

Forslag til besvarelse eksamen TFY4260 Cellebiologi og cellulær biofysikk

23. mai 2012

Oppgave 1: Plasmamembranen. Aksjonspotensial. Transport av neurotransmitter

a) Plasmamembranen består av lipider, proteiner og karbohydrater.

- De finnes tre grupper av lipider: fosfolipider, kolesterol (steroler) og glykolipider.
- Lipidene er amfipatiske, og de danner spontant et dobbeltlag i vannløsning.
- Fosfolipidene består av et polart hode forbundet til to fettsyre kjeder med en fosfatgruppe og glycerol.
- Lipidene orienterer seg slik at det polare hodet vender utover mot membranens overflate, dvs mot vannoppløsningen i cellens ekstracellulære omgivelser eller cytosol. De hydrofobe halene vender innover i membranen.
- Kolesterol legger seg mellom fosfolipidene slik at de polare hodene vekselvirker.
- Karbohydratene er festet til lipider og proteiner på ekstracellulær side av membranen

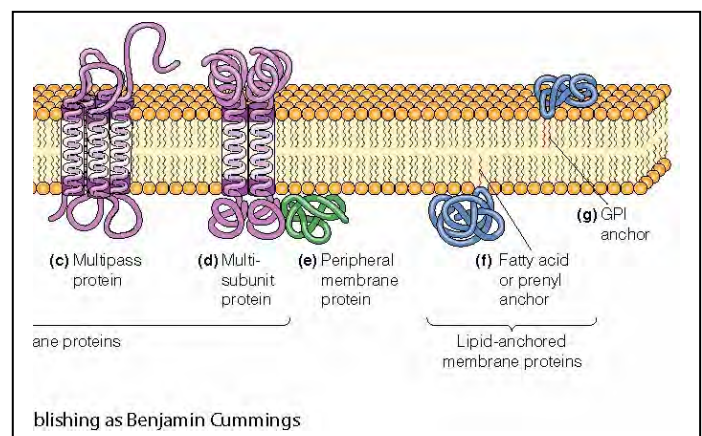
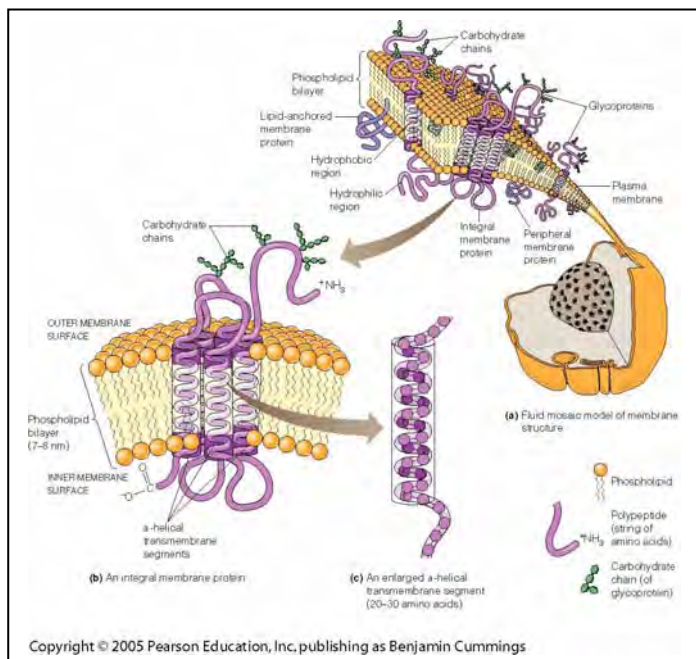
- Proteinene "flyter" i lipidlaget. Fluid mosaikk modell.

- Det finnes tre grupper av membranproteiner: integral proteiner, perifere proteiner og fettsyrekjede-forankrede proteiner..

- Integral proteiner er amfipatiske og det hydrofobe området strekker seg inn i lipid-dobbeltlaget, enten delvis inn i lipid-dobbeltlaget, eller gjennom hele, såkalt transmembran proteiner. Den hydrofobe delen av transmembranproteinet danner som regel en α -helix (20-25 hydrofobe aminosyrer) som strekker seg tvers over hele membranen. Transmembranproteinet kan bestå av mange hydrofobe områder som danner α -helixer som strekker seg mange ganger gjennom membranen. Hver α -helix er forbundet med en hydrofil del som befinner seg ekstracellulært eller i cytosol.

- Perifere proteiner er hydrofile og binder seg ikke-kovalent til polare membran overflater via elektrostatiske vekselvirkninger og hydrogenbinder. De perifere proteinene vekselvirker både med den hydrofile delen av integralproteiner og til fosfolipidhodene.

- Lipid-forankrede proteiner er hydrofile og kovalent bundet til lipidmolekyler i lipidlaget. Proteinene er forankret til membranen på cytosolsiden via en fettsyrehale og på ekstracellulærsiden via glykolipidet glycosylfosfatidylinositol (se figur)



b) Aksjonspotensialet

Ionestrømmer fra foregående aksjonspotensial induserer en depolarisering og et gradert potensial som igjen danner aksjonspotensialet dersom endringen i membranpotensial er større enn terskelverdien for dannelse av aksjonspotensial:

Aksjonspotensialet dannes ved at:

1. Spenningsfølsomme Na^+ kanaler åpnes endringen i membranpotensial

⇒ Na^+ strømmer inn i cellen

⇒ membranpotensialet depolariseres

⇒ spenningsfølsomme Na^+ kanaler åpnes og membranpot. depol. ytterligere.

2. Na^+ kanaler inaktiveres.

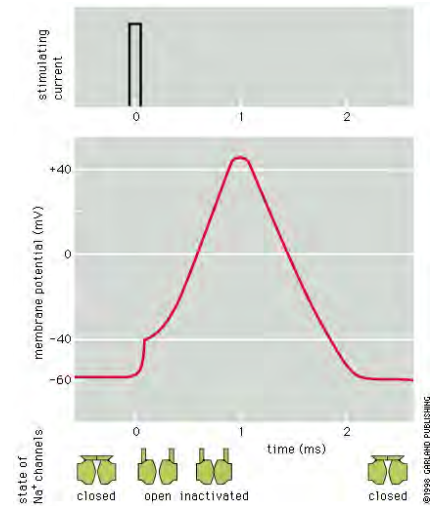
Dette skjer som en forsinket respons på endringen i membranpot

Idet Na kanalene åpnes trigges også inaktivering og påfølgende lukking av Na kanalene samt åpning av K^+ kanaler (se figur)

3. Spenningsfølsomme K^+ kanaler åpnes

⇒ K^+ strømmer ut av cellen

⇒ membranpotensialet går mot hvilepotensialet, hyperpolariseres, før hvilepotensialet gjenopprettes.



Aksjonspotensialet forplaner seg langs axonet ved at ionestrømmer går langs axonet og depolariserer neste segment av axonet uten myelin eller til Ranviers knute i axon med myelin. Dette fører til at spenningsfølsomme Na^+ kanaler og K^+ kanaler åpnes og et nytt aksjonspotensial dannes.

c) Transport langs axon

Skjer ved at neurotransmitterer transporteres i vesikler langs mikrotubulus.

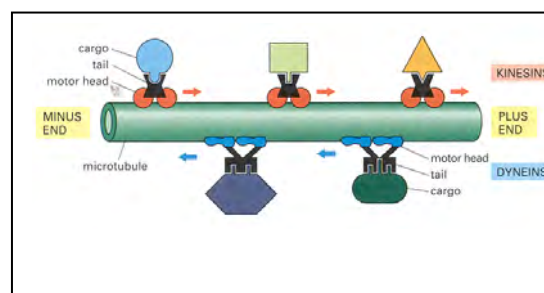
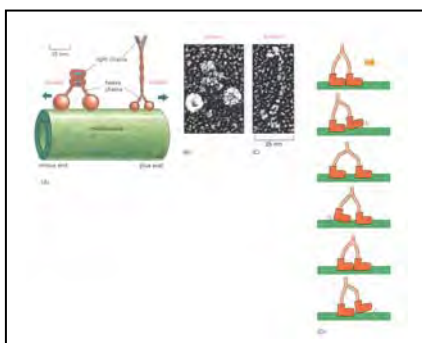
Vesikler transporteres langs mikrotubulus ved hjelp av motoriske mikrotubulus assosierte proteiner som kinesin og cytoplasmisk dynein. (Kinesin går fra minus enden mot pluss enden, og cytoplasmisk dynein går motsatt vei).

De motoriske mikrotubulus assosierte proteinene består av to tunge kjeder tvunnet rundt hverandre, og to lette kjeder ved COOH enden.

Amino-enden av proteinene har to globulære hoder med ATPase aktivitet.

Disse globulære hodene bindes til mikrotubulus.

Vesikkelen bindes til COOH enden.



De motoriske proteinene beveger seg langs mikrotubulus ved bruk av ATP:

1. ATP bindes til de motoriske proteinene ⇒ konformasjonsendring av proteinene
2. $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$ ⇒ konformasjonsendring og
3. De motoriske proteinene beveger seg langs mikrotubulus
4. ADP og P_i frigjøres ⇒ konformasjonen gjenopprettes

Det hele gjentas og gir en bevegelse i en retning

Oppgave 2: Proteintransport og modifisering (Vekttall 2)

a) Glatt ER:

- Lipidsyntese
 - Fosfolipider i membraner
 - Steroidehormoner fra kolesterol
 - Lipoprotein-partikler som frakter lipider i blodbanen
- Detoxifiseringsreaksjoner
 - vannuløselig giftstoffer → vannløselige ⇒ skilles ut i urinen.
Skjer ved hydroksylering som avhenger av protein i cytokrom P450 familien
- Karbohydrat metabolisme
 - I absorptiv tilstand (rett etter matinntak): glukose → glukogen i lever celler
 - I postabsorptiv tilstand: glukogen → glukose
- Lager av Ca^{2+}
 - Ca^{2+} - ATPase pumper Ca^{2+} inn i ER. I muskelceller sarcoplasmatiske reticulum. Ca^{2+} må ut i cytosol for muskelkontraksjon.

I

Ru ER:

- Syntese av proteiner
 - 1) Membranproteiner
 - 2) Vannløselige proteiner:
 - Proteiner som skal skilles ut av cellen
 - Proteiner i lumen av organeller
- Karbohydrater festes til proteiner
- Kvalitetskontroll av proteiner: sjekker folding av proteiner og korreksjon for gal folding
- Danner multisubenheter proteiner

Hvilke funksjoner har glykosylering av proteiner:

Intracellulært:

- Markør for riktig protein folding
- Markør for proteinsortering
- Hindrer at proteaser bryter ned proteinet

Ekstracellulært / i plasmamembranen:

- Gjenkjennelse mellom celler
- Reseptor for ekstracellulære molekyler
- Hindrer angrep på cellen

b) Protein sortering

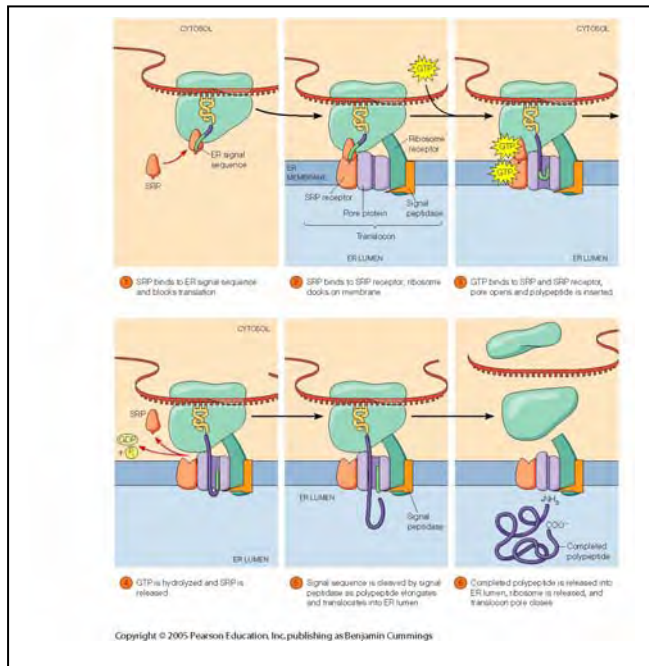
Transport av proteiner til membranen av endoplasmatiske retikulum:

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. Reseptoren er assosiert med et poreprotein som polypeptidkjeden kan gå gjennom. SRP binder seg til sin reseptor og dermed bindes ribosomet og peptidet til ER. Se figuren. GTP bindes til både SRP og SRP reseptor. Dette gjør at translasjonen fortsetter og signalsekvensen setter inn i pore

proteinet og kanalen i poreproteinet åpnes. GTP hydrolyseres til GDP. Dette medfører at SRP løsner og går tilbake til cytosol. Proteinsyntesen fortsetter så på ER.

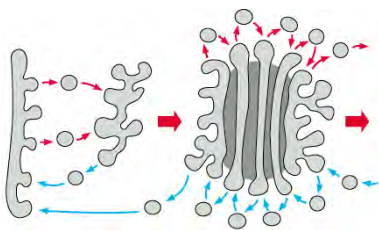


Proteinet passerer ER membranen:

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. Protein syntetiseres og går samtidig gjennom poren (såkalt co-translasjon)

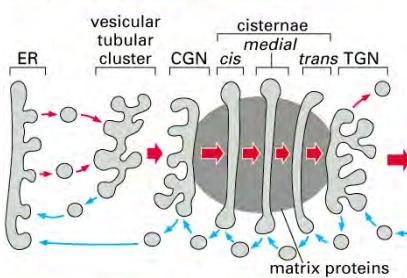
Når hele proteinet har passert ER membranen, og det bare er bundet til membranen ved signalpeptidet. En peptidase "klipper" peptidkjeden av ved signalpeptidet. Signalsekvensen degraderes til aminosyrer og proteinet folder seg til sin native form.

c) De to modellene for transport av lipider og proteiner gjennom golgi er:



(A) VESICULAR TRANSPORT MODEL

1. *Stationary cisternae modell*: Hvor hvert kompartiment (Cisterna) av golgi er en stabil struktur. Trafikking gjennom golgi foregår i denne modellen via transportvesikler som skilles ut fra en cisterna og vandrer videre til den neste med sitt innhold. Proteiner som skal til ulike deler av golgi, sekreteres ut eller sendes tilbake til ER blir fraktet med vesikler til sin lokalisering.



(B) CISTERNAL MATURATION MODEL

2. *Cisternal maturation modell*: Hver cisterna går gradvis over fra å være i cis-golgi netverket til å bli trans-golgi i en modningsprosess. I modningsprosessen tilføres hvert kompartiment de nødvendige enzymer og lipider i en konstant prosess, og de holdes igjen i riktig kompartiment av signaler i proteinene selv.

Eksperimentelle data støtter begge modellene, men i den senere tid har fluorescens mikroskopi avslørt at modell 2 er den mest sannsynlige. Dette også pga, størrelsen på en del molekyler som umulig kunne fraktes med små vesikler som er forutsetningen for modell 1.

Oppgave 3

a) cAMP aktivering

Syntese av cAMP krever at enzymet adenylate cyclase aktiveres av G protein. G protein har fått sitt navn fordi det har GDP/GTP bundet til seg. G proteinet består av 3 polypeptidkjeder, α , β , og γ , og er bundet til cytoplasmatiske side av plasmamembranen. Når GDP er bundet til α -kjeden er de tre kjedene bundet til hverandre, og G proteinet er inaktivt. Når GTP erstatter GDP dissosierer α -kjeden fra resten av G proteinet, og α -kjeden aktiveres. Se figur.

Adrenalin binder seg til sin reseptor på cellens plasmamembran. Dett er en reseptor av typen G-protein forbundet reseptor.

⇒ reseptoren aktiveres, bindes til G proteinet og katalyserer reaksjonen som erstatter GDP bundet til G proteinet med GTP

⇒ α -kjeden løsner fra resten av G proteinet og bindingsstedet for adenylate cyclase på α -kjeden eksponeres

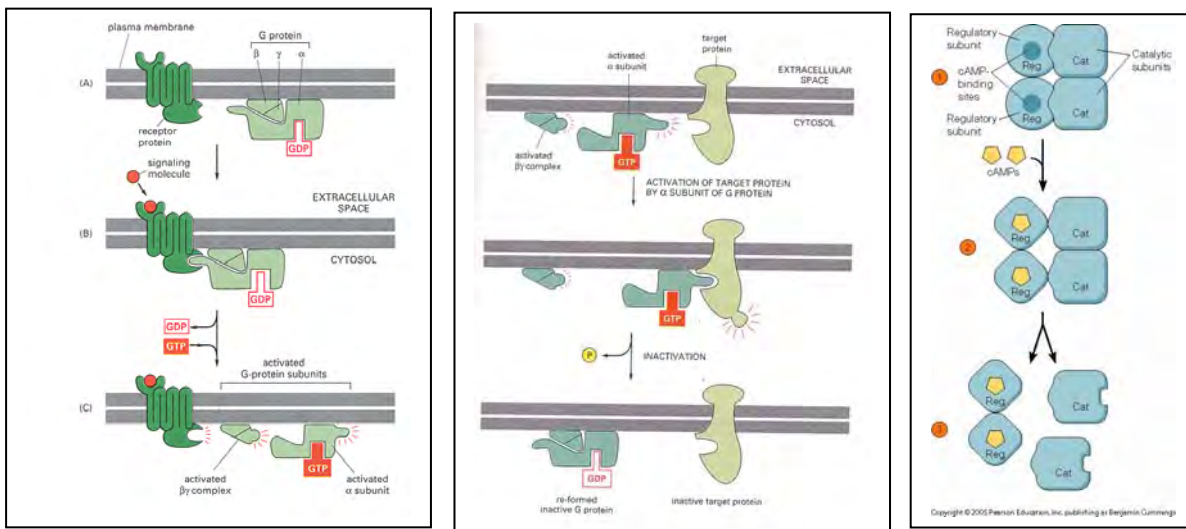
⇒ α -kjeden bindes til enzymet adenylate cyclase som aktiveres

⇒ adenylate cyclase katalyserer reaksjonen $\text{ATP} \rightarrow \text{cAMP}$. Se figur.

Varighet av cAMP aktivering:

α -kjeden har GTPase aktivitet og hydrolyserer $\text{GTP} \rightarrow \text{GDP} + \text{P}_i$ svært fort.

Men så lenge adrenalin sitter bundet til sin reseptor er denne aktivert og et nytt GTP vil erstatte GDP. Dvs at så lenge reseptoren er aktivert vil adenylate cyclase være aktiv og produsere cAMP.

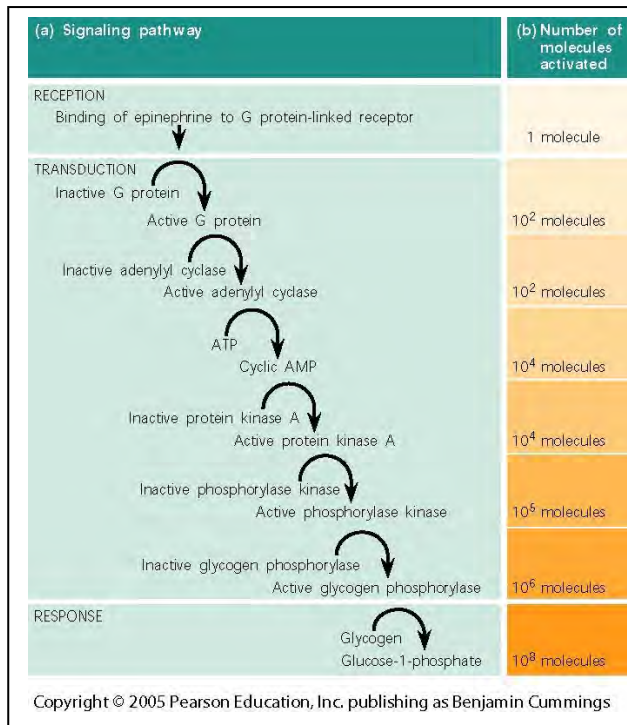


Funksjonen til cAMP: c-AMP virker ved å aktivere c-AMP avhengige protein kinaser, såkalte A-kinaser. Disse kinasene består av et proteinkompleks. Når c-AMP bindes gjennomgår proteinkomplekset en konformasjonsendring som frigjør og aktiverer de funksjonelle subenhetene av enzymet. Enzymet fosforylerer igjen andre intracellulære proteiner.

b) Forsterkning av responsen

Figuren nedenfor viser hvilke trinn der en forsterkning foregår.

Ikke forsterkning i trinnet cAMP til kinase aktivering. 2 cAMP/kinase



- Mange G-protein kan aktiveres
- Hvert G-protein kan aktiverer mange adenylyl cyclaser
- Hver adenylyl cyclase kan syntetisere mange cAMP
- Protein kinase A aktiverer mange fosforylase kinaser
- Fosforylase kinase aktiverer mange glycogen fosforylase
- Fosforylase bytter ned mange glukogen til glucose-1-fosfa

c) Tumor suppressor gener koder for:

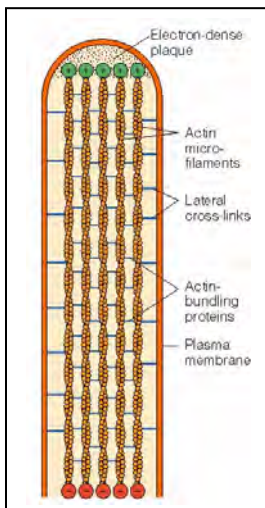
- p53 er cellens vakthund. Forhindrer at skadet DNA kan replikeres ved at celler med skadet DNA gjennomgår apoptose dersom DNA skaden ikke repareres. p53 fosforyleres og igangsetter to prosesser: arresterer cellen i G1 slik at den kan reparere DNA skaden. Dersom DNA skaden ikke repareres trigger p53 apoptose.

- Rb er cellens bremse, bremser celledeling. Proteinet regulerer restriksjonspunktet og avgjør om cellen skal gå inni S-fase. Rb sjekker at nødvendige vekstbetingelser er oppfylt og egenskaper ved cellen som ingen DNA-skade og cellen må ha en viss størrelse. Dersom betingelsene er oppfylt fosforyleres Rb og enzymer nødvendig for å gjennomføre S-fase syntetiseres.

- APC er et multiprotein ødeleggelse kompleks, involvert i Wnt sporet. APC bindes til proteinet Axin og glycogen syntase kinase. Dette medfører fosforylering av β -catenin som merkes for nedbryting via proteasomer. Dette inaktiverer Wnt sporet. En mutasjon i APC gjør at β -catenin ikke brytes ned og Wnt sporet er alltid skrudd på og celle proliferasjon gjennomføres.

Oppgave 4: Cytoskjelettet. Ekstracellulær matrix

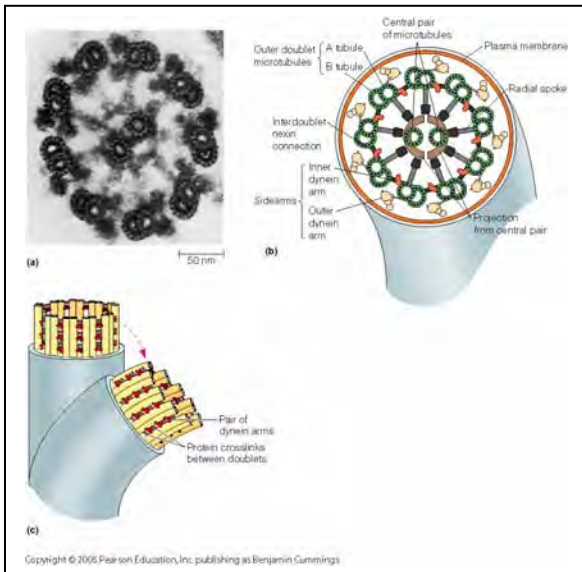
Strukturen av mikrovilli



Tette bunter av aktin-filament holdt sammen av:

- Aktinbindende proteiner: Fimbrin og villin
- Festet til plasmamembranen med myosin I og calmodulin
- Plussenden utover i en tett amorf (ikke-krystallinsk) ukjent substans
- Minusenden forankret i et nettverk i cytosol under plasmamembranen

Strukturen av flimmerhår



Flimmerhår består av mikrotubulus organisert i axonemer, 9 dubletter perifert i axonemet pluss to singletter sentralt som figur viser. To dubletter kan gli langs hverandre ved bruk av GTP bundet til proteinet dynein. Glidebevegelsen forhindres delvis a proteinet nexin som binder to dubletter sammen og av "eike" proteiner som binder dublettene til de sentrale mikrotubulus.

Hovedforskjeller:

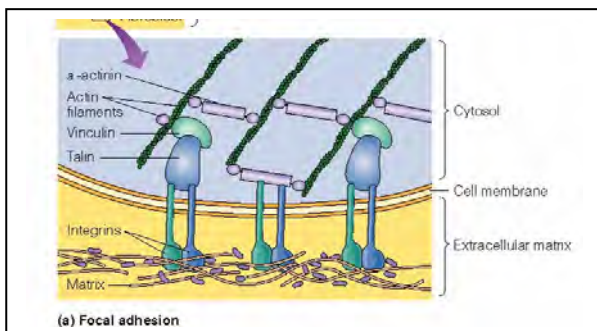
- Mikrovilli består av aktinfilament, flimmerhår av mikrotubulus
- Mikrovilli er statiske, flimmerhår dynamiske dvs de beveger seg.

Funksjonen

Mikrovilli: Øke absorpsjonsoverflaten : finnes på epitelcelle ri tarm der stor absorpsjonsfalte er nødvendig. Mikrovilli på overflaten av epitelceller øker overflaten ca 20x.

Flimmerhår: Beveger seg over epitelcellelag i luftveiene slik at støv og partikler fjernes.

b) Fokalpunkter



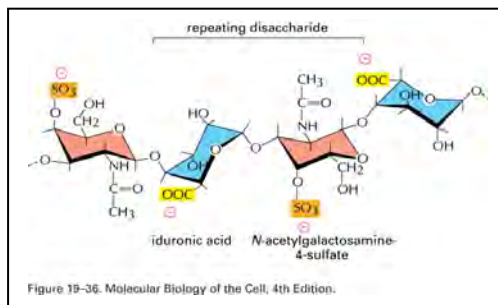
Cellens aktinfilament er forankret i ekstracellulær matrix (ECM) via fokalpunkter.

Fokalpunktene består av aktinbindende proteiner (vinkulin og talin) som er festet til transmembranproteiner kalt integriner. Integriner er bundet til ECM (collagen eller fibronectin). Se figur

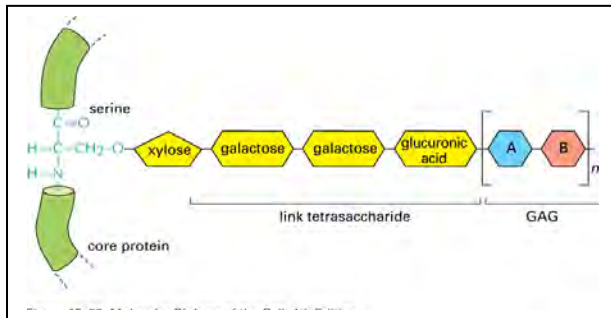
Hovedforskjellen mellom fokalpunkt og hemidesomosom er:

- at i fokalpunktet er aktinfilamentet forankret til ECM, men i hemidesmosomer er intermediært filament forankret til ECM via integriner og intermediært filament er bundet til integrinet via plakk av proteiner.
- Hemidesmosomer forbinder epitelceller til basalmembranen via laminin-reseptor som bindes til proteinet laminin i basal membranen.

c) Oppbyggingen av GAG og proteoglykaner



Glykosaminoglykaner består av lange uforgreinete repeterende disakkarider. En av sukkerenhetene alltid er N-acetylglukosamin eller N-acetylgalakosamin. Den andre er ofte galaktose eller glukuronat. De tre vanligst typene er keratan sulfate, kondroitin sulfate og hyalurononate. Hylauronoate skiller seg ut ved at det ikke inneholder sulfatgrupper.



Proteoglykaner er GAG forbundet til et protein via en linker tetrasakkarid.

Funksjoner:

- Danner gel som fiberproteiner "flyter" i.
- Negative ladninger tiltrekker kationer og vann slik at gelen har et stort væsketrykk som motstår ytre trykk krefter.
- Regulerer trafikken/aktiviteten av celler, næringsstoffer/avfallsstoffer og molekyler (kjemiske signalmolekyl/enzymer) ved å begrense transport gjennom ekstracellulær matrix og binde signalmolekyler/proteiner

Fibronektin er et adhesivt protein bestående av mange domener med bindingssteder til ulike bestandeler i ECM. I tillegg inneholder det peptidsekvensen RGD som bindes til integrin fibronektin reseptor.

Oppgave 5: Immunologi

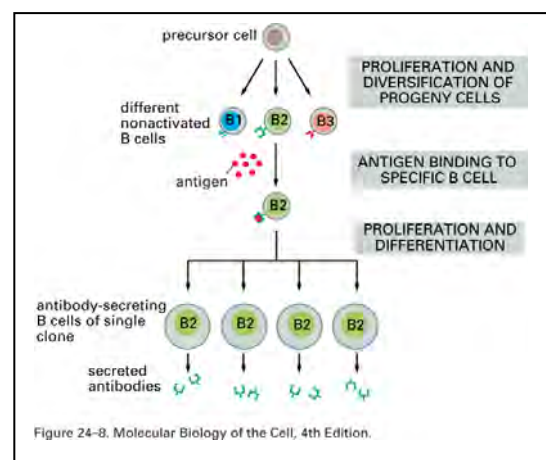
Klonal seleksjonsteorien for B-celler.

1. Hver B-celle lages for å syntetisere et antistoff
B-celler lages av stamceller og hver celle gjennomgår DNA rearrangering som gir opphav til genet for antistoffet som hver B-celle kan produsere. Dette gir opphav til et enormt antall forskjellige antistoffer

2. B-cellene produserer antistoff uten at de stimuleres med antigen.

B-cellene produserer antistoffet og det plasseres på overflaten, med det antigengjenkjennende delen ut. De fleste B-cellene trengs ikke, men det store repertoaret gjør at "alle" antigen kan detekteres.

3. B-celler selekteres av antigenbinding og B-cellen aktiveres noe som gir massiv antistoffproduksjon.



B-cellene aktiveres av antigen. Enten av bare antigen eller som oftest også sammen med T-hjelpeceller (CD4-T-celler). Aktiveringen fører til proliferasjon av den ene B-cellen, som gir en økning i antallet B-celler (danner en klon) som lager det riktige antistoffet. De aktiverte B-cellene utvikles til to celletyper.

Den ene celletypen kalles plasmaceller og produserer og sekreterer store mengder antistoff. For å få til denne prosessen har plasma-cellen store mengder ru ER for å sikre stor proteinproduksjon og effektiv sekresjon. Plasmaceller lever kun kort tid etter at antigenet er forsvunnet.

Vaksine

Den andre typen B-celler er hukommelsesceller. Disse lager ikke antistoff, men aktiveres av antigenet om det møter det igjen. Denne aktiveringen er raskere enn den initiale aktiveringen, og ved aktiveringen vil en del av hukommelses B-cellene prolifere og bli plasmaceller som kan produsere antistoff. Den sekundært immunresponsen er mye raskere og vil kun ta timer, men den initiale responsen tar flere dager. Hukommelses B-cellene er bakgrunnen for at vi kan lage vaksiner for en del bakterier og virus. Vi injiseres da med et antigen vi ønsker å beskytte oss mot.

Oppgave 6 (Vekttall 1)

I denne oppgaven får dere angitt 3 svar, hvorav ett er riktig. Sett kryss ved siden av det riktige svaret. Lever oppgavearket merket med studieprogram, studentnr, og sidetall.

- a) Dersom plasmamembranen ble permeabel for Na^+ og K^+ , hva ville Na^+/K^+ pumpa gjøre:
 - Hemmes å slutte og pumpe
 - Pumpe Na^+ og K^+ i begge retninger
 - **Fortsette å pumpe Na^+ ut av cellen og K^+ inn i cellen, og hydrolysere ATP, men energien ved hydrolyse vil være bortkastet idet varme produseres istedenfor ionegradient.**
- b) Proteiner passerer membranene av mitokondrier:
 - i en foldet tilstand
 - ufoldet ved kotranslasjon
 - **ufoldet etter at translasjonen er avsluttet**
- c) Histoner passerer gjennom kjerneporekomplekset ved:
 - **Passiv diffusjon**
 - Krever ATP
 - Krever G-bindende protein
- d) Kromatidtrådene trekkes til hver sin spindelpol i:
 - metafase
 - **anafase**
 - telofase
- e) Under celledeling brytes kjernekonvolutten opp i:
 - Interfase
 - Profase
 - **Prometafase**
- f) RNA syntetiseres gjennom cellesyklus i:
 - **Hele interfasen**
 - G1-fasen
 - S-fasen

g) rRNA syntese foregår:

- **i nukleolus**
- i ribosomer i cytosol
- i endoplasmatisk reticulum

h) Organellen som sannsynligvis stammer fra en annen organisme er:

- Lysosomer
- Golgi apparatet
- **Mitokondrier**

i) Sorteringssignalet bestemmer hvor i cellen et protein skal transporteres.

Til hvor i cellen vil et protein uten sorteringssignal bli transportert?

- Kjernen
- **Cytosol**
- Mitokondriene

j) Du ønsker å detektere karbohydrater på plasmamembranen. Hvilket av de følgende molekyler kan da benyttes:

- **Lektiner**
- Cadheriner
- Integriner

k) v-SNARE deltar direkte i

- dannelse av transportvesikler
- transporten av vesikler
- **bindingen av vesikler til target organelle**

l) Kontraksjon av glatt muskulatur krever at intracellulær konsentrasjon av Ca^{2+} øker. Dette skjer ved at Ca^{2+} ionekanaler åpnes i:

- **Plasmamembranen**
- Mitochondria
- Sarcoplasmatisk reticulum

m) I genregulering er lac-operonet mye studert. Hva skjer om en muterer lac-repressoren slik at den ikke lenger kan binde laktose, men fortsatt kan binde seg til operatoren?

- **Ingen transkripsjon av lac-genene.**
- Full transkripsjon av genen.
- Høy nedbryting av laktose

n) Etter transkripsjon av DNA i en eukaryot celle modifiseres primærtranskriptet til et mRNA-molekyl. Hvilke av utsagnene under er rett beskrivelse av modifikasjonen av primærtranskriptet?

- **Primærtranskriptet kuttes og limes (ligeres) sammen på nytt uten introner**
- Primærtranskriptet kuttes og limes (ligeres) sammen på nytt men uten exoner.
- Primærtranskriptet limes (ligeres) sammen med en polyAdenosin hale.

o) Enzymer gjennomgår ofte post-translasjonelle endringer som en del av regulering av enzymaktiviteten. Hvilken av de følgende endringene vil være irreversible?

- Aktivering ved fosforylering
- **Proteolytisk aktivering av proenzym**
- Poly-ubiquitinylering

p) I hvilken tilstand foreligger DNA hovedsakelig i cellekjernen?

- **Bundet til oktamere av histon og flere typer ikke-histon proteiner**
- I fri tilstand uten å være bundet til proteiner
- Tett bundet rundt ribosomale proteiner

q) Hva er en transkripsjonsfaktor?

- **DNA-bindende protein som regulerer genavlesingen**
- RNA-bindende protein som regulerer proteinsyntesen
- Kompleksdannende protein som regulerer nedbryting av transfer-RNA

r) Kroppens forsvar karakteriseres ved at aktivering av nødvendige celler ofte krever to signaler.

Hva er den beste forklaringen på at dette er hensiktsmessig?

- **Det gir større sikkerhet mot feilaktig aktivering**
- Det gir bedre målstyring av responsene
- Det gir bedre regulering av tempoet i aktiveringen