . . . 3'

x = 15-30 gange hos raske individer
x = 40-100 gange i syge individer

1. Definer punktmutation, insertion, deletion og frameshift-mutation. Hvilken type mutation giver anledning til dannelse af sygdomsfremkaldende Huntingtin?

2. Det viste sekvensudsnit af genet for Huntingtin er den kodende streng (også kaldet sense strengen). Skriv sekvensen for den komplementære DNA streng (også kaldet skabelon eller antisense streng) samt det tilsvarende stykke mRNA, der opnåes efter transcription.

3. Definer cis-acting og trans-acting elements og brug termerne til at forklare, hvorledes RNA polymerasen bindes til DNA strengen, før transcriptionen finder sted.

4. Beskriv hvordan man kan bruge PCR til at diagnostisere Huntington's sygdom. Det skal fremgå, om man kan bruge denne metode til at give et overblik over antallet af CAG repeatene eller om metoden kun resulterer i svaret 'normalt/ikke normalt' gen. Som hjælp kan det anføres, at brugen af agarose-gelelektroforese indgår i metoden.

Forslag til besvarelse:

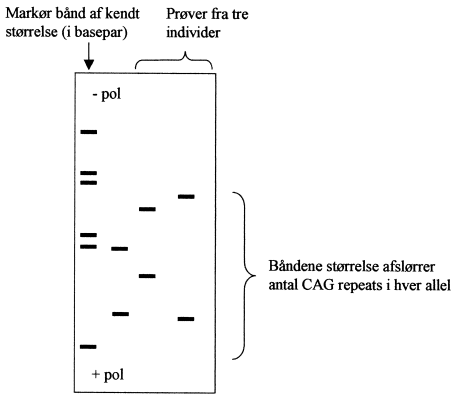
1. *Punktmutation*: En enkelt base på DNA strengen er ændret.
Insertion: Den oprindelige DNA sekvens har fået indbygget en eller flere nye baser.
Deletion: Den oprindelige DNA sekvens har mistet en eller flere baser.
Frameshift-mutation: frameshift-mutationen er et resultat af insertions eller deletions mutationer som medfører en ændret læseramme og dermed en hel anden primær protein sekvens, for den del af proteinet der kodes af DNA sekvensen der ligger downstream for mutationen (C-terminalt i proteinet). Insertion eller deletion af henholdsvis 3, 6, 9, ... (sammenhængende) baser osv. resulterer dog ikke i frameshift (men nok i en ændret aminosyresekvens).
Mutationen der findes i huntingtin er en insertionsmutation.

2. Kodende:
5' . . . AAG TCC TTC CAG (CAG) x CAG CAA CAG CCG CCA . . . 3'
3' . . . TTC AGG AAG GTC (GTC) x GTC GTT GTC GGC GGT . . . 5'
Skabelon:

mRNA:
5' . . . AAG UCC UUC CAG (CAG) x CAG CAA CAG CCG CCA . . . 3'

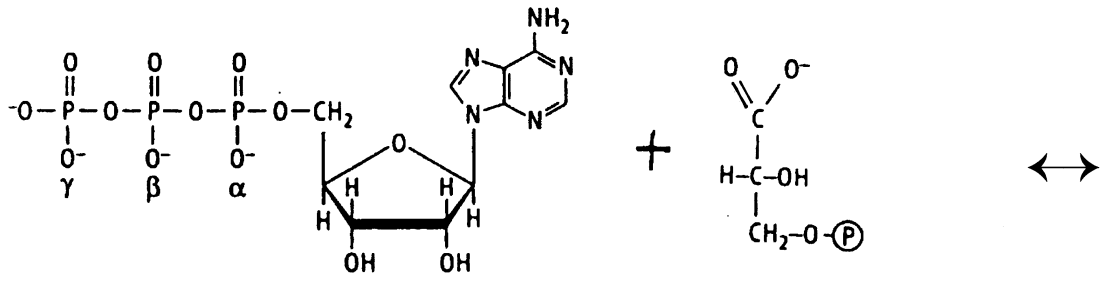
3. Cis-acting elements er de DNA sekvensmotiver som kan binde de proteiner der kontrollerer transcriptionsprocessen. Der er altså tale om promoter-, enhancer- og respons elementer. Trans-acting elements er de specifikke elementer (hovedsagelig proteiner) der interagerer med cis-acting elements. Til gruppen af trans-acting elements hører en række transcriptonsfaktorer som er nødvendige for at eukaryote RNA-polymeraser kan bindes til DNA'et. Et eksempel på en transcriptionsfaktor (Fig. 32.2 i bogen) er TATA-binding protein (TBP) som binder sig til TATA bokse (et cis-acting element) på DNA'et. Dette resulterer i en rekruttering af andre transcriptionsfaktorer der i fællesskab kan styre RNA polymerasen på plads så transcriptionen kan starte ved et defineret punkt.

4. Da genet der koder for Huntingtin proteinet kendes er det muligt at vælge et sæt primere på hver sin side af den repeterede CAG sekvens. En PCR-kørsel med disse primere med genomisk DNA som template vil resultere i to stykker dobbeltstrenget DNA (et fra hvert sit allele gen) med hver sin givne længde. Da DNA indeholder en negativ ladning på fosfat gruppen mellem hver ribose, vil det ved en agarose-gelelektroforese vandre mod den positive pol, således at de små stykker vandrer hurtigst. Ved brug af passende DNA størrelsesmarkør er det muligt at analysere længderne af det DNA der er blevet opformeret og dermed at udtale sig om ca. hvor mange CAG repeats der er.

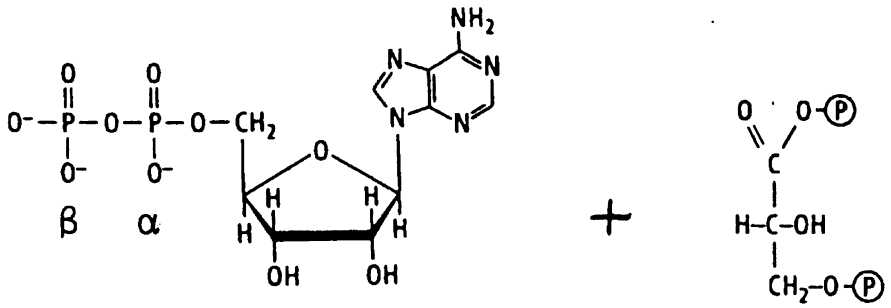


Kortsvarsopgaver

1. a. Karakteriser de bindinger, der brydes og dannes i følgende reaktion:



ATP + 3-phosphoglycerat



ADP + 1,3 bisphosphoglycerat

1.b. Hvilken af de angivne energirige bindinger er mest energirig, når det kan oplyses at ovenstående reaktion har en positiv ændring i Gibbs' frie energi ($\Delta G^{\circ\prime} > 0$)?

1.c. Giv eksempler på hvor og under hvilke forhold reaktionen forløber mod højre og hvor og under hvilke forhold den kan forløbe mod venstre.

Svar:

Ad a. Der brydes en fosforsyreanhydrid binding i ATP mellem beta og gamma afmærkningerne. Der dannes en blandet anhydridbinding mellem carboxylsyre og fosforsyre i position 1 i phosphoglycerat der så bliver til 1,3 bisphosphoglycerat.

Ad b. Da ændringen i Gibbs frie energi er positiv, vil det sige, at en ligevægt vil være forskudt til venstre (eller: når alle reagerende forbindelser i begyndelsen forekommer i lige store koncentrationer, vil reaktionen forløbe mod venstre). (Den viste (koblede) reaktion kan betragtes som summen af to delreaktioner: 1) ATP = ADP + P_i og 2) 3-phosphoglycerat + P_i = 1,3 bisphosphoglycerat. Den samlede ændring i Gibbs frie energi er summen af ændringen i Gibbs frie energi af de to delreaktioner. Ændringen i Gibbs frie energi i delreaktion 1) er negativ. Da den samlede Gibbs frie energi er positiv, må Gibbs frie energi for delreaktion 2) være mere positiv end delreaktion 1) er negativ!) Det vil sige,

at der er mest energi i den blandede anhydridbinding (carboxylsyre og fosforsyre) i position 1, da den driver ligevægten mod venstre.

Ad c. I forbindelse med gluconeogenese, f.eks. i leveren, forløber den viste reaktion mod højre, mens reaktionen forløber mod venstre i forbindelse med glycolyse i erythrocytter og muskler.

2. Den nedenfor viste fedtsyre kaldes Eicosapentaensyre (EPA) og kan strukturelt karakteriseres ved symbolet: C-20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$.

EPA, som indgår i syntesen af eicosanoider (ex.: prostaglandiner og thromboxaner), er en såkaldt betinget essentiel fedtsyre og karakteriseres derfor også ved den såkaldte 'ω-' eller 'n-'nomenklatur.

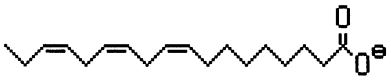
a. Til hvilken familie, angivet ved 'ω-' eller 'n-', hører denne fedtsyre?

b. Vis med angivelse af relevante reaktionstyper og medvirkende reaktanter/substrater, at EPA kan dannes udfra den essentielle fedtsyre, linolensyre, der kan karakteriseres ved symbolet: C-18:3 $\Delta^{9,12,15}$.

Svar:

Ad a. ω-3 familien eller n-3 familien

Ad b.



linolensyre

↓ Forestring med coenzym A (kræver ATP)

↓ Desaturering med O_2 og $NADH_2$

↓ Elongering med Malonyl-coA (kræver ATP)
↓ reduktion med $NADPH_2$
↓ elimination af vand
↓ reduktion med $NADPH_2$

↓ Desaturering med O_2 og $NADH_2$

EPA

3.a. Efter dødens indtræden opstår efter et stykke tid en karakteristisk stivhed (rigor mortis) af musklerne. Giv en kort biokemisk beskrivelse af de forhold i sarcomeret som bidrager hertil.

3.b. Myosin molekylet har to hængselsregioner ('hinge regions'). Hvad er betydningen af denne struktur?

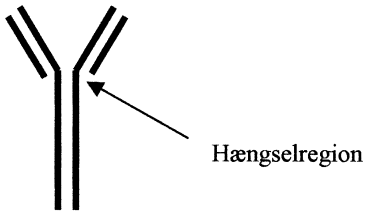
3.c. Nævn et andet eksempel på et molekyle, som også har en hængselsregion, og nævn hvor regionen er placeret i dette molekyle.

Svar:

Ad a. Ved celledød er energiproduktion og ATP dannelse ophørt, hvilket bl.a. medfører at Ca^{2+}-ATPasen i sarcoplasmisk reticulum bliver inaktiv. Den lave koncentration af Ca^{2+} i sarcoplasma kan derfor ikke opretholdes. Binding af Ca^{2+} til troponin-C og efterfølgende konformationsændringer af troponin-komplekset og tropomyosin fører til at aktin blotter sine bindingssteder for myosin-ADP. Myosin og aktin bindes og aktin- og myosinfilamenterne kan nu ikke længere glide frit i forhold til hinanden.

Ad b. Funktionen af hængselsregionerne er at skabe fleksibilitet, så myosinhovedet kan vinkles forskelligt i forhold til resten af myosinmolekylet. Denne konformationsændring er nødvendig for bevægelsen af myosinfilamentet langs aktinfilamentet og dermed også for selve muskelkontraktionen.

Ad c. Hængselsregioner findes f.eks. også i immunglobuliner, hvor der er en hængselsregion i den tunge (H) kæde i Fc regionen.



4. Fire anæmi-patienter har behov for en blodtransfusion. De fire har blodtyperne 0, A, B og AB, men kun fuldblod af typen B er til rådighed.

Med henblik på at undgå transfusionskomplikationer (antistofmedieret lysering af erythrocytter):

a. Hvilke af patienterne kan modtage donorblodet i form af fuldblod og hvilke i form af vasket erythrocytkoncentrat?

b. Kan man forestille sig, at eventuelle 'uegnede' recipienter kunne hjælpes gennem en enzymatisk forbehandling af donorerythrocytter?

Begrund svarene.

Svar:

Ad a. Patienten med blodtype B vil naturligvis kunne modtage transfusion i form af fuldblod.

Patienten med type AB er ganske vist ‘universel recipient’, men da donorfuldblodet indeholder anti-A som kan lysere recipientens egne erythrocytter, må infusion af vasket erythrocytkoncentrat være langt at foretrække.

Ad b. Patienterne med type 0 og A har naturligt forekommende antistoffer mod B og kan derfor ikke modtage donorblodet (hverken som fuldblod eller erythrocytkoncentrat). Forbehandling af vaskede erythrocytter med glykosidase (galactosidase) kan imidlertid fjerne den ekstra sukkerenhed (galactose) som påsat H-substans udgør blodtypen/antigenet B. Derved bliver kun H-substans tilbage og erythrocytterne er så at sige konverteret til type 0 (universel donortype) og kan gives til både type-0 og -A patienterne.

5.a. Beskriv hvordan sekretionerne af FSH og LH reguleres under forløbet af menstruationscyklus.

5.b. Angiv, med begrundelse, eventuelle ændringer af FSH og LH koncentrationer i blodet hos postmenopausale kvinder i forhold til koncentrationerne i den tidlige follikelfase hos fertile kvinder.

Svar:

Ad a. Det hypothalamiske stimulus er GnRH for begge hypofysære hormoner, idet frekvens og amplitude formodes at regulere FSH og LH sekretioner differentielt. Inhibin secerneret i ovarier inhiberer FSH selektivt. (Progesteron udøver negativt feed back på GnRH, står ikke i Baynes). Hos fertile kvinder udøver østradiol enten hæmmende (‘tonic mode’) eller stimulerende (‘surge mode’) feed back på hypothalamisk/hypofysært niveau. Positivt feed back kræver en høj østradiol koncentration vedligeholdt et par dage og ses lige før ovulationen. (Den resulterende LH top udløser ovulationen).

Ad b. Hos postmenopausale kvinder er østrogen koncentrationen reduceret, og nedsættelse af det negative feed back medfører høje FSH/LH koncentrationer. Da follikler ikke modnes, kan østradiol ikke give anledning til positiv feed back.

Eksamen i biokemi januar 2003

Essayopgave

Glucosehomeostase

Besvarelsen skal indeholde:

1. En beskrivelse af glucosehomeostasen efter indtagelse af et kulhydratrigt måltid, herunder en beskrivelse af relevante hormoners og vævs rolle i denne sammenhæng.

2. En redegørelse for glucosehomeostasen i den postabsorptive fase, dvs. 6-12 timer efter sidste måltid.

3. En redegørelse for glucosehomeostasen under forløbet af en længerevarende faste. Besvarelsen skal indeholde en beskrivelse af de vigtigste adaptative ændringer på hormon- og enzymniveau.

Forslag til besvarelse af essayopgave

Ad 1. Efter indtagelse af et kulhydratrigt måltid vil blodglucosekoncentrationen stige væsentligt, hvorfor insulinsekretionen vil blive stimuleret, mens sekretionen af glucagon, adrenalin og cortisol vil blive hæmmet. Da insulin er et hormon, der fremmer anaboliske processer, vil der ske en øget deponering af energireserver i form af glycogen og fedt - og omvendt - en hæmning af disses katabolisme. I levervæv vil der således foregå en øget glycogenese, øget glycolyse, øget fedtsyresyntese og en øget indbygning af de nysyntetiserede fedtsyrer som triacylglyceroler i VLDL, der eksporteres til fedtvævet, mens gluconeogenesen og en eventuel ketonstofproduktion vil blive hæmmet/stoppet. I muskelvæv vil der ske en øget optagelse af glucose via insulin-stimuleret GLUT-4 og øget deponering af den optagne glucose som glycogen. Der er imidlertid en øvre grænse for, hvor meget glucose der kan deponeres som glycogen i muskelvæv, idet glycogensyntasen hæmmes af glycogen selv, når glycogenpartiklerne har nået en vis størrelse. I fedtvæv vil der også ske en øget optagelse af glucose via insulinstimuleret GLUT4, lipoproteinlipasen vil blive stimuleret førende til øget optagelse af fedtsyrer (fra VLDL) som sammen med glycerol-3-fosfat (dannet ud fra glucose) vil føre til øget triacylglycerolsyntese. Samtidig vil insulin hæmme den hormonfølsomme fedtvævslipase. Konklusion: i blodet vil koncentrationen af glucose altså være relativt høj umiddelbart efter måltidet, for derefter i løbet af nogle timer (den postprandiale fase) at falde tilbage til fasteniveauet (3,5-5,5 mM) som holdes relativt konstant selv ved længerevarende faste (se 3.).

Ad 2. I den postabsorptive fase (6-12 timer efter sidste måltid) vil glucosekoncentrationen i blodet som nævnt forblive relativt konstant trods tendensen til fald i koncentrationen som følge af den fortsatte forbrænding af glucose i extrahepatiske væv, især nervevæv og erythrocytter. Pancreas vil reagere på den faldende blodglucosekoncentration ved at nedsætte insulin-sekretionen fra β-cellerne og øge glucagonsekretionen fra α-cellerne. Dette vil i leveren føre til en hæmning af glycogensyntesen og en stigning i glycogenolysen, således at størstedelen af glucose i blodet i denne fase stammer fra leverglycogen og resten fra gluconeogenese. Efterhånden som fasten skrider frem og

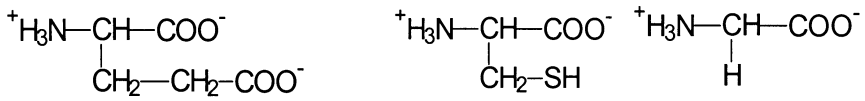
leverglycogendepotet som følge heraf mindskes (efter 16-24 timer) vil bidraget fra gluconeogenesen øges. Pancreasresponset vil blive forstærket af den øgede afgift af adrenalin fra binyremarven, en afgift som i sig selv er betinget af et centralt nervøst respons på fasten (tendens til hypoglycæmi). Binyremarvens adrenalinsekretion vil desuden blive faciliteret af den øgede cortisolsekretion fra binyrebarken. Den øgede cortisolafgift vil ligeledes være forårsaget af et centralt nervøst respons på fasten (hypoglycæmien) og vil være medieret af en øget frigivelse af ACTH fra hypofyseforlappen.

Det voksende bidrag fra gluconeogenesen skyldes de nævnte ændringer i hormonkoncentrationerne, som stimulerer centrale gluconeogenetiske enzymer (pyruvat carboxylase, PEP-carboxykinase, fructose1,6-bisfosfatase og glucose-6-fosfatase), mens de samtidig hæmmer glycogensyntese og glycolyse. Gluconeogenesen foregår først og fremmest i leveren og i mindre omfang i nyrerne og sker ud fra lactat, glycerol og visse aminosyrer som alanin og glutamin, sidstnævnte især i nyrerne. Lactat stammer hos personer i hvile især fra anaerob glycolyse i erythrocytter, aminosyrerne tilføres fra extrahepatiske væv, først og fremmest muskler og tarmceller, mens glycerolet stammer fra spaltningen af triacylglyceroler i fedtvævet (også stimuleret af de ændrede hormonkoncentrationer, se nedenfor).

Ad 3. Efter ca.1 døgns faste har gluconeogenesen således overtaget hovedrollen som leverandør af glucose til extrahepatiske væv og kunne teoretisk fortsætte hermed i flere dage/uger, men et sådant scenarium ville medføre katastrofale konsekvenser for organismen som helhed. De fleste af organismens væv kan som bekendt få en væsentlig del af deres energiforbrug dækket ved fedtsyreforbrænding, men hjernevæv er en undtagelse herfra, idet dette væv vanskeligt/ikke kan optage fedtsyrer fra blodet i et for energiforsyningen betydende omfang. Aminosyrer, der anvendes til gluconeogenese, stammer fra vævsproteiner, først og fremmest muskelproteiner, da der ikke findes egentlige aminosyre/proteindepoter, og hvis hjernevævet alene skulle dække sit energiforbrug under fasten ved glucose og aminosyreforbrænding, måtte der ske en samtidigt forløbende gluconeogenese ud fra vævsproteiner af en sådan størrelse, at det hurtigt ville få fatale følger. Det er derfor en fordel, at hjernevæv under en længerevarende faste adapteres til at dække en del (over halvdelen) af sit energiforbrug ved ketonstofforbrænding. Den stigende ketonstofproduktion i leveren under en længerevarende faste er et resultat af det øgede glucagon/insulin ratio, der dels bevirker en øget mobilisation af fedtsyrer fra fedtvævet (på grund af aktivering af den hormonfølsomme lipase) med stigende koncentration af fedtsyrer i plasma til følge, dels bevirker en øget transport af fedtsyrer ind i levermitochondrier (på grund af nedsat aktivitet af acetylcoA carboxylase, der fører til nedsat koncentration af malonylcoA og dermed nedsat hæmning af carnitin-acyl-transferaser). Den øgede β-oxidation af fedtsyrerne fører til øget produktion af acetylcoA, der omsættes til ketonstoffer og forbrændes i extrahepatiske væv, først og fremmest muskler og hjernevæv. Selv om erythrocytter helt og hjernevæv delvist er afhængig af en vedvarende tilførsel af endogent produceret glucose, vil man på grund af ovennævnte metaboliske adaptationer være i stand til at opretholde en tilstrækkelig høj glucosekoncentration i blodet i flere måneder, afhængigt af fedtdepoternes størrelse.

Kortsvarsopgaver

1. Glutathion er sammensat af de tre aminosyrer glutaminsyre (2-aminopentandisyre), cystein og glycin i den nævnte rækkefølge. Strukturformlerne ved neutralt pH er anført i nævnte rækkefølge:

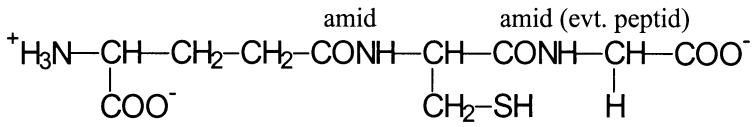


a. Skriv strukturformlen for glutathion ved pH 7.4, idet det kan oplyses at bindingen fra -glutaminsyre involverer 5-carboxylsyregruppen. Karakteriser de to indgående bindinger.

b. Angiv glutathions rolle i organismen, og opskriv mindst to reaktioner, hvori glutathion indgår. Navngiv også de (to) indgående enzymer.

Svar:

Ad a.



betegnes herefter: GSH

Ad b. GSH er involveret i adskillige antioxidant systemer specielt i RBC, da den indeholder en SH- gruppe som bl.a. kan inaktivere H_20_2 ved at reducere H_20_2 til H_20 eller kan gendanne cystein-SH grupper i proteiner og enzymer og holde dem på den funktionelle reducerede tilstand, hvis de er blevet oxideret til cystiner (cystein dannet disulfider).

1) Glutathion peroxidase katalyserer reduktionen af H202 (og andre peroxider) dannet i cellerne og samtidig bliver GSH oxideret til GSSG

$$H_2O_2 + 2\ GSH \xrightarrow{\text{glutathion peroxidase}} 2\ H_2O + GSSG$$

2) Gendannelsen af den reducerede form af GSH katalyseres derefter med glutathion reduktase:

$$GSSG + NADPH_2 \xrightarrow{\text{glutathion reduktase}} 2\ GSH + NADP^+$$

(3) GSH kan medvirke ved inaktiveringen af den skadelige forbindelse methylglyoxal til laktat samt medvirke ved andre biotansformationer (detoksifikationsreaktioner)).

2. ApoB er et protein der indgår i lipoprotein komplekser, som transporterer bl.a. kolesterol rundt i blodet. ApoB findes i to former. En som produceres i leveren og består af 4536 aminosyrer, og en som produceres i tarmen og består af 2152 aminosyrer.

	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	stop	UGA	stop	A
	UUG		UCG		UAG	stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

Den genetiske kodetabel.

a) Hvordan kan man bestemme størrelsesforskellen mellem de to proteiner?

mRNA for de to proteiner har samme størrelse og er dannet fra det samme gen. Forskellen i størrelsen af proteinerne skyldes, at tarmen indeholder et sekvensspecifikt enzym (cytidin deaminase) der omdanner én cytosin til uracil i ApoB mRNA'et. Cytidin deaminasen binder specifikt til nedenstående sekvens, der koder for aminosyrerne 2149 til 2158.

2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158
ACA	UAU	AUG	AUA	CAA	UUU	GAU	CAG	UAU	AUU
Thr	Tyr	Met	Ile	Gln	Phe	Asp	Gln	Tyr	Ile

b) Hvordan kan cytidin deaminase-aktiviteten forklare, at ApoB fra tarmen består af netop 2152 aminosyrer?

Celler fra patienter som lider af arvelig forhøjet kolesterol niveau i blodet (familiær hyperkolesterolæmi) optager mindre kolesterol end tilsvarende celler fra raske.

c) Giv en eller flere mulig(e) forklaring(er) på, hvorfor celler fra patienter med arvelig hyperkolesterolæmi optager mindre LDL-kolesterol.

Svar:

Ad a) Størrelsesforskellen mellem de to proteiner kan analyseres ved en simpel gelelektorforese (SDSPAGE) såfremt man har de to proteiner i oprenset form. Findes proteinerne i vævsekstrakter kan størrelsesforskellen analyseres udfra et Western Blot, ved anvendelse af specifikke antistoffer rettet mod de to proteiner.

Ad

2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158
ACA	UAU	AUG	AUA	CAA	UUU	GAU	CAG	UAU	AUU

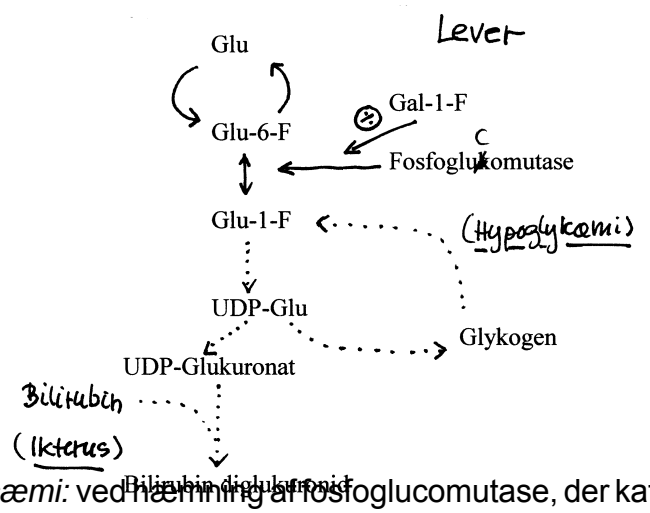
Thr	Tyr	Met	Ile	Gln UAA stop	Phe	Asp	Gln	Tyr	Ile

Koden for Gln (position 2153) er CAA. Ved deaminering af cytidin dannes et stopkodon (UAA), som bevirker at ApoB48 kun bliver 2152 aminosyrer langt.

Ad c) Kolesterol bliver optaget af cellerne vha. receptor medieret endocytose, så mulige forklaringer kunne være: ingen ekspression af receptor, ingen binding af lipoprotein komplekser til receptor, ingen internalisering af lipoprotein/receptor komplekserne.

3. Ved galactosæmi som følge af mangel på Gal-1-fosfat uridyl-transferase akkumuleres galactose og Gal-1-fosfat i vævene. Høje koncentrationer af Gal-1-fosfat hæmmer enzymet fosfoglucomutase. Beskriv, hvorledes denne hæmning kan medvirke til udvikling af hypoglykæmi og ikterus hos nyfødte med Gal-1-fosfat uridyltransferase mangel. Begrund svaret og anfør de for besvarelsen relevante reaktionsskemaer.

Svar:



Hypoglycæmi: ved hæmning af fosfoglucomutase, der katalyserer processen glucose-6-fosfat ↔ glucose-1-fosfat vanskeliggøres mobilisationen af glucosylgrupper fra leverglycogen og dermed ses tendens til hypoglycæmi.

Icterus: ved hæmning af fosfoglucomutase nedsættes syntesen af UDP-glucuronat via UDP-glucose. Nedsat UDP-glucuronat fører til nedsat afgiftningsfunktion i leveren, bl.a. af bilirubin og dermed ophobning af (ukonjugeret) bilirubin i vævene.

4.a. Forklar hvordan en vækstfaktor kan medføre aktivering af Ras og beskriv de væsentligste elementer i den kaskade, der kan føre til aktivering af transkriptionsfaktorer med det resultat, at cellen indtræder i S-fasen.

4.b. Giv en mulig forklaring på at stoffer, der hæmmer DNA syntesen, kan anvendes i behandlingen af forskellige kræftformer.

Svar:

Ad a. Vækstfaktor-induceret fosforylering af tyrosinrester i vækstfaktor-receptorens cytoplasmatiske del (herunder krydsfosforylering, fordi binding af vækstfaktoren

medfører dimerisering af receptoren) medfører binding af et adaptor protein, et protein der stimulerer Ras GDP/GTP udveksling, samt membran-associeret Ras-GDP. Det dannede Ras-GTP igangsætter en kaskade af proteinkinaser, der ender i den til cellekernen translokerede Mitogen Aktiverede Protein Kinase. Fosforylering af transkriptionsfaktorer (aktivering af "early" og "late genes") fører til dannelse af et cyklin, og cyklin-CDK kompleks medfører (hyper)fosforylering af retinoblastom proteinet. Dermed bortfalder hæmningen af den genaktivering, der er bestemmende for overgang til S-fase.

Ad b. Kræftceller bringes til stadighed over G0/G1 tærsklen og i S-fase, eksempelvis ved ovenstående mekanisme, og er derfor afhængige af DNA syntese. I modsætning hertil er normale celler ofte i G0 fase (hvilken fraktion afhænger af celletypen) og er derfor ikke afhængige af DNA syntese.

5. Aktiviteten af lactatdehydrogenase i en serumprøve kan bestemmes ved at måle hastigheden for reduktion af pyruvat ved to forskellige koncentrationer.

Til 2 kuvetter (med 1,000 cm lysvej) indeholdende 2,90 mL phosphatbuffer med pyruvat (i forskellig koncentration) og $NADH_2$ sættes 0,10 mL af serumprøven. Umiddelbart efter måles, ved 340 nm, de initiale ændringer i reaktionsblandingernes absorption som funktion af tid ($\Delta A_{340} min^{-1}$).

Samhørende værdier af pyruvatkoncentrationer og $\Delta A_{340} min^{-1}$ er:

pyruvatkoncentration:	$\Delta A_{340} min^{-1}$
0,20 mmol L^{-1}	-0,036
0,30 mmol L^{-1}	-0,042

En $NADH_2$-opløsning med koncentrationen 1,00 mol L^{-1} har en absorption ved 340 nm på 6300, når lysvejen er 1 cm. Endvidere antages den LDH-katalyserede reaktion at følge Michaelis-Menten kinetik.

a. Beregn K_M og V_{max} for LDH i prøveopløsningen (kuvetten).

b. Beregn LDH-aktiviteten (µmol L^{-1} min^{-1}) i serumprøven.

Svar:

a. LDH katalyserer reaktionen: Pyruvat + $NADH_2$ ⟶ Lactat + NAD

pyruvatkoncentration	ΔA_{340} min^{-1}	$\Delta[NADH_2]$ mol L^{-1} min^{-1}	V_0 mol L^{-1} min^{-1}
0,20 mmol L^{-1}	– 0,036	$-5{,}714 \times 10^{-6}$	$5{,}714 \times 10^{-6}$
0,30 mmol L^{-1}	– 0,042	$-6{,}667 \times 10^{-6}$	$6{,}667 \times 10^{-6}$

Michaelis-Menten ligningen: $V_0 = \frac{V_{max} \times [S]_0}{K_M + [S]_0}$ omformes til: $V_{max} = \frac{V_0}{[S]_0} \times (K_M + [S]_0)$

$$V_{max} = \frac{5{,}714 \times 10^{-6}}{2{,}00 \times 10^{-4}} \times (K_M + 2{,}00 \times 10^{-4}) = \frac{6{,}667 \times 10^{-6}}{3{,}00 \times 10^{-4}} \times (K_M + 3{,}00 \times 10^{-4})$$

Løsninger: $K_M = 1{,}49 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} & $V_{max} = 9{,}97 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} min^{-1}

b. I kuvetten er enzymaktivitets-koncentrationen af LDH altså: $9{,}97 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} min^{-1}
og LDH aktiviteten derfor: $9{,}97 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} min^{-1} $\times$ 0,003 L = $2{,}99 \times 10^{-8}$ mol min^{-1}

LDH stammer udelukkende fra 0,100 mL serum

LDH aktivitets-koncentration i serum: $\frac{2{,}99 \times 10^{-8} \text{ mol min}^{-1}}{0{,}1 \times 10^{-3} \text{ L}}$ 299 μmol L^{-1} min^{-1}

Eksamen i biokemi juni 2002

Essayopgave

Leverfunktioner (udvalgte eksempler)

Besvarelsen skal indeholde:

1. En beskrivelse af de processer, der fører til degradering af hæm til bilirubindiglucuronid og udskillelse af stercobilin/urobilin.

2. En beskrivelse af den generelle reaktionssekvens for hydroxylering (monooxygenering), katalyseret af cytochrom P450-systemet, og den videre skæbne af de hydroxylerede produkter.

3. En redegørelse for etanoloxidation og de metaboliske ændringer som følge af etanolforgiftning, samt en beskrivelse af cytochrom P450 enzymers betydning for hastigheden for etanoloxidation.

Forslag til besvarelse:

Ad 1. Hæm findes som prostetisk gruppe i såkaldte hæmoproteiner, f.eks. hæmoglobin, myoglobin og cytochromer. Ved nedbrydningen af hæm dannes forskellige galdefarvestoffer som udskilles med galden og i mindre mængder med urinen. Første trin i nedbrydningen er en oxidativ spaltning af ringstrukturen til biliverdin, en lineær tetrapyrrol, efterfulgt af en reduktion til bilirubin. En væsentlig del af denne bilirubinproduktion foregår i extrahepatiske væv (reticuloendothelialt system) og bilirubin, der er fedtopløseligt, må derfor transporteres til leveren bundet til albumin. I leveren bindes/konjugeres bilirubin med 1 eller 2 glucuronalgrupper (fra UDP-glucuronat) og dette bilirubinglucuronid er så vandopløseligt, at det kan føres med galden ud i tarmen. I tarmen fraspaltes glucuronat igen ved hydrolyse, og katalyseret af tarmbakteriers reduktaser bliver bilirubin reduceret til urobilinogen, som er farveløst. Det meste urobilinogen udskilles med fæces efter først at være blevet oxideret til forskellige urobiliner/stercobiliner, som i modsætning til urobilinogen er farvede produkter og giver fæces den brune farve. En mindre mængde urobilinogen reabsorberes fra tarmen og føres med vena porta tilbage til leveren, der igen udskiller det med galden, men noget oxideres til urobiliner, der via det store kredsløb udskilles med urinen.

Ad 2. Mange biologisk aktive forbindelser, både forbindelser dannet i organismen (f.eks. hormoner) og forbindelser tilført udefra (farmaka, giftstoffer) er så apolære, at de har vanskeligt ved at blive elimineret fra organismen, med mindre de ved kemisk modifikation omdannes til mere polære stoffer, der kan udskilles med urin og/eller galde. De kemiske modifikationer omfatter især oxidationsreaktioner og konjugeringsreaktioner. Mange oxidationsreaktioner foregår med molekylær ilt efter følgende skema:

$$RH + O_2 + NADPH_2 \longrightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$

Reaktionen kaldes også en hydroxylering eller monooxygenering og katalyseres i leverens endoplasmatiske reticulum af en række cytochrom P450 enzymkomplekser, der alle er karakteriserede ved at udvise lav substratspecificitet. Disse enzymkomplekser består dels af enzymet $NADPH_2$-cytochrom P450 reduktase, der indeholder to riboflavingrupper, dels af cytochrom P450 proteinet, der binder substratet og molekylær ilt. Riboflavingrupperne overfører de to elektroner fra $NADPH_2$, en af gangen, til jernatomet i cytochrom P450, og ved processen indbygges det ene iltatom i substratet RH under dannelse af ROH, men det andet iltatom reduceres til H_2O. De på denne måde hydroxylerede produkter kan udskilles som sådanne eller gøres endnu mere polære ved konjugering med glucuronat (fra UDP-glucuronat) eller sulfat (fra PAPS).

Ad 3. Etanol omsættes hovedsageligt i leveren, hvor det oxideres til acetat, der afgives til blodet og forbrændes i extrahepatiske væv til CO_2 og vand efter aktivering til acetylcoA. I cytosol katalyserer alkohol dehydrogenase reaktionen:

$$\text{alkohol} + NAD^+ \longrightarrow \text{acetaldehyd} + NADH_2$$

og i mitochondrier katalyserer aldehyd dehydrogenase reaktionen:

$$\text{acetaldehyd} + NAD^+ + H_2O \longrightarrow \text{acetat} + H^+ + NADH_2$$

Det er karakteristisk for omsætningen af etanol, i modsætning til omsætningen af mange andre forbindelser, at hastigheden for etanoloxidation er uafhængig af etanolkoncentrationen i væskefasen. Det er således ikke enzymernes katalytiske kapacitet (V_{max}), der er begrænsende for etanoloxidationens hastighed. Forklaringen på den stort set konstante oxidationshastighed hænger sammen med leverens ATP-omsætning/forbrug. Ved oxidation af etanol til acetat dannes 2 $NADH_2$ pr. etanol. Den hastighed, hvormed $NADH_2$ kan dannes ved denne oxidation, overskrider langt hastigheden for levervævets forbrug af redox-elektroner i respirationskæden, dvs. overskrider langt det $NADH_2$-behov, der er for leverens ATP-produktion. Da den samlede koncentration af NAD^+ + $NADH_2$ ikke ændres, nås der hurtigt ved etanolforbrænding en steady-state tilstand, hvor NAD^+-forbruget og $NADH_2$-produktionen er lige store, men ligevægten mellem NAD^+ og $NADH_2$ er kraftigt forskudt mod $NADH_2$ ved etanolforbrænding. [NAD^+] bliver således begrænsende faktor for hastigheden for etanolforbrænding.

Dette høje $NADH_2/NAD^+$-forhold får vide konsekvenser for metabolismen af andre forbindelser i leveren. Alle processer, der forbruger $NADH_2$ og producerer NAD^+ vil forløbe med øget hastighed, mens alle andre processer, der forbruger NAD^+ og producerer $NADH_2$, vil blive hæmmet. Således vil ligevægten mellem pyryvat og lactat forskydes mod lactat, evt. førende til lactatacidose, ligevægten mellem oxaloacetat og malat forskydes mod malat og ligevægten mellem diydroxyacetonefosfat og glycerol-3-fosfat forskydes mod glycerol-3-fosfat. Dette fører til, at koncentrationerne af de vigtigste gluconeogenetiske substrater pyruvat, oxaloacetat og dihydroxyacetonefosfat bliver meget lave, dvs. gluconeogenesen bremses. Er leverglycogendepotet lille eller tømt, vil etanolforbrænding derfor kunne føre til hypoglycæmi. Dette nedsætter insulin/glucagon ratio, hvilket fører til øget aktivitet af den hormonfølsomme fedtvævslipase, med efterfølgende øget tilførsel af fedtsyrer til leveren. Da fedtsyrers oxidation også indebærer forbrug af NAD^+, hæmmes oxidationen, og fedtsyrerne esterificeres til triacylglyceroler og dermed stigende fedtindhold i leveren, evt. førende

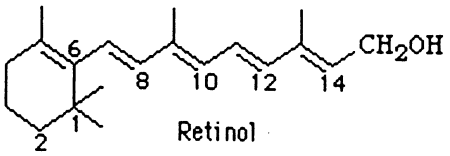
til fedtlever. Hos personer med et vedvarende og stort alkoholforbrug kan hastigheden for etanoloxidation øges, fordi etanol kan inducere dannelse af enzymer tilhørende cytochrom P450 systemet, det såkaldte MEOS-system, der katalyserer følgende reaktion:

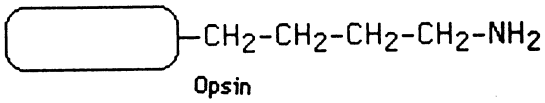
$$\text{etanol} + O_2 + NAD(P)H_2 \longrightarrow \text{acetaldehyd} + NAD(P)^+ + H_2O$$

Den dannede acetaldehyd oxideres som tidligere af aldehyd dehydrogenase til acetat. Det fremgår af dette skema, at etanoloxidation ved hjælp af MEOS-systemet ikke bidrager/bidrager mindre til det høje $NADH_2/NAD^+$-forhold, og derfor ikke i så udtalt grad får de samme metaboliske konsekvenser, som den "normale" etanolforbrænding.

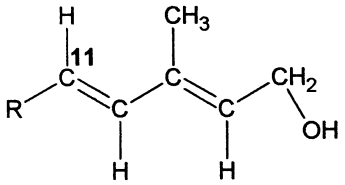
Kortsvarsopgaver

1. Strukturformlerne for retinol og opsin ser således ud:

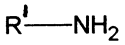




I besvarelsen af opgaven kan følgende summariske strukturformler også anvendes:



Retinol



Opsin

Nedenfor er vist nogle reaktionsveje for organismens omsætning af retinol.

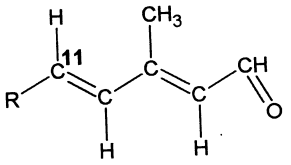
Retinol
↓ dehydrogenering
Retinal (*all* trans) —dehydrogenering→ Retinoinsyre
↓ isomerisering
11-cis-Retinal
↓ kondensation
Imin dannet mellem 11-cis-Retinal og en lysin-sidegruppe i membranproteinet Opsin (vist ovenfor)

a. Angiv strukturformler for
1) Retinal
2) Retinoinsyre
3) 11-cis-Retinal
4) Iminen

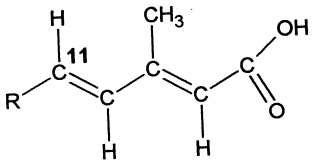
b. 1) Angiv næringskilder til retinol.
2) Angiv hvordan retinol deponeres.
3) Beskriv de vigtigste roller, som retinoiderne (retinol og -derivater) har i organismen og angiv symptomer på mangel på vitamin A.

Svar:

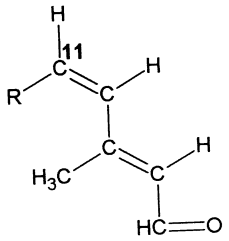
Ad a.



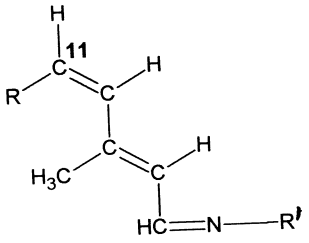
Retinal



Retinoinsyre



11-cis - Retinal



Imin (rhodopsin)

Ad b. 1) Næringskilder er spinat, gulerødder og andre grønsager, hvori der findes carotener (beta-caroten oxideres til retinal).
2) Retinol deponeres som retinylpalmitat i leveren.
3) Retinoiderne (A-vitamin) har betydning for epithelcellers differentiering og vækst, hvorfor der ved A-vitamin mangel i denne forbindelse vil vise sig epithelcelleforandringer. Retinoiderne har, som anført i reaktionsskemaet ovenfor, betydning for synet. Kondensation af 11-cis-retinal og opsin giver en imin (rhodopsin), der efter en lysininduceret (energi) cis til trans isomerisering spaltes i opsin og trans-retinal og anledning til nerveimpuls. A-vitamin mangel symptomer i denne forbindelse er natteblindhed.

2. Der foreligger følgende oplysninger:

1. Man anbefaler ekstra folinsyre til unge kvinder, som planlægger eller forventer graviditet, men der er også betænkelighed ved at udstrække denne ekstra tilførsel til en hel befolkning, fordi ekstra indtag af folinsyre kan maskere mangel på vitamin B_{12} hos nogle.

2. Mangel på vitamin B_{12} påvirker både nukleinsyre- og lipidomsætningen; sidstnævnte fordi en ophobning af methylmalonat hæmmer normal fedtsyresyntese, hvilket kan kompromittere myelineringen af nervebaner.

Vurdér følgende opfordring (pressemeddelelse).
"Madvarer bør tilsættes folinsyre for at mindske antallet af børn, der fødes med rygmarvsbrok"!

a. Forklar hvorledes ekstra folinsyre kan maskere mangel på vitamin B_{12} (cobalamin) med angivelse af relevante funktioner af folinsyre og vitamin B_{12}.

b. Ville en samtidig tilsætning af vitamin B_{12} til madvarer løse problemet med maskering af mangel på vitamin B_{12}?

Svar:

Ad a. Mangel på vitamin B_{12} får følgende konsekvenser (i. & ii):

i. Overførsel af methylgruppe fra methyl-H_4-folat til homocystein blokeres. Derved "fanges" en betydelig del af folinsyre som ubrugeligt methyl-H_4-folat. Den resulterende mangel på folinsyre påvirker DNA-omsætningen og udtrykker sig som anæmi; men denne mangeltilstand kan dog overvindes ved ekstratilførsel af folinsyre, hvilket viser sig ved en normalisering af blodbilledet.
(Endvidere "fanges" en betydelig del af methionin som homocystein, hvilket kan udløse en sekundær mangel på methionin til proteinsyntese, som varigt skader nervesystemet).

ii. Isomerisering af methylmalonyl-coA til succinyl-coA blokeres. En resulterende ophobning af methylmalonat hæmmer normal fedtsyresyntese, hvilket kompromitterer vedligeholdelse af nervesystemets membraner.
Altså: Ekstra tilførsel af folinsyre kan medføre en normalisering af blodbilledet, der ellers ville være påvirket af B_{12}-mangel. Derved kan varige senskader på nervesystemet udvikle sig.

Ad b. Nej! For oftest beror udvikling af peniciøs anæmi på en defekt optagelse af vitamin B_{12}, hvilket kan skyldes defekt sekretion af "intrinsic factor" (IF) i maven eller en kronisk skade på tarmvæv. I begge tilfælde vil øget tilførsel af vitamin B_{12} være nærmest nytteløs.

3. Tre proteiner (A, B og C) indgår i en signaleringsvej, som medfører aktivering af et bestemt gen-regulatorisk protein.

Protein A er et sekretorisk protein, der fungerer som ligand.
Protein B er et plasmamembranprotein, med flere membrandomæner.
Protein C er et intracellulært protein.

Ved bindingsforsøg er det påvist, at N-terminalen af protein B kan binde til protein A og C-terminalen af protein B kan binde til protein C.

a. Skitser placeringen af protein B i plasmamembranen med angivelse af N- og C-terminal. Skitsen skal også vise protein B's interaktion med henholdsvis protein A og C. Det skal fremgå, hvad der er extra- og intracellulær side.

b. Angiv hvor i cellen protein A, B og C syntetiseres, samt hvorledes de transporteres til deres funktionssteder.

c. Angiv kortfattet, hvordan cis-acting og trans-acting elementer samvirker ved initiering af transkriptionen af et proteinkodende gen og forklar hvordan frekvensen af transcriptionsinitieringen kan reguleres.

Svar:

Ad a.

Ad b. Protein A og B syntetiseres på ribosomer bundet til det endoplasmatiske reticulum og under translokationen indsættes protein B i ER membranen mens protein A frigives til ER lumen. Herfra transporteres proteinerne i vesikler til celleoverfladen via Golgi komplekset og ved exocytose frigives protein A til ekstracellulærvæsken mens protein B indsættes i plasmamembranen. Protein C syntetiseres af ikke membranbundne ribosomer i cytosol.

Ad c. Et proteinkodende gen indeholder en promoterregion (cis-acting element) hvortil generelle transkriptionsfaktorer (trans-acting elements) samles og bindes. Disse sørger for at orientere RNA polymerase II korrekt, således at transkriptionen af genet kan starte. Hastigheden for initieringen kan reguleres ved, at andre gen-regulatoriske proteiner (trans-acting elements) bindes til genregulatoriske områder (cis-acting elements) kaldet enhancers eller silencers, der henholdsvis øger eller hæmmer initieringen af transkriptionen.

4.a. Beskriv den generelle struktur af proteoglycaner og af heparin.

4.b. Beskriv virkningen af heparin på blodets koagulation og forklar virkningsmekanismen.

Svar:

Ad a. Proteoglycaner består af en protein-del og en glycosaminoglycan-del, som er karakteriseret ved gentagne enheder af disaccharider. Disse enheder består typisk af en hexuronsyre og en hexosamin, der er bibragt negativ ladning som følge af N-acetylering eller sulfatering. Hele glycosamin-delen er således stærkt negativt ladet. Heparin er glycosaminoglycan-delen af et proteoglycan af heparansulfat-typen.

Ad b. Heparin er en antikoagulans. Det bindes til og aktiverer antithrombin, hvorved det prokoagulatoriske thrombin samt faktorerne IXa og Xa inaktiveres.

5. Et plasmamembranprotein er blevet isoleret og underkastet partiel hydrolyse. Herefter er nedenstående proteinfragment blevet oprenset og karakteriseret.

a. Det antages, at en del af det pågældende proteinfragment er forankret i membranen. Skitser/forklar hvordan fragmentet kan være lokaliseret i forhold til plasmamembranen? (Begrund svaret).

b. Vil proteinfragmentet vandre mod anoden (+) eller katoden (-) ved elektroforese ved pH 7,0? (Begrund svaret).

Mængden af proteinfragment blev målt ved spektrofotometri på basis af dets indhold af tryptofan. I en cuvette med lysvej på 1,00 cm måltes en absorption på 0,253 ved 280 nm. Tryptophan har en molær absorptionskoefficient ved 280 nm på 5100 $mol^{-1} \times l \times cm^{-1}$. Der var ialt 4,00 ml proteinfragmentopløsning.

c. Hvor mange mikromol proteinfragment blev der isoleret?

Svar:

Ad a. Den N-terminale del af peptidet kan eventuelt være forankret i membranen (flere hydrofobe aminosyrer) og resten af peptidet, med S-S binding of kulhydrater, findes på ydersiden.

Ad b. Mod anoden (+), i sidekæderne er der 1 positiv ladning fra Lys og 4 negative ladninger fra 2 Asp, 1 Glu og 1 NANA.

Ad c. Abs = 1 × c × abs. koefficient
0,253 = 1 × c × 5100
c = 0,0000496 mol/l
4 ml opløsning, 6 Trp
4 ml / 6 × 0,0000496 mol/l = 0,033 mikromol

Eksamen i biokemi juni 2004

Essayopgave

Udviklingen af en velfungerende organisme er betinget af en nøjagtig replikation og vedligeholdelse af cellernes DNA. Dette er en fundamental forudsætning for, at genernes ekspression sker i overensstemmelse med vævenes behov.

Gør rede for de centrale enzymatiske processer, der fører til:

a. Replikation af DNA i kernen.

b. Reparation af beskadiget DNA i kernen.

c. Dannelse af proteiner.

Der skal skelnes mellem processer i kerne og i cytoplasma; men posttranslatoriske processer skal ikke medtages.

Forslag til besvarelse:

Ad a. DNA-syntese katalyseres af DNA-polymeraser. Disse enzymer er karakteriserede ved deres evne til at tilkoble dNTP-nukleotiderne til en eksisterende 3'-ende ved at aflæse og indsætte de komplementære nukleotider til DNA-skabelonen (DNA-template). DNA-syntesen foregår i retningen 5' mod 3'.

Ved replikationens startpunkt (origin) adskilles de to DNA-strenge, hvorefter en RNA-primase katalyserer dannelsen af en kort komplementær RNA-kæde (primer) på begge strenge. Disse RNA-kæders 3'-ender er udgangspunkt for den egentlige DNA-replikation.
Fra replikationens startpunkt udgår der en replikationsgaffel til hver side. Fra hver af disse gafler replikeres begge strenge samtidigt ved en kontinuerlig henholdsvis en diskontinuerlig replikationsproces (førende til "leading" henholdsvis "lagging strand"). Ved den kontinuerlige DNA-syntese syntetiseres en ubrudt DNA-streng fra den lille RNA-kæde i startpunktet. Ved den diskontinuerlige replikationsproces (gen)startes fra de små RNA-kæder, der er dannet ved RNA-primase i replikationsgaffelen for hver ca. 200 baser.
En DNA-polymerase udfylder stykkerne mellem RNA-kæderne (Okazaki fragmenter), hvorefter de små RNA-kæder borthydrolyseres og erstattes med dNTP-nukleotider, og til sidst forbindes DNA-kæderne ved hjælp af DNA-ligaser.

Adskillige andre proteiner indgår også i DNA-polymerasekomplekset, bl.a. helicaser og SSB ("single strand binding") proteiner. Disse hjælpeproteiner inducerer strukturændringer, så DNA-skabelonkæden blotlægges for DNA-polymeraserne. Atter andre enzymer som topoisomeraser (ikke pensum) udløser rotationsspændinger foran replikationsgaffelen ved brydning henholdsvis gendannelse af phosphodiesterbindinger i DNA-strengene.

(I Baynes & Dominiczak beskrives desuden forlængelser af telomerer med hexamere enheder ved hjælp af telomeraseenzymet, hvilket ikke er korrekt).

DNA-polymerasekomplekset varetager desuden korrektioner af eventuelle replikationsfejl under DNA-syntesen, idet de forkert indsatte nukleotider fjernes ved en 3' mod 5' deoxyribonuklease- aktivitet, hvorefter DNA-syntesen forsætter.

Ad b. Enzymsystemer afsøger til stadighed DNA for fejl, der måtte være opstået tilfældigt eller ved fysisk-kemiske påvirkninger (f.eks. stråling). Fejlene korrigeres ved, at den beskadigede base eller et mindre stykke DNA omkring læsionsstedet borthydrolyseres. En DNA-polymerase indsætter herefter den eller de manglende komplementære baser til den ubeskadigede streng, hvorefter en DNA-ligase knytter den sidst indsatte base til resten af DNA-strengen.

Ad c. I kernen formidler RNA-polymeraser dannelse af RNA-transkripter i retningen 5' mod 3' ved at bruge den ikke-kodende (antisense) DNA-streng som skabelon (template). Disse RNA-polymeraser genkender veldefinerede startsteder for transkription. De kan - i modsætning til DNA-polymeraser - starte polymerisering de novo, dvs. uden en allerede eksisterende 3'-terminal.
De transkriptive processer fører til dannelse af hnRNA. Fra denne pulje dannes der ved posttranskriptionelle processer ribosomalt RNA, tRNA og forstadier til mRNA. Sidstnævnte påsættes en 5'-hætte og 3'-polyA hale. Ved splejsningsreaktioner fjernes introns fra dette forstadium til mRNA, og det modne mRNA - alene bestående af exons samt hætte og hale -overføres til cytoplasmaet.

mRNA er udgangspunkt for de translatoriske processer, der fører til dannelse af proteiner fra aminosyrer. Ved translationen indgår foruden mRNA også ribosomer (såvel frie som bundne til endoplasmatisk reticulum) samt tRNA. Ribosomerne er komplekse strukturer, opbygget af ribosomalt RNA og proteiner, der katalyserer proteinsyntesen. Ved enzymkatalyse kobles tRNA-molekylerne til deres respektive aminosyrer og formidler via anticodon i tRNA kobling til den genetiske kode (codons), som er indeholdt i mRNA.

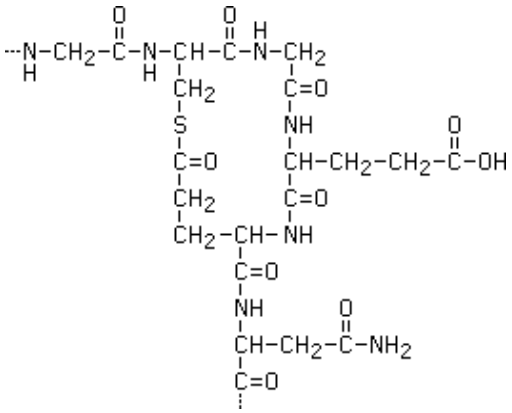
Translationen af et mRNA initieres ved, at 40S-ribosomdelen binder et Met-tRNA i dets P-site, hvorefter dette kompleks bindes til 5'-hætten og derefter "glider" mod 3'-enden, indtil komplekset møder et AUG startcodon. 60S-ribosomdelen bindes herefter til 40S delen, hvorefter syntesen af peptidkæden indledes ved, at en aminoacyl-tRNA specifik for den efterfølgende codon bindes i A-site på 40S-ribosomdelen. Den første aminosyre (Met - siden den voksende peptidkæde) i P-site overføres herefter til aminoacyl-tRNA i A-site under dannelse af en peptidbinding mellem C-terminalen i den overførte aminoacyl-tRNA og N-terminalen i aminoacyl-tRNA i A-site. (Processen katalyseres af en peptidyltransferase).

Ribosomet "flyttes" én codon frem (formidlet af elongeringsfaktor-2 (EF-2)), hvorved det tomme tRNA i P-site fjernes, og peptidyl-tRNA i A-site flyttes til P-site. Processen gentages, indtil et stopcodon (UAA, UAG, UGA) eksponeres for A-site, hvorefter en termineringsfaktor bindes til denne position. Dette afbryder translationen, og peptidet hydrolyseres fra peptidyl-tRNA og frigøres dermed fra ribosomet.

Kortsvarsopgaver

1. I proteinaseinhibitoren, 2-makroglobulin (2M), indgår der en særlig kovalent binding, som er involveret i 2M's aktivitet som proteinaseinhibitor. Denne specielle kovalente struktur er ikke et primært resultat af den ribosomale translation.

   Nedenfor vises et udsnit af 2M's kovalente struktur.



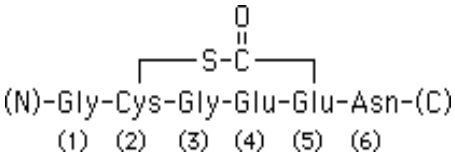
a. Angiv primærstrukturen af det viste udsnit af 2M fra N- til C-terminal.

b. Hvilke aminosyrer i det viste udsnit af 2M bidrager til den særlige kovalente binding, som ellers sjældent forekommer i proteiner?

c. Hvilke funktionelle grupper i det viste udsnit af 2M kan udvise syre- eller baseegenskaber?

Svar:

a., b.



Thiolesterbinding mellem sidegrupperne fra Cys (nr. 2) og Glu (nr. 5).

c. I det viste udsnit forekommer kun en carboxylsyregruppe fra Glu (nr. 4).

2. En stamopløsning af et enzym med kendt KM indeholder 1500 IU mL-1 (1 IU = 1 mol min-1).
   Den enzymkatalyserede reaktion følger Michaelis-Menten kinetik: og KM = 10-5 mol L-1

a. 20 L af denne enzymstamopløsning tilsættes en blanding, indeholdende substrat og alle øvrige relevante reagenser.
   Efter fortynding til 1,000 mL er den initiale substratkoncentration 0,100 mol L-1.
   Beregn initialhastigheden i denne reaktionsblanding.

b. Forklar (evt. ved beregning), at initialhastigheden i en reaktionsblanding med samme enzymmængde og samme volumen, men initial substratkoncentration på 0,005 mol L-1, bliver den samme som i reaktionsblandingen i spørgsmål a.

Svar:

a. De 20 L enzymstamopløsning - med enzymkoncentrationen 1500 IU mL-1 - fortyndes i reaktionsblandingen til 1,000 mL.

Derved bliver Vmax i reaktionsblandingen:

$$\text{Vmax} = \frac{\frac{1500\times10^{-6}\,\text{mol min}^{-1}}{10^{-3}\,\text{L}}\times20\times10^{-6}\,\text{L}}{10^{-3}\,\text{L}} = 30 \text{ mmol min-1 L-1}$$

... og V0 i reaktionsblandingen:

$$\text{V0} = \frac{30\times10^{-3}\,\text{mol min}^{-1}\text{L}^{-1}\times0{,}100\,\text{mol L}^{-1}}{10^{-5}\,\text{mol L}^{-1}+0{,}100\,\text{mol L}^{-1}} = 30 \text{ mmol min-1 L-1}$$

altså V0 = Vmax, - fordi [S]0 >>> KM

b. I denne reaktionsblanding er [S]0 >> KM, hvorfor V0 ? Vmax, hvilket også fremgår af:

$$\text{V0} = \frac{30\times10^{-3}\,\text{mol min}^{-1}\text{L}^{-1}\times0{,}005\,\text{mol L}^{-1}}{10^{-5}\,\text{mol L}^{-1}+0{,}005\,\text{mol L}^{-1}} = 29{,}9 \text{ mmol min-1 L-1}$$

3.a. Under en langvarig faste øges både forbrændingen af fedtsyrer og produktionen af ketonstoffer i leveren.
Forklar - med angivelse af relevante reaktioner - hvordan den samtidige stigning i gluconeogenesen kan virke fremmende på ketogenesen.

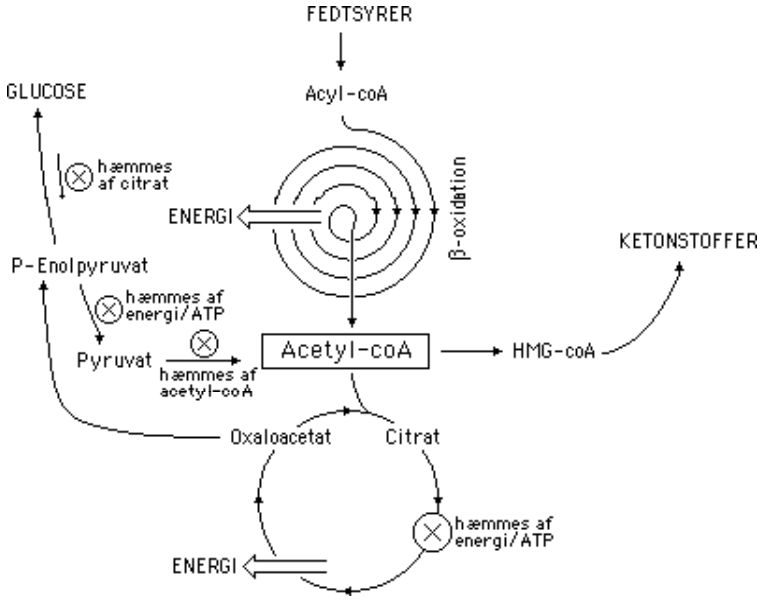
3.b. I et ekstrahepatisk væv - specielt muskler - hæmmes glycolysen under faste.
Forklar - med angivelse af relevante reaktioner - hvordan den forøgede fedtsyreforbrænding bidrager til at hæmme glycolysen i ekstrahepatisk væv.

Svar:

3.a. Under faste er fedtvævslipasen aktiveret. Den betydelige tilførsel af fedtsyrer til leveren giver anledning til en kraftig forøgelse af den mitochondrielle -oxidation, hvilket fører til en stigning i koncentrationen af acetyl-coA ledsaget af en betydelig energiproduktion. Acetyl-coA kan indgå i citratcyklus ved dannelse af citrat. Men den videre omdannelse af citrat (egentlig isocitrat) er hæmmet af den rigelige energi fra -oxidationen af fedtsyrer (i form af FADH2, NADH2 & ATP) samt den meget lave koncentration af oxaloacetat (og malat), der indgår i gluconeogenesen.
Den resulterende ophobningen af acetyl-coA fører i stedet til ketogenese.

3.b. I ekstrahepatisk væv vil den øgede mængde af citrat i mitochondrierne "flyde over" i cytosol og dér hæmme phosphofructokinasen og dermed hæmme omdannelsen af Fru-6-P til Fru-1,6-P2. I mitochondrierne vil den øgede mængde af acetyl-coA (fra -oxidation af fedtsyrer) hæmme pyruvatdehydrogenasen og dermed dannelse af acetyl-coA fra glycolysens pyruvat. Endelig vil den øgede produktion af ATP hæmme både pyruvatdehydrogenasen og (i cytosol) pyruvatkinasen.

(supplement til besvarelsen)



4. Dannelse af disulfidbinding, glycosylering, sulfatering, phosphorylering og hydroxylering er velkendte elementer i modifikationen af ny-translaterede proteiner. For enkelte proteiner gælder det endvidere, at nogle bestemte aminosyresidegrupper skal undergå specifikke kemiske modifikationer, før proteinet kan udfylde sin endelige funktion.

a. Nævn tre eksempler på sådanne modificerede aminosyresidegrupper og angiv i hvilke proteiner, de forekommer - ét protein for hvert eksempel er tilstrækkeligt.

b. Gør rede for de nævnte modifikationers betydning for de respektive proteiners funktion.

c. Giv eksempler på kliniske forhold, der kan opstå, hvis de angivne aminosyrer ikke modificeres i normalt omfang.

Svar:

a. Oxidativ deaminering af lysinsidegrupper fører til reaktive aldehyder (som allysin) i prokollagen og elastin.
Carboxylering af glutamatsidegrupper fører til -carboxyglutamatsidegrupper (Gla) i blodkoagulationsfaktorerne II, VII, IX og X samt i protein C og S.
Iodering og æterbinding mellem tyrosinsidegrupper fører til tri- og tetraiodthyroniner i thyroglobulin.

b. De oxidativt deaminerede lysinsidegrupper er udgangspunkt for dannelsen af de fiberstabiliserende kovalente tværbindinger (som desmosin) i elastin og kollagen.

γ-Carboxyglutamatsidegrupper er afgørende for, at blodkoagulationsfaktorerne II, VII, IX og X samt protein C og S, via Ca2+ og phosphatidylserin, kan bindes til thrombocyt- og cellemembraner på koagulationsstedet.
Dannelsen af iodthyroniner er en forudsætning for produktion af thyreoideahormonerne T3 og T4.

c. Mangel på de deaminerede lysinsidegrupper (allysiner) kan føre til deformering af

knogler og led samt kar-aneurismer.
Mangel på γ-carboxyglutamatsidegrupper vil medføre øget blødningstendens.
Mangel på T3 og T4 kan medføre trætheds- og kuldefornemmelse, vægtstigning og manglende koncentrationsevne hos voksne - samt føre til retardering (hos nyfødte) og manglende længdevækst hos børn.

5.a. Beskriv to eksempler på specifikke bindingsfunktioner af sacchariddelen(e) i glycoproteiner og forklar deres biologiske betydning.

5.b. Angiv hvilke typer af enzymer, der er nødvendige for nedbrydning af proteoglycaner, og forklar hvorfor en genetisk betinget mangel på eller manglende funktion af et af disse enzymer medfører sygdom.

Svar:

5.a. Sacchariddelen af adskillige lysosomale enzymer (mannose-6-phosphatgrupper på N-linked oligosaccharider, "targeting signal") bindes til en receptor, der sørger for transport fra Golgi-apparatet til lysosomer. En manglende bindingsfunktion fører til, at lysosomer ikke kan nedbryde komplekse proteoglycaner og forskellige komplekse lipider. Dette resulterer i sygdom ("I-cell disease").
Sacchariddelen af et glycoprotein på leukocytters overflade bindes til et protein på endothelceller. Resultatet er, at leukocytterne "ruller" langs endothelcellerne, hvorved deres passage igennem monolaget af endothelceller lettes.

5.b. Proteolytiske enzymer (proteinaser), glycosidaser og sulfataser i lysosomerne. Manglende funktion af et af disse enzymer medfører, at proteoglycaner ikke kan nedbrydes på normal måde. I stedet akkumuleres de i lysosomerne, hvilket kan skade cellefunktioner og resultere i mucopolysaccharidoser ("lysosomal storage disease").