

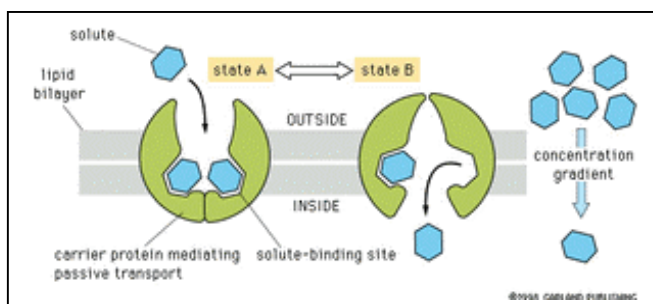
BESVARELSE EKSAMEN SIF4070 CELLEBIOLOGI 9. MAI 2003

Oppgave 1

a) Transport over membraner

Glukose transporteres inn i leverceller med sin konsentrasjonsgradient og ved hjelp av et bæreprøtein, dvs at transportmekanismen er fasilitert diffusjon.

Mekanismen er slik (antatt modell): Et bæreprøtein med bindingssted og stor affinitet for glukose oscillerer spontant mellom to konformasjoner. I konformasjon 1 vender bindingsstedet ekstracellulært og mange glukosemolekyler bindes fordi konsentrasjonen av glukose er høy. I konformasjon 2 vender bindingsstedet intracellulært (se figur).



Glukose faller av og andre glukosemolekyler kan bindes. Det er imidlertid få molekyler som vil bindes fordi konsentrasjonen av glukose er lav intracellulært. Resultatet blir en netto transport av glukose over membranen inntil konsentrasjonen av glukose er like stor i blod som intracellulært.

b) Fosfolipase C spor

Reseptoren til vasopressin er en reseptor bundet til et G protein. G proteinet er et stort transmembran protein bestående av 3 subenheter α , β , γ med GDP/GTP bundet til α -subenheten. Når GDP er bundet er G proteinet inaktivt.

Vasopressin bindes til reseptoren (se figur)

⇒ konformasjonsendring av reseptoren

⇒ bindingstedet for G proteinet eksponeres på cytoplasmatiske side

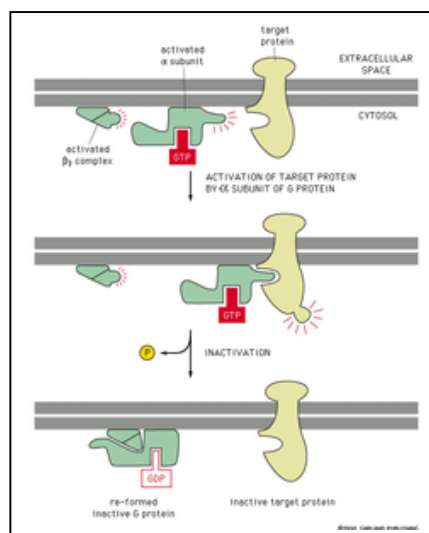
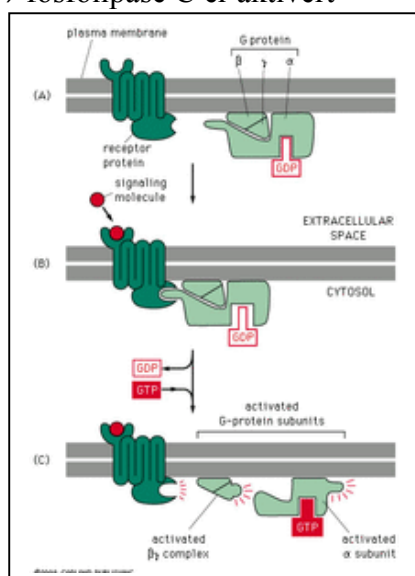
⇒ G protein bindes til reseptoren

⇒ GDP faller av og erstattes med GTP

⇒ subenhetene av G proteinet dissosierer og den aktiverte α enheten diffunderer i plasmamembranen

⇒ α enheten bindes til target proteinet som er fosfolipase C

⇒ fosfolipase C er aktivert



Target protein
=fosfolipase C

Fosfolipase C er aktivert noen sekunder. α enheten har en iboende GTPase aktivitet som hydrolyserer GTP slik at: $\text{GTP} \rightarrow \text{GDP} + \text{P}$

Når GDP er bundet til α enheten er den inaktiv og forlater fosfolipase C som blir inaktiv (se figur). Så lenge vasopressin er bundet kan nye G protein aktiveres

Fosfolipase C katalyserer reaksjonen:

Fosfoinositol-bifosfat $\rightarrow$ diacylglycerol + inositol trifosfat.

Fosfoinositol bifosfat er et fosfolipid i plasmamembranen.

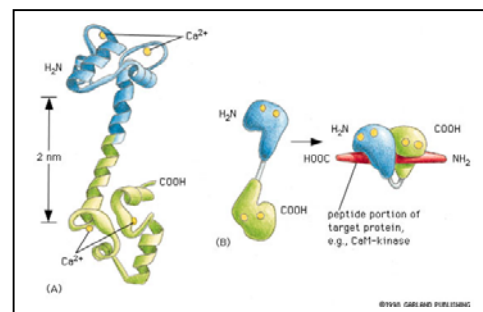
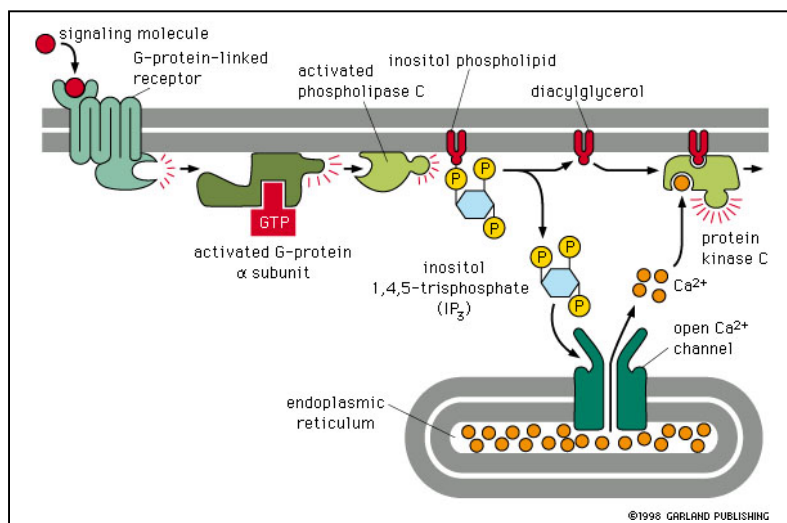
Diacylglycerol forblir værende i plasmamembranen på cytoplasmatiske side

Inositol trifosfat er et lite vannløselig molekyl som diffunderer ut i cytosol med sin elektrokjemiske gradient og binder seg til sin reseptor på endoplasmatiske retikulum eventuelt andre organeller.

Reseptoren for inositoltrifosfat er en reseptor-operativ ione kanal og bindingen åpner Ca^{2+} ione kanaler. Ca^{2+} går ut i cytosol og fungerer som en videre budbærer med flere funksjoner:

- 1) Ca^{2+} bidrar sammen med diacylglycerol til å aktivere protein kinase C (Denne protein kinasen heter C for den krever at Ca^{2+} er bundet).
- 2) Ca^{2+} binder seg til Ca^{2+} bindende proteiner. Det viktigste av slike proteinet er calmodulin. Når Ca^{2+} er bundet endre calmodulin konformasjon slik at det kan bindes til en rekke proteiner deriblant CaM-kinaser.

Inositoltrifosfat og diacylglycerol aktiverer altså flere kinaser. Disse kinasene vil igjen fosforilere andre kinaser som aktiverer enzymet som bryter glykogen ned til glukose (glykogen fosforilase -P). Enzymet som bygges opp lagrene av glycogen (glykogen syntetase) inaktiveres av kinasene).



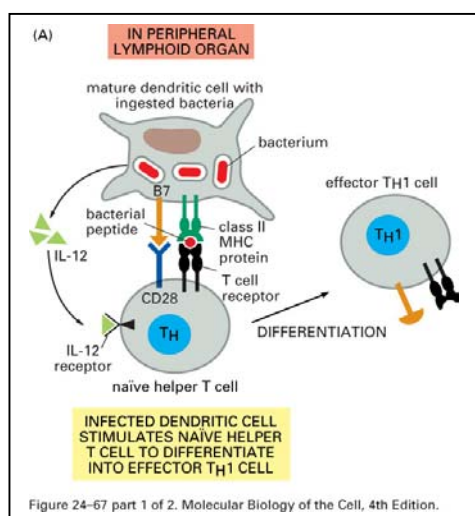
Calmodulin

c) Aktivering av T hjelpe celler

T_{helper} celler aktiveres ved at T celledreseptor bindes til MHC klasse II molekyl på overflaten av antigenpresenterende celle. MHC klasse II molekylet må ha fragmenter av det bakterielle antigenet bundet til seg, for at T_{helper} celle skal bindes. Denne bindingen er svak og stabiliseres ved at antigenet CD4 på overflaten av T_{helper} celler bindes til MHC klasse II molekylet.

Aktivering av T_{helper} celler krever også et annet signal: binding mellom B7 på overflaten av antigenpresenterende celle og CD28 på T_{helper} celle. (se figur)

De antigenpresenterende cellene som har tatt opp fremmede antigen skiller ut ulike molekyler. Når en bakterie er tatt opp, vil den antigenpresenterende cellen skille ut interleukin 12 (IL-12) som binder seg til reseptorer på T_h hjelpe cellen. T_h hjelpe cellen differensierer da til en T_h hjelpecelle type 1. (se figur)



Oppgave 2

a) Protein sortering

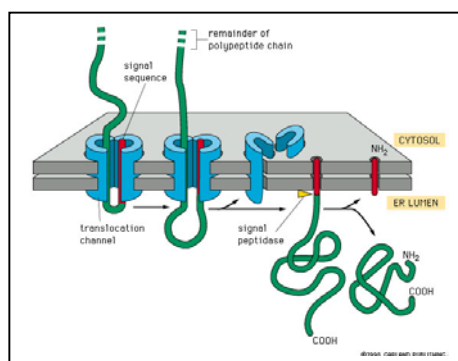
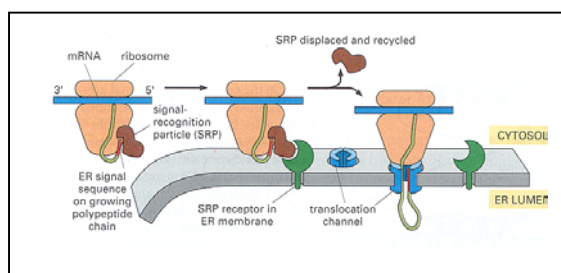
Transport av proteiner til membranen av endoplasmatisk reticulum:

Proteiner som skal til ER har en signalsekvens (består av ca 20 aminosyrer) som oftest utgjør den første sekvensen på peptidkjeden. Se figuren.

Denne signalsekvensen gjenkjennes av en signal-gjenkjennende partikkel (SRP) i cytosol, og binder seg til signalsekvensen. SRP sirkulerer mellom cytosol og membranen på ru ER. Proteinsyntesen stanser/går saktere så lenge SRP er bundet til signalsekvensen (skyldes sannsynligvis at partikkelen blokkerer for bindingsstedet for neste t-RNA).

SRP fører ribosomet med peptidkjeden som har signalsekvensen til ER. På membranen på ru ER sitter en reseptor for SRP. SRP binder seg til sin reseptor og dermed bindes ribosomet og peptidet til ER. Se figuren.

SRP løsner og går tilbake til cytosol. Proteinsyntesen fortsetter så på ER.



Proteinet passerer ER membranen:

Proteinet passerer gjennom en kanal assosiert med reseptoren for signal-gjenkjennende partikkel. Poren er dynamisk dvs den åpnes når signalsekvensen som er hydrofob plasseres i membranen på ER. Proteinet syntetiseres og trees samtidig gjennom poren (såkalt co-translasjon)

Når hele proteinet har passert ER membranen, og det bare er bundet til membranen ved signalpeptidet, "klippes" peptidkjeden av ved signalpeptidet. Signalsekvensen degraderes til aminosyrer og proteinet folder seg til sin native form.

Proteiner til membranen av mitochondria

Proteiner som skal til mitochondria har en signalsekvens på amino enden av polypeptidkjeden. Signalsekvensen består av noen positivt ladete aminosyrer, etterfulgt av en amfipatisk sekvens. Den amfipatiske sekvensen består ofte av ca 20-25 polare og upolare aminosyrer som kan danne en helix som strekker seg gjennom membranen.

Signalsekvensen gjenkjennes av chaperones som binder seg til proteinet og forhindrer at proteinet foldes helt opp slik at det blir lettere å transportere det inn i mitochondria.

Proteinet med chaperones diffunderer rundt i cytosol og kolliderer med mitochondria der signalsekvensen gjenkjenner sin reseptor på den ytre membranen som omslutter mitochondria.

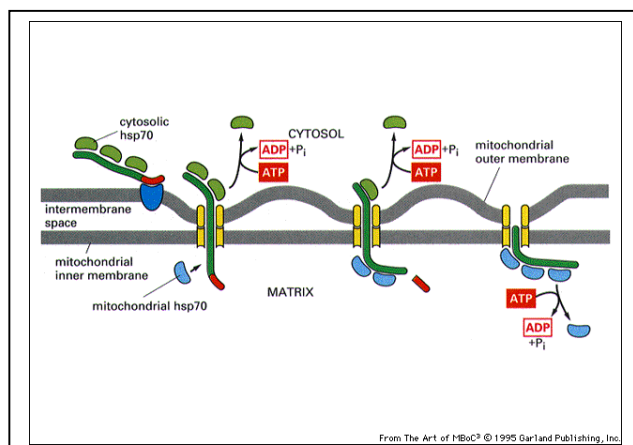
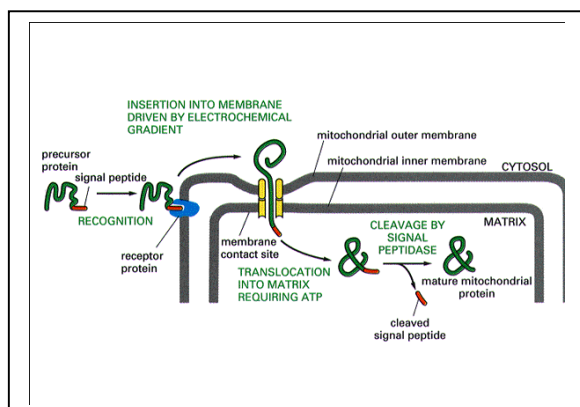
Chaperone forlater da proteinet og ATP hydrolyseres.

Proteiner inn i matrix-rommet av mitochondria

Proteinet transporteres inn i matrix rommet gjennom spesielle kontaktpunkter der den ytre og indre membranen er i kontakt med hverandre kalt protein translokator. Proteinet kan dermed transporteres gjennom de to membranene samtidig (se figur).

Transporten gjennom disse protein translokatorene krever ATP, idet proteinet må foldes opp. Chaperoner i matrix rommet bidrar til å transportere proteinet gjennom translokatoren ved å "dra" proteinet gjennom translokatoren.

Når proteinet er i matrix rommet kapper en peptidase i matrix rommet signalsekvensen av og proteinet foldes.



Proteiner til membranen av kjernen

Proteiner som skal til kjernen har en spesiell aminosyresekvens kalt kjerne-import-signal inne polypeptidkjeden. Proteinets syntetiseres på frie ribosomer i cytosol og et protein i cytosol kalt kjerne-import-reseptor gjenkjenner kjerne-import-signal og bindes til denne. Kjerneproteinets med kjerne-import reseptor kolliderer med kjerneporekomplekset og bindes til fibrillene som strekker seg ut i cytosol (se figur). Binde til en FG-repeterende sekvens.

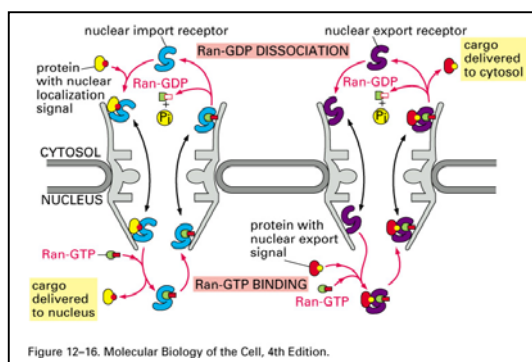
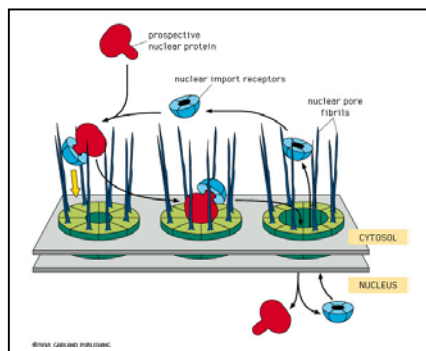
Proteiner inn i kjernen

Kjerneproteiner transportes inn i kjernen gjennom kjerneporekomplekset.

GTP bindende protein kalt Ran driver transporten gjennom kjerneporekomplekset (se figur).

I cytosol er GDP bundet til Ran og sørger for at proteinet med kjerne-import-reseptor transportes langs fibriller ved at det beveger seg fra en FG sekvens til den neste, dvs bindes til en FG sekvens, dissosierer, bindes til neste osv. til proteinet er inne i kjernen.

Signalsekvensen spaltes ikke av.



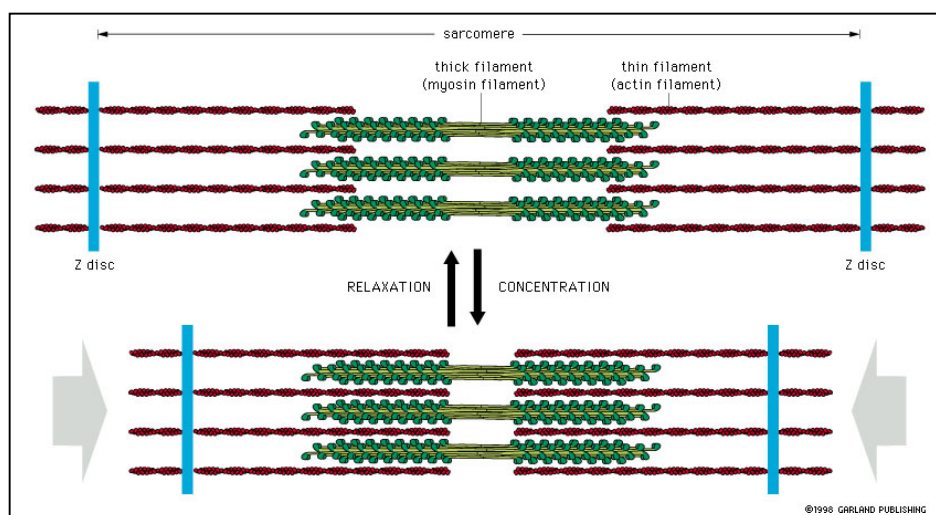
Forskjellene på import av proteiner til de tre organellene:

	ER	Mitochondria	Kjerne
Til membran	Bruker signal-gjenkjennede partikkel	Ingen hjelp	Bruker kjerne-import reseptor
	Syntetiseres mens det passerer membran	Ferdig syntetisert før det passerer membran	Ferdig syntetisert før det passerer membran
Gjennom membran	Ikke foldet	Ikke foldet	Foldet
	Spesiell translokator	Spesiell translokator	Fibriller langs kjerneporekompleks

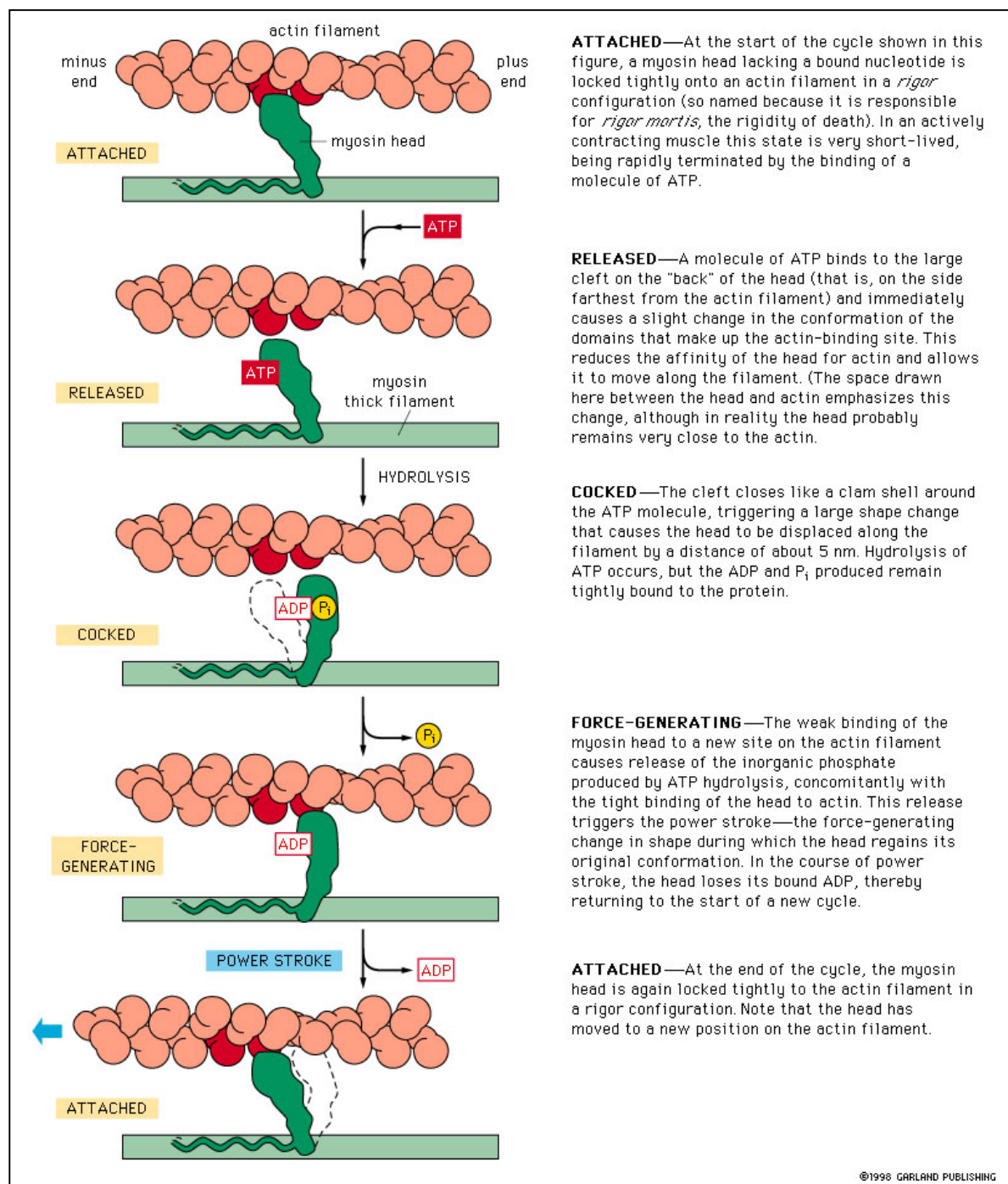
b) Muskelkontraksjon

Myofibriller består av repeterende sarcomerer bestående av tynn og tykk filament organisert som figur viser. Tynn filament består av aktinfilament (to identiske kjeder bestående av det globulære proteinet aktin tvunnet sammen i en dobbelt helix) og proteinene tropomyosin og troponin. Tropomyosin (aktin-bindende) ligger langs aktinfilament. Troponin er et proteinkompleks med bindingssted for tropomyosin og Ca^{2+} . Tynn filamentene er forankret i proteiner som danner z-disken

Tykk filament består av proteinet myosin (en dobbelt helix med to globulære hoder). Myosinhodet har bindingssteder for aktin og ATPase aktivitet. Myosinhodet danner kryssbruene mellom tynn- og tykk filament.



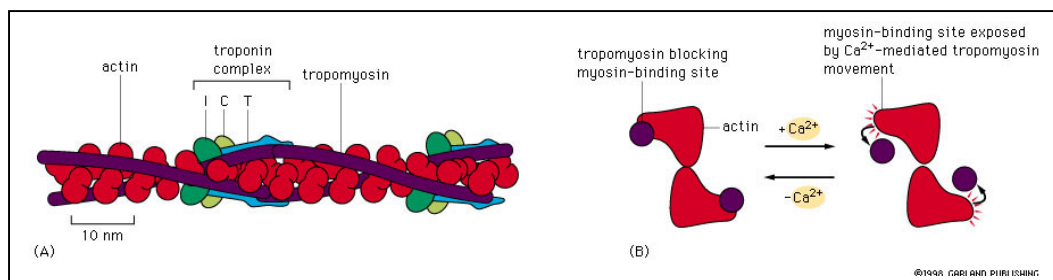
Myosin vandrer langs aktinfilamentet slik at sarcomerer kan kontraheres ved såkalt syklisk kryssbru som vist på figur.



Når Ca^{2+} øker i cytoplasma binder Ca^{2+} seg til proteinet troponin på tynnfilamentet.

- I en muskel som slapper av vil proteinet tropomyosin på tynn filamentet blokkere bindingsstedet for myosin på aktin. Tropomyosin holdes i denne posisjonen av troponin.

- Når Ca^{2+} binder seg til troponin, endrer troponin sin konformasjon slik at det drar tropomyosin vekk fra bindingsstedet for myosin på aktin. Dermed kan myosinhodet binde seg til aktin og den såkalte "kryss-bru" syklusen igangsettes og muskelen kontraheres.

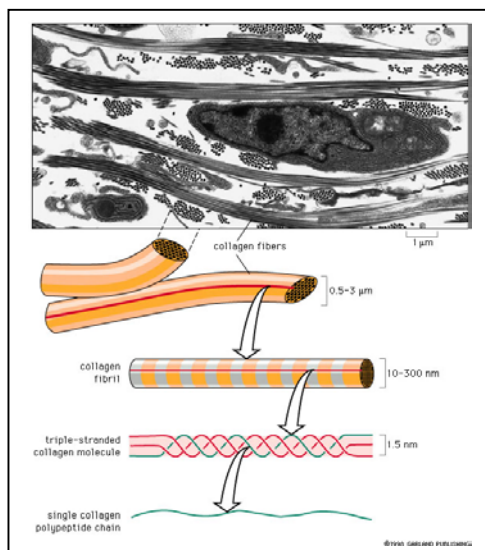


c) Ekstracellulær matrix

Ekstracellulær matrix består av et nettverk av proteiner og polysakkarider.

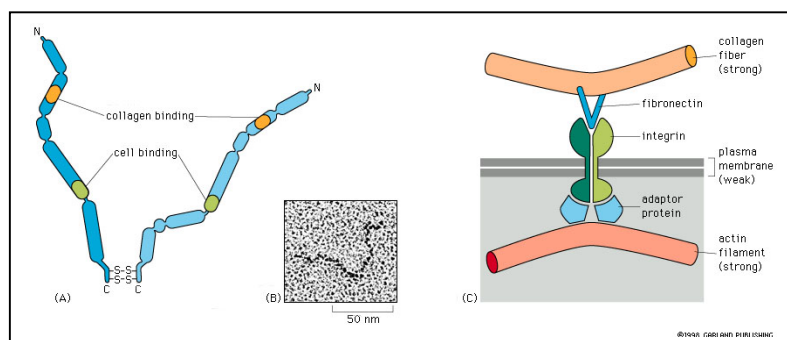
Collagen struktur: består av 3 α -helix polypeptidkjeder. α -helixen har en aminosyre sekvens karakterisert ved $(\text{Glycine-X-Y})_n$, glycine befinner seg altså i hver 3. posisjon. De 3 α -helixene holdes sammen av hydrogen bindinger. Collagen molekyler går sammen og danner fibre av ulik diameter og lengde. Collagen α -helixer organiseres i fibriller (10-300 nm i diameter) og videre i fibre (flere μm i diameter).

Funksjon: Gi vevet mekanisk styrke slik at det tåler strekk-krefter.



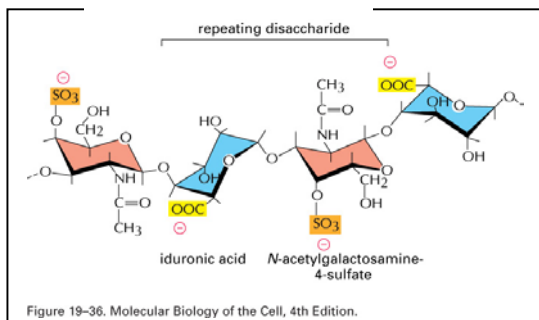
Fibronektin struktur: består av to nesten identiske polypeptidkjeder, holdt sammen med to disulfat bruer ved COOH-enden. Fibronetin har bindingssteder for blant annet reseptorer på plasmamembranen. Det er aminosyresekvensen RGDS som bindes til fibronektin reseptoren på celleoverflaten. Fibronektin har bindingssteder for komponenter i ekstracellulær matrix som collagen, glykosaminoglykaner og andre fibronektin molekyler.

Funksjon: Forankrer cellen i ECM ved at det binder seg til integrin fibronektinreseptor på overflaten av cellen og bindes seg til andre komponenter i ECM.

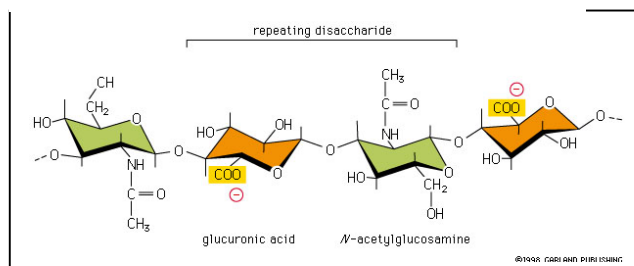


Glykosaminoglykaner (GAG) Struktur: er lange polysakkarid-kjeder uten sidearmer, bestående av en repeterende di-sakkarid enhet der ett av de to sukkerene alltid er enten acetylglukosamin eller acetyl-galactosamin.

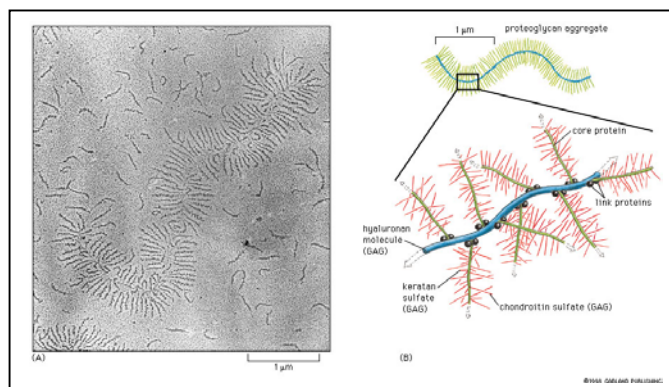
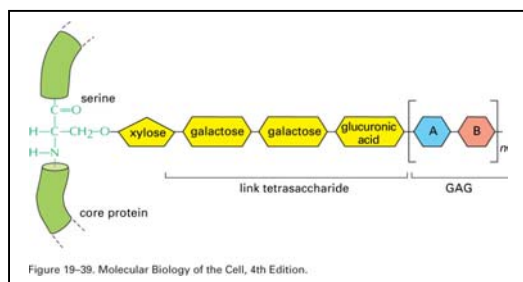
GAG



Enkleste GAG er hyaluronsyre



Proteoglykaner Struktur: består av et kjerne protein med lange sidearmer av glykosaminoglykaner bundet til serine i proteinet hverandre via et tetrasakkarid (se figur) Proteoglykaner kan danne store kompleks der proteoglykanen er bundet til en akse bestående av et glykosaminoglykan kalt hyaluron syre som figuren viser.



Funksjon glykosaminoglykaner

1. Danner geler som fiberproteiner "flyter"
Negative ladninger på glykosaminoglykaner:
⇒ kationer (Na^+) tiltrekkes, osmotiske aktive
⇒ store mengder vann inn i ekstracellulær matrix
2. ⇒ Rask diffusjon av næringsstoffer, metabolitter, hormoner og liknende mellom blod og celler
3. ⇒ Stort væsketrykk som motstår ytre trykk krefter

Funksjon Proteoglykaner

Regulerer trafikken/aktiviteten av molekyler mellom celler

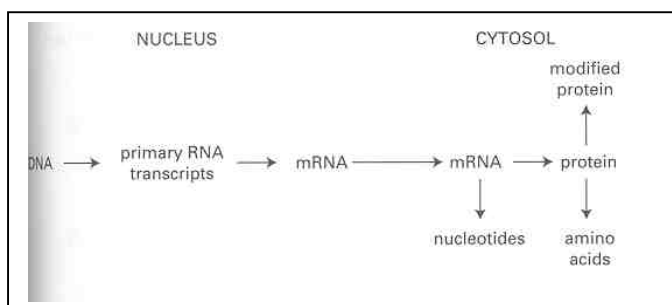
- Kjemiske signalmolekyl mellom celler
- Proteiner (enzymer) som skilles ut av celler

Signalmolekyler/proteiner bindes, det medfører:

- immobilisering /begrenset aksjonsradius
- aktiviteten blokkeres
- fungerer som reservoar for seinere frigjøring av proteiner
- beskytter proteiner mot proteolytisk nedbryting
- konsentrasjonen av proteiner endres

Oppgave 3

- a) Hydrokarbonhalene blir kortere: vekselvirker mindre, fluiditeten øker
Hydrokarbonhalene er mettet: vekselvirkningen avtar, fluiditeten reduseres
- b) De 5 α -helixene er plassert i plasmamembranen slik at de hydrofobe sidekjedene vender inn i det doble lipidlaget og de hydrofile sidekjedene ut i den vandige kanalen.
- c) Usant. Karbohydratene vender alltid vekk fra cytosol enten ekstracellulært eller inn i lumen av organellen. Det skyldes at sukkerkjedene festes på proteinet i lumen av endoplasmatisk reticulum og vender inn i transportvesikler. Når membranen rundt transportvesikler smelter sammen med plasmamembranen eller membranen av en organelle "venges" transportvesikkelen slik at det som sitter i membranen og er vendt inn i lumen av vesikkelen sitter i membranen vesikkelen smelter sammen med vendt mot lumen av organellen eller ekstracellulært. Ekstracellulært tilsvarer altså topografisk lumen av en organelle.
- d) Mest permeabelt er CO_2 (lite upolart molekyl), etterfulgt av H_2O (lite polart molekyl), glukose (stort polart molekyl), Ca^{2+} , (lite ladet molekyl), RNA (stort ladet molekyl).
- e) Mg^{2+} , H^+ har en liten konsentrasjonsgradient og vil ikke fungere i koplet transport.
 Na^+ og Ca^{2+} går inn i cellen med sin konsentrasjons gradient og kan koples til et positivt ion som transporteres ut av cellen eller et negativt ion inn i cellen
 K^+ går inn ut av cellen med sin konsentrasjons gradient og kan koples til et negativt ion som transporteres inn i cellen eller positivt ion ut av cellen
 Cl^- går inn i cellen med sin konsentrasjons gradient og kan koples til et negativt ion som transporteres ut av cellen eller et positivt ion inn i cellen.
- f)
- | | |
|--|---|
| mRNA degradation control | mRNA $\rightarrow$ nucleotides |
| protein activity control | protein $\rightarrow$ modified protein |
| protein stability control | protein $\rightarrow$ amino acids |
| RNA processing control | primary RNA transcript $\rightarrow$ mRNA |
| nuclear exporting and localization control | mRNA nucleus $\rightarrow$ mRNA cytosol |
| transcriptional control | DNA $\rightarrow$ primary RNA transcript |
| translation control | mRNA $\rightarrow$ protein |



- g) Interfase kromosomer inneholder både mørkt fargede *heterokromatin* og lysere fargede *eukromatin*
- En tråd av nukleosomer tvinnes opp ved hjelp av *histone H1* til å danne en mer kompakt *30 nm fiber*
 - Nukleosomer er adskilt fra hverandre ved *linker* DNA.
 - Etter mitose vil mitotisk kromatin *dekondensere* for å danne interfase kromosom

h) Sekvensen Not I som har en gjenkjennelsesekvens på 8 basepar lager DNA sekvenser med lengde $4^8=65536 \approx 70$ kbasepar. Vi derfor bruke dette enzymet. De andre enzymene lager for korte DNA sekvenser $4^4=256$ basepar, $4^6=4096$ basepar, eller for lange DNA sekvenser $4^{12}=16,7 \cdot 10^6$ basepar

i) DNA sekvenser er fra 5'enden- ATGTCAGTCCAG.

j) *Adaptin*: Funksjonen til adaptin er å binde klatrin til cargo-resptoren. Dersom adaptin mangler vil ikke klatrin kunne bindes og da vil det ikke være nødvendig krefter for å danne vesikkelen, dvs det dannes ingen vesikkel

Klatrin: Dersom klatrin mangler vil det ikke være nødvendig krefter for å danne vesikkelen, dvs det dannes ingen vesikkel

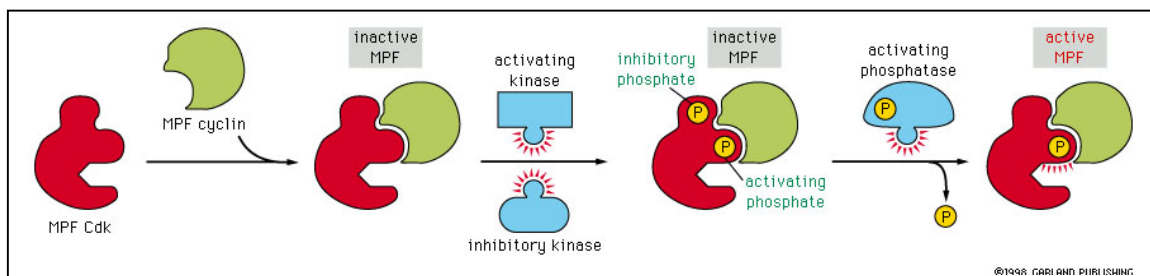
Dynamin: Funksjonen til dynamin er å knipe av vesikkelen fra cellen ved GTP hydrolyse. Dersom dynamin mangler blir vesikkel sittende fast på plasmamembranen, dvs ingen vesikkel i cytosol dannes.

k) Dersom den mutante tyrosin kinase reseptoren mangler den ekstracellulære delen av reseptoren kan ligand ikke bindes. Det kan da bindes til den normale tyrosin kinase reseptoren som kan danne dimerer og aktivere celledisignalisering slik at cellen oppfører seg normalt.

Dersom den mutante tyrosin kinase reseptoren mangler den intracellulære delen av reseptoren kan ligand bindes, men da kinase domene mangler vil signaloverføringen ikke skje. Fordi det er et mye større antall mutante tyrosine kinase reseptorer vil det være få tilgjengelige ligander til den normale reseptoren. Dersom den normale reseptoren binder en ligand vil reseptoren sannsynligvis danne en dimer med en mutant reseptor som mangler kinase domene og signaloverføring vil ikke skje. Cellen vil ikke kunne respondere på ligandet.

l) Arrest etter S-fase kan skyldes: B. Inaktivering av en protein kinase som virker på MPF Cdk, C. inaktivering av en fosfatase som virker på MPF Cdk og D. aktivisering av fosfatase som fjerner alle fosfatgrupper på MPF.

Aktivisering av MPF krever først at MPF fosforyleres dvs en kinase er nødvendig, deretter skal en av fosfatgruppene fjernes dvs at en fosfatase er nødvendig (se figur). Cellen vil derfor arresteres i mitose (etter S-fase) dersom kinasen og fosfatasen som gjør dette inaktiveres. Dersom alle fosfatgruppene fjernes vil også cellen arresteres i mitose.



m) Ved eksponering av ioniserende stråling vil cellens DNA skades og cellen arresteres ved inngangen til G1. Celle arrest skyldes hendelser i denne rekkefølgen:

DNA skades $\Rightarrow$ aktivisering av p53 $\Rightarrow$ produksjon av p21 $\Rightarrow$ inaktivering av cyclin-Cdk kompleks

- n) Egenskaper ved intermediært filament monomerer som skiller dem fra monomerer som danner aktinfilament og mikrotubulus:
- B. De er fibrøse istedenfor globulære
 - C. De binder ikke og hydrolyserer nukleotider
 - D. Det er forskjellige typer monomerer i forskjellige celletyper
- o) - Dersom mikrotubulus skal begynne å vokse må tubulin-GTP adderes til pluss enden raskere enn tubulin-GTP hydrolyseres og tubulin-GDP faller av slik at en tubuli-GTP cap dannes
- Dersom GDP var bundet til tubulin istedenfor GTP ville aldri tubulin kunne polymerisere slik at mikrotubulus ville krympe til det ble borte.
- p) A-cadherin – 3. desmosomer og 5. adhesjons kontaktpunkt
B- collagen – 4. basal lamina
C-connexon protein – 6. Gap junction/kanal kontaktpunkt
D- integrin – 7. hemidesmosom
E-keratin – 3. desmosomer, 8. hemidesmosome og 2. cytoskjelettet
F- laminin – 4. basal lamina