

BIOTEKNOLOGI HØJT NIVEAU

Mandag den 22. maj 2006
kl. 9.00 – 14.00

Sættet består af 1 stor og 3 små opgaver samt et bilag i 2 eksemplarer.
Det ene eksemplar af bilaget afleveres sammen med besvarelsen.

STOR OPGAVE

1. *Ginkgo biloba* ekstrakt som lægemiddel

A.

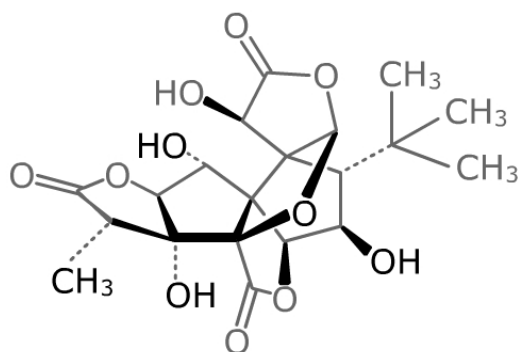
Ekstrakt af blade fra tempeltræet, *Ginkgo biloba*, er et af verdens mest solgte naturlægemidler. Ekstraktet indeholder blandt andet ginkgolider, der tilhører en gruppe stoffer, som man kalder terpen-tri-lactoner. En lacton er en ringsluttet ester. Ginkgolider indeholder en tertiær butylgruppe, hvilket er sjældent blandt naturstoffer, se *figur 1*.

Der forskes i, hvordan stofferne i ekstraktet virker i hjernen, herunder i virkningen på receptorerne.



Ginkgo biloba

Man har identificeret 5 forskellige ginkgolider. I *figur 1* er vist *ginkgolid C*.

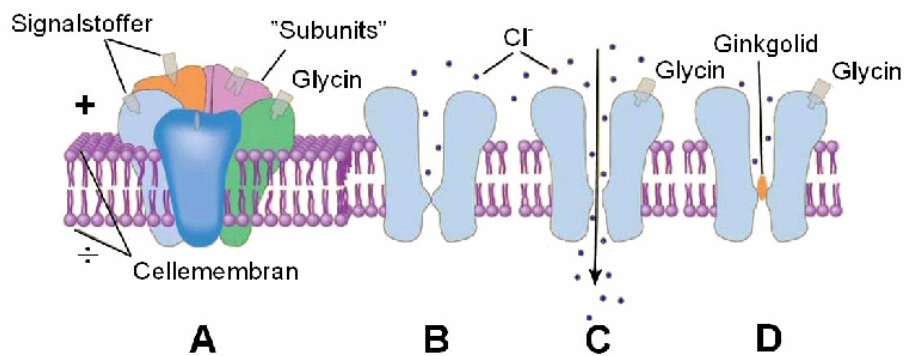


Figur 1. Ginkgolid C.

- Marker estergrupperne og den tertiære butylgruppe i formelen for ginkgolid C (benyt bilaget).
- Angiv for hver alkoholgruppe i ginkgolid C, om den er primær, sekundær eller tertiær (benyt bilaget).

B.

Figur 2 viser glycinreceptoren i nerveceller i hjernen. Et ginkgolid fra *Ginkgo biloba* kan sætte sig som en prop i glycinreceptoren (D).

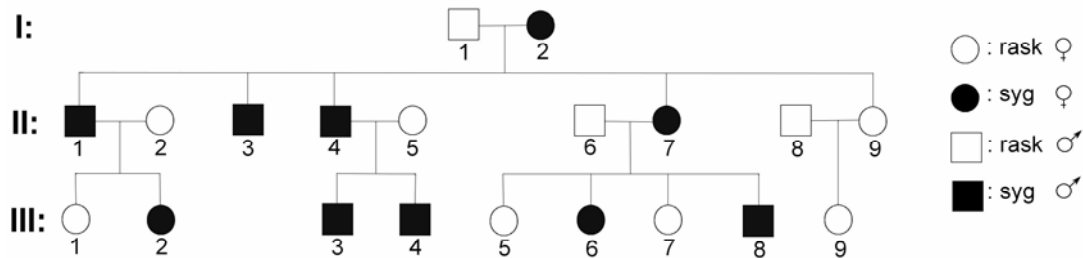


Figur 2. Glycinreceptor i cellemembran i nerveceller i hjernen. Receptoren er dels vist tredimensionalt (A) og dels todimensionalt, hvor den er lukket (B), åben (C) eller blokeret (D).

- Forklar ud fra figur 2, hvordan glycinreceptoren virker.
Hvad kaldes denne type receptor?
- Hvilken betydning har det for synapsepotentialet, at ginkgolid C blokerer glycinreceptoren?

C.

Den arvelige neurologiske sygdom hyperekplexia skyldes en mutation i genet, som koder for glycinreceptoren. Sygdommen er bl.a. karakteriseret ved udtalt muskelstivhed, som skyldes ændringer i centralnervesystemet. I en familie er det vist, at der er tale om en mutation i et basepar i det gen, der koder for $\alpha 1$ underenheden i glycinreceptoren. Mutationen bevirker, at arginin (arg271) erstattes af glutamin i det dannede protein. Aminosyre nr. 271 er placeret i den ekstracellulære ende af glycinreceptoren. *Figur 4* viser en stamtavle fra den omtalte familie med den arvelige sygdom hyperekplexia.



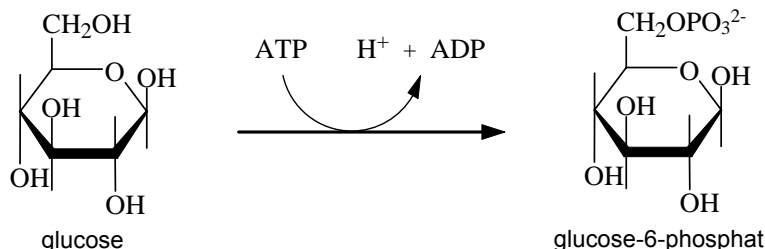
Figur 4. Stamtavle for familien med hyperekplexia.

- Angiv den sandsynlige nedarvning af genet for sygdommen hyperekplexia i familien vist i *figur 4*.
Hvilken genotype har II-4, II-5 og III-3? Svaret skal begrundes.
- Hvilken ændring i DNA kan resultere i, at arginin (arg271) erstattes af glutamin i det dannede protein?
- Hvordan kan man forklare effekten af mutationen ud fra de to nævnte aminosyrers kemiske egenskaber?

SMÅ OPGAVER

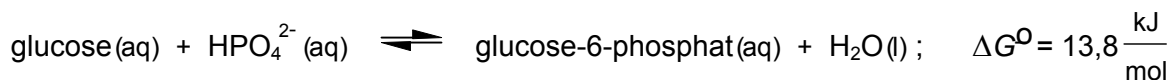
2. Nedbrydning af glucose

Glucose er en vigtig energikilde for alle celler. Den indledende reaktion i glycolysen er omdannelsen af glucose til glucose-6-phosphat (se figur 1).



Figur 1. Den ATP-baserede phosphorylering af glucose til glucose-6-phosphat.

I figur 2 ses en direkte phosphorylering af glucose uden medvirken af ATP:



Figur 2. Direkte phosphorylering af glucose med hydrogenphosphat.

- a) Vis, at ligevægtskonstanten K for reaktionen vist i figur 2 er lig med $3,81 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ ved 25°C og kommenter resultatet.

Antag at koncentrationerne af glucose og hydrogenphosphat i en celle begge er lig med $4,8 \text{ mM}$.

- b) Beregn ligevægtskoncentrationen af glucose-6-phosphat under forudsætning af, at cellen udelukkende anvender direkte phosphorylering til dannelse af glucose-6-phosphat.

Tabel 1 viser data fra en laboratorieundersøgelse af den ATP-baserede phosphorylering katalyseret af enzymet *hexokinase*.

[glucose] / mM	Initialhastighed / $\frac{\mu\text{M}}{\text{min}}$
0,10	58
0,50	115
1,0	130
3,0	142
5,0	146

Tabel 1. Sammenhørende værdier af stofmængdekoncentration og initialhastighed.

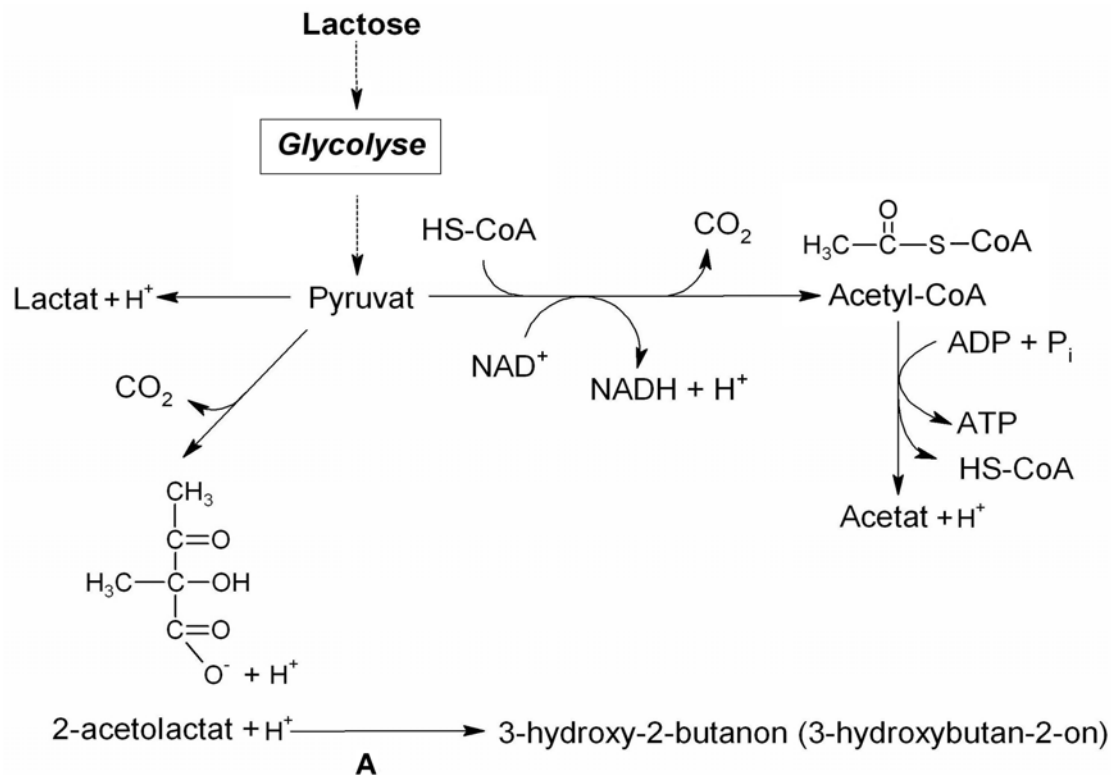
- c) Undersøg på baggrund af ovenstående data, om reaktionen med *hexokinase* følger Michaelis-Menten kinetik.

3. Fermentor

I industrien produceres mange stoffer eller mikroorganismer i store fermenteringstanke (gæringsanlæg). Inden disse store produktionsfermentorer sættes i gang, foretages laboratoriesimulering i mindre målestok.

Det danske firma *Chr. Hansen* har et stort salg af bakterien *Lactococcus lactis* til mejeriindustrien overalt i verden. Virksomheden arbejder derfor intenst på at optimere produktionen af *Lactococcus*.

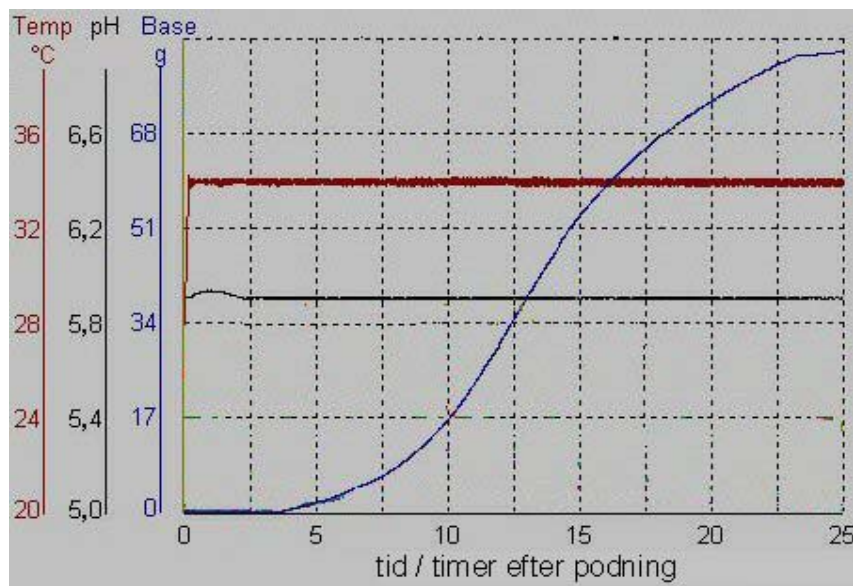
Ved produktion af *Lactococcus lactis* "fodres" bakterierne med lactose. Lactosen omdannes som vist i figur 1.



Figur 1. Et udsnit af *Lactobacillus lactis* metabolisme.

- Opskriv det afstemte reaktionsskema for reaktion **A** i figur 1.
- Reaktion **A** i figur 1 katalyseres af et enzym. Angiv enzymets hovedgruppe og giv forslag til navngivning af enzymet.

I et forsøg var en 2 liters fermentor i drift i 25 timer. Fermentoren blev konstant gennemblæst med luft, og der blev tilsat base. Basen blev udelukkende tilsat for at neutralisere H^+ -ioner fra bakteriernes produktion af lactat og acetat. Der blev tilsat i alt 98,4 g af en 25 % opløsning af NH_3 (masse%).



Figur 2. Masse af tilsat NH_3 -opløsning afbildet som funktion af tiden i et fermenteringsforsøg. Temperatur og pH blev ligeledes målt.

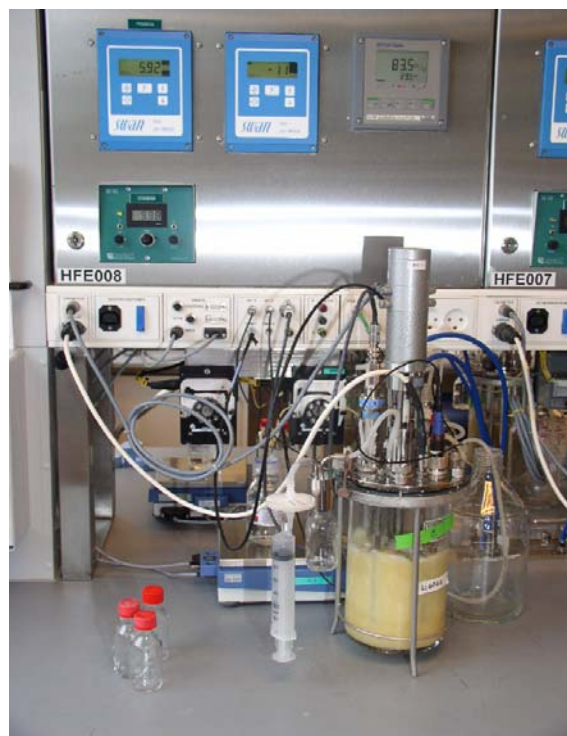
c) Beregn den stofmængde af lactose, som bakterierne har omsat til syre i forsøgsperioden.

Produktionen af *Lactococcus lactis* bakterier blev fulgt ved hjælp af spektrofotometri. De aflæste absorbanser er angivet i tabel 1.

Tid timer	Fortyndingsfaktor	Absorbans $A_{\text{fortyndet}}$	Absorbans $A_{\text{korrigeret}}^*$
0,0	0	0,000	0,00
0,5	40	0,006	0,24
1,5	40	0,008	0,30
2,5	40	0,017	0,66
3,5	40	0,027	1,06
5,0	40	0,057	2,26
6,0	40	0,058	2,30
7,0	40	0,099	3,94
8,0	40	0,136	5,42
12,0	40	0,355	14,18
16,0	80	0,229	18,30
25,0	80	0,243	19,40

Tabel 1. Absorbansmålinger ved 600 nm.

* $A_{\text{korrigeret}}$ er den målte værdi, $A_{\text{fortyndet}}$, korrigeret med fortyndingsfaktoren.

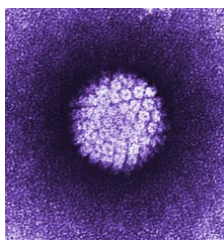


Figur 3. Forsøgsfermentor.

d) Afbild $A_{\text{korrigeret}}$ som funktion af tiden. Gør rede for sammenhængen mellem den kurve du har tegnet ud fra tabel 1 og en af kurverne i figur 2.

4. Livmoderhalskræft

Hvert år dør mange kvinder af livmoderhalskræft.
 HPV (human papillomavirus) infektion kan være årsag til livmoderhalskræft.



Figur 1. HPV-virus.

Der kendes mere end 100 forskellige genotyper af HPV:

- 17 af disse karakteriseres som høj-risiko virus
- 10 karakteriseres som lav-risiko virus
- resten synes ikke at øge risikoen for at udvikle livmoderhalskræft.

Når celleforandringer i livmoderhalsen skal vurderes, er det afgørende at vide, om forandringerne skyldes angreb af risiko-virus eller ej. Derved kan man skåne kvinder, som ikke er inficeret med risiko HPV-virus, for unødvendige indgreb.

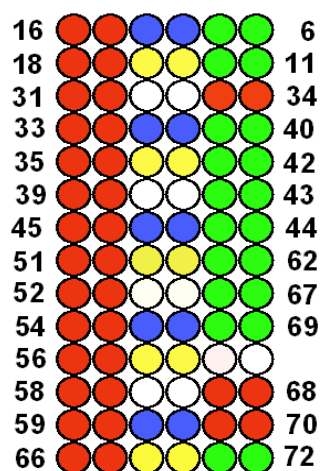
HPV er meget vanskelig at identificere. Virusgenomet er dobbeltstrengt DNA, som koder for 8 proteiner. Hos høj-risiko HPV er to af disse proteiner oncogene proteiner, der påvirker cellernes delingsmønster, hvorved kræftceller kan udvikles.

Generne, der koder for de oncogene proteiner, kaldes gen-E6 og gen-E7.

Firmaet *GeneTrack* har udviklet en HPV DNA-chip til diagnosebrug. DNA-chip'en består af et plastmateriale, hvorpå mikroskopiske mængder enkeltstrengt DNA er anbragt i små reaktionskamre (se figur 2 og 3 samt tabel 1).

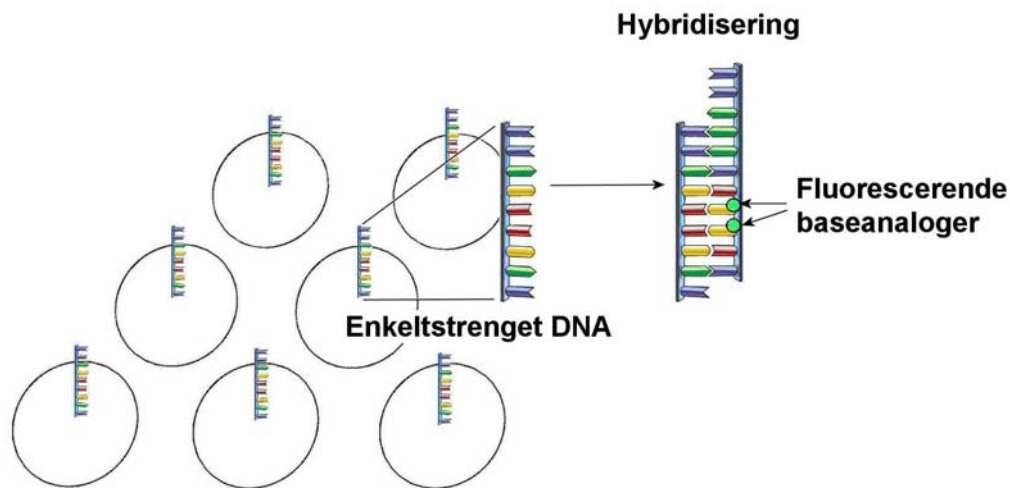
	HPV
17 høj-risiko HPV	16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70
10 lav-risiko HPV	6, 11, 40, 42, 43, 44, 62, 67, 69, 72

Tabel 1. Forskellige HPV genotyper.
 Hvert tal angiver en bestemt genotype.



- Høj-risiko type
- Lav-risiko type
- PCR kontrol
- HPV positiv kontrol
- Negativ kontrol

Figur 2. DNA-chip.



Figur 3. Princippet i en DNA-chip. I de små reaktionskamre er der mikroskopiske mængder enkeltstreng DNA.

Fremgangsmåde ved brug af HPV DNA-chip:

DNA isoleres fra livmoderhalsceller. Nu udføres PCR, hvor man indarbejder en fluorescerende baseanalog Cy-5. Testmaterialet overføres til DNA-chip'en, og der udføres hybridisering. Til sidst analyseres chip'en for fluorescens ved hjælp af en særlig scanner.

- Hvad skal karakterisere de enkeltstrengede DNA-stykker i DNA-chip'en, for at de kan anvendes til påvisning af høj-risiko HPV genotyper?
- Hvorledes skal PCR proceduren udføres i praksis for at få de ca. 10^5 DNA molekyler, der er nødvendige for at opnå et tilstrækkeligt pålideligt resultat?
- Gør rede for det generelle princip i opbygningen og anvendelsen af DNA-chip'en vist i figur 2. Kom herunder ind på betydningen af hver af de 5 typer kamre i chip'en.

Kilder

Opgave 1

Aktuel Naturvidenskab, 4, 2005, 7-9

<http://perso.wanadoo.fr/ginkgo.dm/GINKGO/Gbextract.htm>

Opgave 4

Figur 1: <http://www.genomenewsnetwork.org>

Tabel 1: <http://www.genomictree.com/>

Figur 2: Efter <http://www.genomictree.com/>