



Eksamen i biokemi - Eksamen i biokemi

BSc + MSc Odontologi

07 juni 2017

Planlagt: 09:00 - 13:00

Eksamensnr: 77

Plads: E01-062

Side 1 af 16

Oral biokemi

Opgave 1

a) Beskriv emaljens kemiske og strukturelle opbygning.

Emaljen består for mestendels af hydroxylapatitkrystaller (fremover HAP). Desuden andre mineraler såsom flourapatit samt emalje proteiner og vand. Procentvis fordeler disse komponenter sig således:

Mineral: ca. 96 %

H₂O: ca. 3 %

Emalje proteiner (herunder amelogeniner, non-amelogeniner og enzymer): ca. 1 %

HAP aflejres af den sekretoriske ameloblast under amelogenesis hvorefter nævnte celle går bort – dette er årsagen til at emaljen ej kan gendannes når denne først går tabt.

I teorien udgøres hver enkelt HAP af mange enhedsceller med formlen Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Dette forbliver dog en teoretisk anskuelse idet enhedscellen ej er en selvstændig struktur, men derimod blot et middel til redegørelse for HAP-komponenternes indbyrdes forhold. Flourapatit har samme kemiske struktur som HAP med den forskel at OH⁻ er substitueret med flourid.

En HAP er ca. 100-1000 nm lang og 40 nm bred og arrangeres under amelogenesis i såkaldte prismer og interprismer. Prismer og interprismer er egentlig misvisende betegnelser, da strukturerne de beskriver snarere er hexagonale under aflejring, siden nøglehulsformede som følge af trykpåvirkning under fortsat prismeaflejring. Derfor bruges ofte de engelske betegnelser *rods* og *interrods*.

Kemisk anskuet er prismer og interprismer ens, og forskellen består således i orientering.

Interprismer ligger perpendikulært indskudt mellem prismer, der i forlængelse af hinanden spænder mellem dentin og tandoverflade. Forskellen i orientering har morfologiske rødder i den tilærmelsesvist skrå flade (Tomes proces) hvorfra den sekretoriske ameloblast afgiver sit sekret. En prisme er ca. 4 µm bred og 8 µm lang og består altså af adskillige HAP. Selvom emaljen er menneskets hårdeste væv, findes i emaljen stadig porøsiteter benævnt interkrystalrum. Krystallerne er altså ikke sammensmeltede (hvilket skyldes amelogenin-modulering under amelogenesis), og nær tandens overflade, som følge af mere diffus HAP-orientering, er disse udvidede. Dette forklarer at udefrakommende substanser nemmere aflejres i tandoverfladens periferi, og dermed hvorfor caries nemmere opstår her.

b) Redegør for pellikel dannelsen på tænderne og hvordan den veludviklede pellikel er opbygget.

I mødet med saliva beklædes emaljeoverfladen med et elektrisk dobbeltlag, bestående inderst af negativt ladede fosfationer (fra overfladen af selve emaljen), og yderst langt overvejende af positivt ladede calciumioner. Dette yderste lag benævnes hydrationslaget.

Til hydrationslaget binder sig negative proteiner og glykoproteiner fra spytet hvormed pellicelen opstår og beskytter tanden mod bakterieadhæsion vha. ladningsfrastødning og antibakterielle egenskaber.

Proteiner i den tidlige pellicel

Sure, prolinholdige

Statherin-rige

Histatin-rige

Glykoproteiner

Proteiner i den sene pellicel

IgA: bakterieaggregerende

Lactoferrin: binder jern (vigtigt bakteriesubstrat)

Lysozym: membranlyse

Kulsyreanhydrase: ansvarlig for bicarbonatbufferen (optimal ved pH = 6)

Alfa-amylase: nedbryder 1,4-glykosidbindinger i stivelse

Lipase: nedbryder esterbindinger i TAG

Muciner

M.fl.

c) Redegør for den initiale kolonisering af bakterier på tænderne.

Som nævnt i ovenstående beklædes tandoverfladen i mødet med saliva, af negativt ladede slyt(glyko)proteiner hvormed bakterieadhæsion begrænses med 90 % set i forhold til forsøg i saliva-frie miljøer – dette skyldes at tandoverfladen nu frastøder de naturligt negativt ladede bakterier (lipoteikoidsyre). I mødet med saliva genvinder bakterierne dog, populært sagt, en smule territorium da de her gøres en *anelse mindre* negative og dermed i nogen grad hydrofobe – ligesom tanden (bemærk at dette refererer til absalondokumentet pellicle formation, hvis udlægning af førnævnte er anderledes end hvad vi blev præsenteret for i undervisningen). En bakterieres succesfulde adhæsion til tandoverfladen er derfor et sammenspil mellem ladningsfrastødning (adhæsionshæmmende) og hydrofobe egenskaber (adhæsionsfremmende) – desuden Van der Waals kræfter (dog kun ringe betydning). Den irreversible adhæsion opstår ved polymerbrodannelse (eller via fimbriae eller flageller) mellem receptorer på hhv. tandoverflade og bakterie. Dette finder sted i en afstand af ca. 10 nm da dette er energisk mest favorabelt.

Bakterien frigiver ekstracellulære enzymer benævnt glycosidaser og neuromidaser, der fraspalter hhv. sukker og sialinsyrer fra hhv. glyko- og sialoproteiner. Bakterien vikler sig så at sige ind i de nu

denaturede proteiner hvormed de "gnaver" sig ind i pelliclen og koloniserer den.

d) Redegør for sukroses rolle i udviklingen af den ekstracellulære matrix i biofilmen.

Sucrose er et disakkarid bestående af glukose og fruktose. Bindingen mellem førnævnte monosakkarider har en yderst negativ delta G-værdi, og bindingen indeholder således en potentiel energi sv.t. 1 ATP.

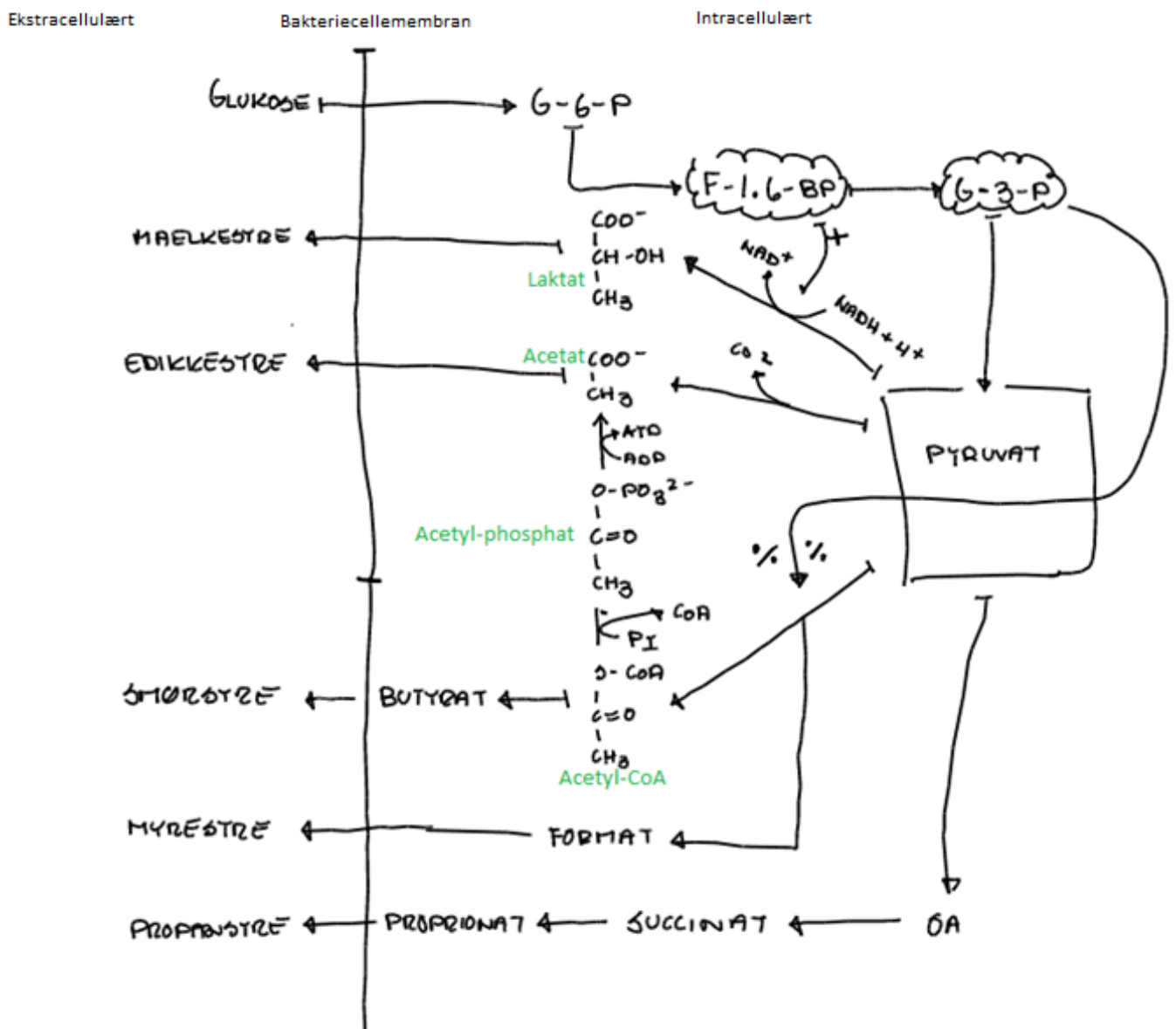
Denne potentielle energi er usædvanlig høj sammenlignet med andre sukkerarter, og gør sucrose særdeles effektiv i dannelsen af en gelatinøs ekstracellulær matrix:

To ekstracellulære enzymer er ansvarlige for nedbrydelsen af sucrose, og udnyttelsen af den frigivne omtalte energi; disse er hhv glycosyltransferase og fructosyltransferase. Begge enzymer nedbryder bindingen mellem glukose og fruktose, og begge enzymer anvender energien til at danne ekstracellulære sukkerpolymerer. Glycosyltransferase anvender den udvundne energi til at danne glukosepolymerer benævnt glukaner (herunder dextraner og mutaner), mens fructosyltransferase anvender energien til at danne fruktaner (herunder levan – et vigtigt molekyle der fungerer som næringslager under værtens faste). Begge enzymer påsætter første monosakkarid under polymerdannelsen til en såkaldt primer og den fremkomne biofilm fungerer som et gelfilter hvorigennem makromolekyler ej kan diffundere. Hermed opstår det anaerobe plakmiljø.

Opgave 2

a) Redegør for hvordan eks. Streptococcus mutans metaboliserer glucose under anaerobe forhold.

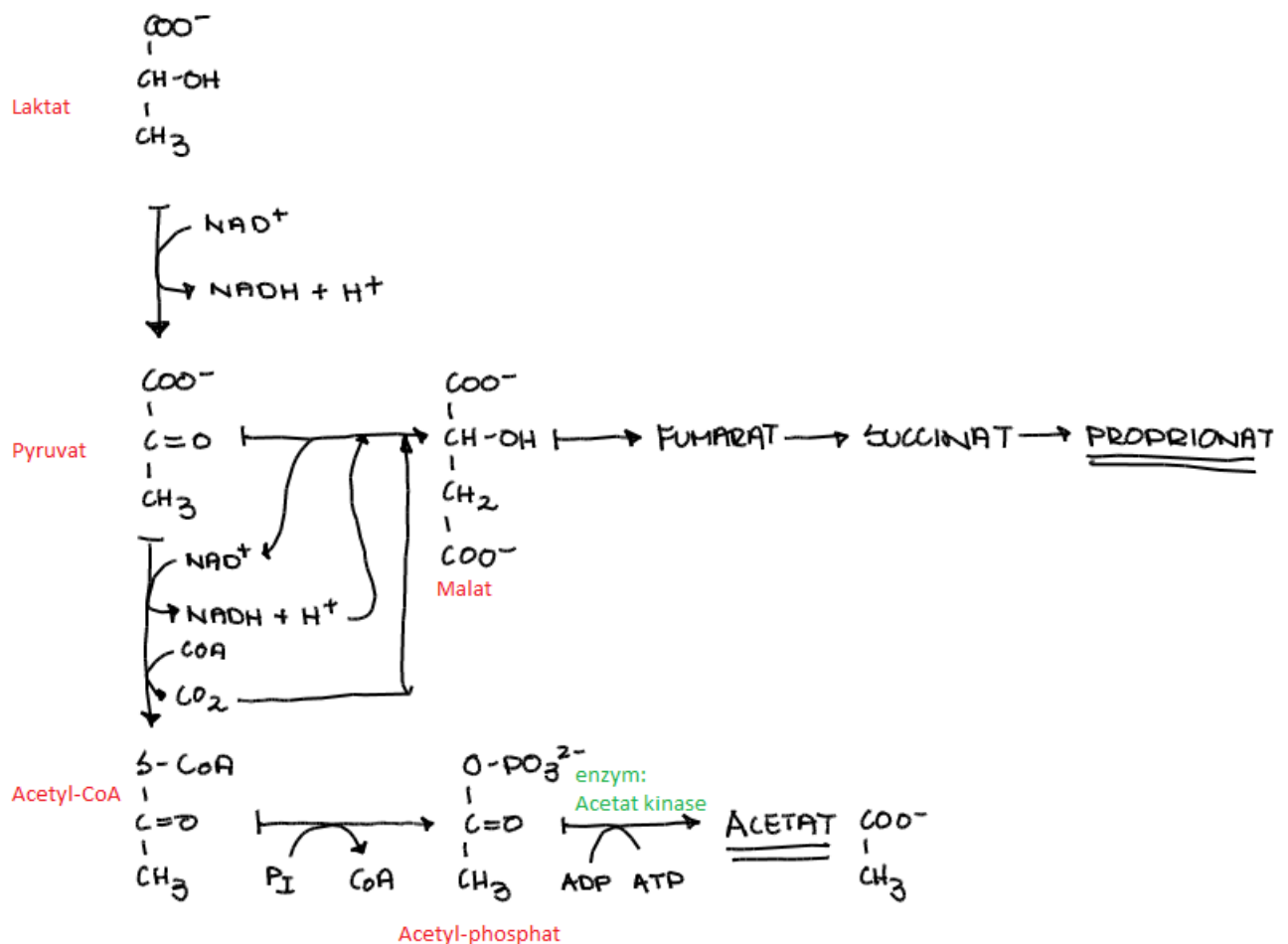
Anaerob glykolyse adskiller sig ikke fra aerob glykolyse, og der bliver i begge tilfælde således dannet pyruvat. Skæbnen der afventer pyruvat er således forskellen mellem bakteriens aerobe og anaerobe sukkermetabolisme. Den anaerobe metabolisme ser således ud:



Ved høj sukkertilgængelighed dannes store mængder mælkesyre (relativt stærk organisk syre) idet F-1,6-BP ophobes. Denne sidstnævnte aktiverer reduktionen af pyruvat til laktat (enzym: laktat

dehydrogenase) som vist på tegningen. Samtidig hæmmes dannelsen af smørsyre ved ophobning af G-3-P som hæmmer pyruvat-format-lyase. Dette betyder samtidig, som det fremgår af tegningen, at der kommer færre mængder eddikesyre og dermed mindre ATP, idet omdannelsen af acetyl-CoA, som ved høje sukkerkoncentrationer kun forekommer i liden grad, ikke kan finde sted.

Eddikesyre og propansyre er relativt svage organiske syrer, hvorfor de med deres korresponderende svage baser, fungerer som pH-buffere i plakken. Bakterien veilonella parvula omsætter mælkesyre til hhv. proprionat og acetat under dannelse af ATP – hermed sænkes pH:



b) Redegør for hvordan emalje reagerer ved pH over, på og under det kritiske niveau for emalje.

Den kritiske emalje-pH svarer til den pH hvor plakken lige akkurat er mættet med hensyn til emaljekomponenterne, som her antages udelukkende at bestå af HAP – dvs. calcium, fosfat og OH^- . Når pH er over den kritiske emalje pH er opløsningen overmættet og der udfældes mineral, idet ionproduktet altså er større end opløselighedsproduktet. Ligevægten går altså mod udfældning

(remineralisering).

Når $\text{pH} =$ den kritiske emalje pH , sker der hverken udfældning eller opløsning, idet ionproduktet er lig opløselighedsproduktet.

Når pH er under den kritiske emalje- pH går HAP i opløsning (demineralisering) for at kompensere for det lave ionprodukt. Ligevægten går altså mod opløsning, idet plakken er undermættet på gældende ioner (se tidligere).

Ionproduktet falder når bakterierne i plakken tyr til anaerob sukkermetabolisme, da de organiske syrers H^+ reagerer med de frie ioner. Eksempelvis omdannes OH^- til vand og PO_4^{3-} til HPO_4^{2-} . Når ionproduktet når under opløselighedsproduktet, opløses HAP for at kompensere.

Den kritiske emalje- pH er typisk sv.t. 5,5.

c) Beskriv bicarbonat buffer systemets effekt overfor pH -fald i biofilmen.



Som det gælder alle buffersystemer, består bicarbonatbuffersystemet af et korresponderende svagt syre/base-par; her H_2CO_3 (svag syre) og HCO_3^- (svag base), som reagerer med hhv. OH^- (ved pH -stigning) under dannelse af vand og H^+ (ved pH -fald) under dannelsen af H_2CO_3 .

Under pH -fald, forbundet med flere frie hydroner, er det således den svage base der optager H^+ 'er, og neutraliserer udsvinget.

d) Beskriv fluorids mulige indflydelse på biofilmen.

Fluorid er essentiel i hæmningen af biofilmdannelse, idet det virker inhiberende på bakteriernes glukosemembrantransportsystem, phospho-transferase-system (optimalt fungerende ved almen oral pH , ca. 6,5) – et kompliceret kaskadesystem bestående af adskillige komponenter, herunder phosphoenolpyruvat. Hermed hæmmes (i høj grad, men ikke totalt) bakteriernes mulighed for anaerob sukkermetabolisme og aflejring af organiske syrer. Ved lave pH -værdier virker det såkaldte proton motive force system som anvender protongradienten (potentiell energi) mellem det sure ekstracellulære miljø og neutrale intracellulære miljø, til at transportere glukose med ind i cytosol.

e) Beskriv fluorids indflydelse på opløseligheden af emalje.

Fluorid sænker emaljens opløselighedsprodukt idet fluorapatit-krystaller er tungere opløselige end HAP. Hermed falder ligeledes den kritiske emalje- pH . Hvor HAP har en kritisk pH -værdi på ca. 5,5, har fluorapatit en kritisk pH -værdi på ca. 4,5.

Kuriosum: de anaerobe bakterier kan overleve pH -værdier helt ned til 4,0

Samtidig dannes der ved store flouridkoncentrationer CaF_2 som ophobes i emaljens porøsiteter, og løbende frigiver fluorid, efterhånden som ionproduktet falder. Hermed hæmmes demineralisering.

Almen biokemi

Opgave 3

Triacylglycerol

a) **Gør rede for fordøjelsen af triacylglycerol i tarmkanalen, idet følgende delelementer skal medtages:**

- **Det vigtigste fedtfordøjelsesenzym, herunder hvorfra det kommer**
- **Galdesaltes betydning**
- **De ultimate fordøjelsesprodukter**
- **Hvilke komponenter, man finder på henholdsvis overfladen og i midten af en delvis fordøjet emulsionsdråbe og en fuldt fordøjet micelle**

Den hydrofobe triacylglycerol (fremover TAG) aggregeres i tarmkanalens polære miljø under dannelsen af såkaldte fedtdråber. I tyndtarmen frigives ved fedt-indtag to enzymer fra pancreas; lipase og co-lipase. Lipase nedbryder triacylglycerols primære esterbindinger og omdanner således TAG til monoacylglycerol (fremover MAG) og to frie fedtsyrer (fremover FA).

Lipase har dog to væsentlige problemer som skal overkommes før effektiv TAG-nedbrydelse kan finde sted. Dels er fedtdråbernes overfladeareal lille, hvorfor nedbrydelse af TAGs herpå er ineffektiv, dels er lipase hydrofil (hvorfor den frastødes den hydrofobe TAG).

Det første problem, fedtdråbens overflade areal, løses ved galdeblærens frigivelse af amfifatisk kolesterol, galdesalte (oxideret kolesterol) og fosfolipider. Disse emulgerer fedtdråberne (dvs. holder TAG i kunstig opløsning med de polære omgivelser) hvormed fedtdråberne omdannes til mindre emulsionsdråber. Emulsionsdråberne frastøder hinanden ved førnævnte amfifatiske molekylers negative ladninger, således TAG-aggregering og resyntese af fedtdråberne undgås. En emulsionsdråbe består således indvendigt af TAGs og udvendigt af amfifatiske galdesekretorer hvis polære gruppe vender udad og upolære gruppe indad. Lipasen har nu ved hjælp af de mindre emulsionsdråber et større overfladeareal at "angribe" på.

Det andet problem, lipasens hydrofilitet, løses ved enzymet co-lipase, et amfifatisk molekyle der med sine polære grupper "holder fast" i lipasen og med sin upolære gruppe "holder fast" i TAG.

Micellen indeholder lipasens produkter MAGs og FA, og består yderst af samme komponenter

som emulsionsdråben. Ved absorption af micellen reabsorberes fosfolipider og galdesalte i galdeblæren (sidstnævnte ca. 95 % - de resterende udskilles med fæces), mens kolesterol, MAGs og FAs alle optages i enterocytten.

b) Gør rede for tarmcellerne genopbygning af triacylglycerol, herunder:

- **Hvordan fordøjelsesprodukterne fra spørgsmål 1 genomdannes til triacylglycerol**
- **ATP-forbruget, ved denne genopbygning**
- **Navn og opbygning af det lipoprotein, der frigiver triacylglycerol fra tarmcellerne via lymfen til blodet**

TAG-resyntese foregår ved esterificering af MAGs OH-grupper. MAG acyl-transferase påsætter to fedtsyrekæder på disse polære grupper, vha. 2 fatty-acyl-CoA og fraspalting af disses CoA-SH.

Fatty-acyl-CoA dannes ud fra FA ved hjælp af CoA-SH og under forbrug af ATP \rightarrow AMP + PP_i. Enzymet benævnes fatty-acyl-CoA syntetase.

Der forbruges således 2 ATP netto for hver esterificering, sv.t. til 4 ATP under omdannelse af MAG \rightarrow TAG.

Lipoproteiner der frigiver triacylglycerol fra tarmcellerne via lymfen til blodet benævnes chylomikroner og består udvendigt af fosfolipider, fri kolesterol og APO-protein B-48 (strukturgivende), indvendigt af TAGs og kolesterolestre (kolesterol påsat fedtsyre). Esterificeringen af kolesterol gør denne totalt upolær (før amfifatisk) hvorfor det giver mening at omtalte findes i chylomikronets upolære indre. I blodet optager chylomikronet desuden APO-protein E (membrantransportsubstrat) og APO-protein CII (lipoprotein-lipase aktivator) fra HDL – high density lipoprotein, hvis opgave, foruden at aflevere omtalte APO-proteiner til både chylomikron og VLDL, primært består i kolesterol-afbalancering ved hjælp af enzymet PCAT (phosphatidylcholin acyl transferase), også kendt som LCAT (lecithin-cholin acyl transferase) – PCAT kløver fatty acyl gruppen af phosphatidylcholin hvormed membrankolesterol kan esterificeres og optages i HDL.

Procentvist fordeler chylomikronets bestanddele sig nogenlunde som følger:

TAGs: ca. 90 %

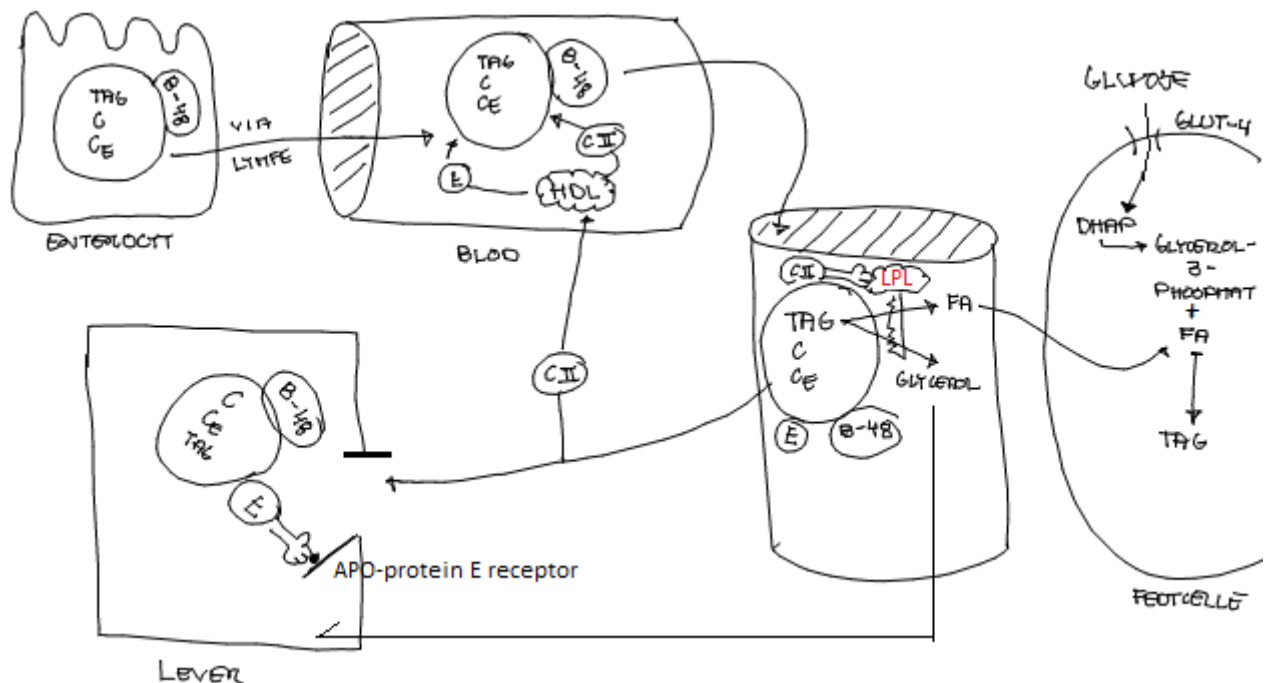
Kolesterol og kolesterolestre: ca. 5 %

Fosfolipider: ca. 3 %

APO-protein: ca 2 %

c) **Gør rede for hvordan triacylglycerolrige lipoproteiners fedtsyrer ender som triacylglycerol i fedtvæv. Herunder:**

- **Hvorledes ovennævnte lipoprotein afgiver sine fedtsyrer til andre væv**
- **Angivelse af samtlige mellemprodukter i fedtvævs omdannelse af glycerol-3-phosphat til triacylglycerol. Der ønskes ingen reaktionsligninger**
- **Hvorledes fedtvæv skaffer sig glycerol-3-phosphat, når det ikke kan glycerokinase, herunder hvorfor denne proces er afhængig af insulin**

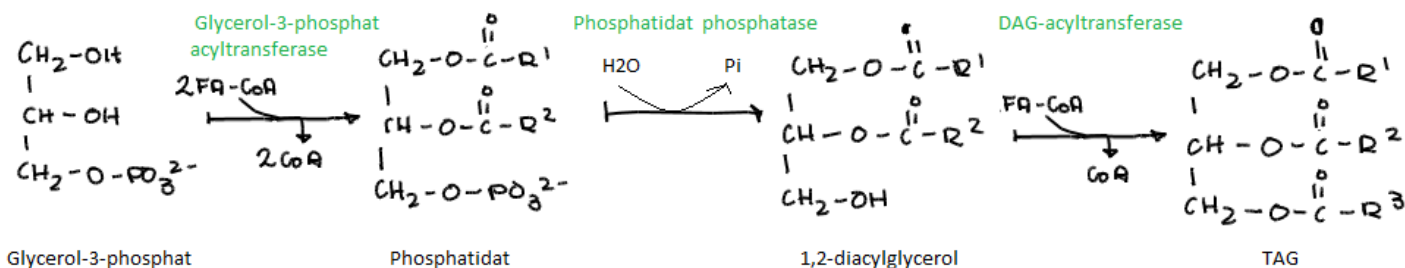


Chylomikronoversigt

Chylomikronet afgives fra enterocytten til lymfen og når via denne blodbanen. Her optager chylomikronet apo-protein E og apo-protein CII fra HDL. I fedtvævs-kapillærene møder chylomikronet lipoprotein-lipase (LPL) som ved CII-inducering kløver TAG til glycerol og frie fedtsyrer. Glycerol rejser med blodet til leveren mens de frie fedtsyrer optages i adipocytten. Adipocytten omdanner FA til FA-CoA (enzym: FA-CoA syntetase, under forbrug af ATP \rightarrow AMP + PPI) som reagerer med glycerol-3-phosphat der fremkommer

vha. fedtcellens glykolyse (som altså primært har til formål at danne glycerol-3-phosphat, og ikke pyruvat). Processen er afhængig af insulin, idet adipocytternes membranglukosetransportere, GLUT-4 kun udtrykkes på membranen når insulin binder til fedtcellens insulinreceptorer. Dette resulterer i fusionering mellem GLUT-4-holdige vesikler og cellemembranen. GLUT-4 har høj glukoseaffinitet i modsætning til eksempelvis levercellens GLUT-2.

Når chylomikronets TAGs er nedbrudt til glycerol og FA vender CII tilbage til HDL, mens chylomikronresterne (nu overvejende udgjort af kolesterol og kolesterolestre) optages i levercellen vha. af en APO-protein E receptor. Kolesterolen kan nu enten pakkes i VLDL/HDL eller sendes til galdeblæren. Her frigives kolesterol enten på sin frie eller sin oxiderede form (galdesalt). Dette kolesterolkredsløb genkendes som det enterohepatiske system.

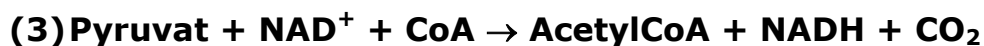
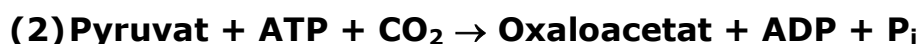


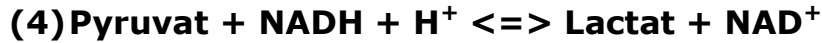
Omdannelse af glycerol-3-phosphat og 3 FA-CoA til TAG.

Opgave 4

Pyruvat

Pyruvat er en central metabolit i stofskiftet og kan dannes fra eller omdannes til mange forskellige forbindelser. Blandt de vigtigste er følgende 5 processer, hvoraf de 3 første er irreversible under fysiologiske forhold:





a) Angiv enzymnavn for de 5 processer.

1. Pyruvat kinase
2. Pyruvat carboxylase
3. Pyruvat dehydrogenase complex (substratcoenzymer = NAD^+ + CoA, prostetiske grupper = TPP, lipoat, FAD)
4. Laktat dehydrogenase
5. Alanin transaminase

b) Angiv prostetiske grupper (coenzymer, der ikke deltager i reaktionsligningen) for processerne (2), (3) og (5).

Se a).

c) a) Angiv hvilke af ovenstående processer, der foregår i leveren efter 3 dages faste og forklar formålet hermed.

(1) Phosphoenolpyruvat + ADP \rightarrow Pyruvat + ATP

Denne proces foregår ikke i leveren efter 3 dages faste, idet phosphoenolpyruvat her fortrinsvis omdannes til glukose og ikke pyruvat (glukoneogenese). Dette skyldes inhibering af pyruvat kinase samt aktivering af pyruvat carboxylase, PEP carboxykinase, F-1,6-BPase m.v.

Dette er hensigtsmæssigt, da vi ikke ønsker at danne energi i leveren, men derimod at spare på den, og give den videre til de væv der har brug for den (navnlig hjernen), i form af fri glukose.

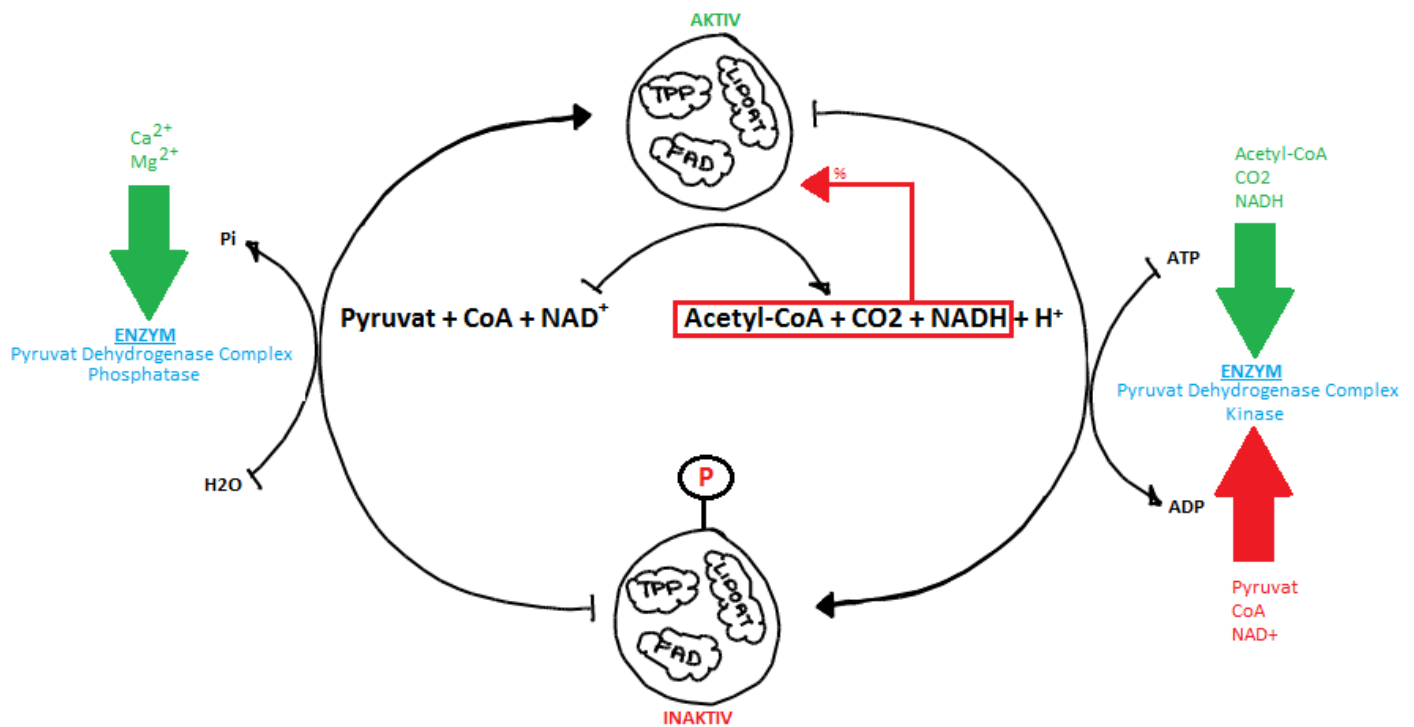
(2) Pyruvat + ATP + $\text{CO}_2 \rightarrow$ Oxaloacetat + ADP + P_i

Denne proces finder sted i leveren efter 3 dages faste, idet acetyl-CoA fra fedtsyreoxidation (*glucagon stimulerer fosforylering af hormon sensitiv lipase ved kinase-aktivitet, som i denne aktive tilstand nedbryder TAG til FA, som via serum-albumin når leveren, omdannes til FA-CoA af FA-CoA synthase under forbrug af ATP til ADP og P_i , transporteres ind i mitokondriet vha. carnitin acyl transferase I og II, og endeligt oxideres i mitokondriet ved beta-oxidation til acetyl-CoA*), og glucagon som følge af lavt blodsukkerniveau, begge aktiverer reaktionsenzymet pyruvat carboxylase. Dette er hensigtsmæssigt af samme årsager som nævnt ovenfor (glukoneogenesefremmende).

(3) Pyruvat + NAD⁺ + CoA → AcetylCoA + NADH + CO₂

Denne proces vil formentlig ikke finde sted i leveren efter 3 dages faste.

Acetyl-CoA, som hæmmer pyruvate dehydrogenase complex, dels direkte, dels indirekte, ophobes som følge af beta-oxidation og OA's omdannelse til phosphoenolpyruvat. Pyruvat, som dannes via alanin fra musklen, er godt nok pyruvat dehydrogenase complex aktivator, men da acetyl-CoA, som jo altså ophobes under disse forhold, desuden aktiverer pyruvate carboxylase, ser jeg ikke, at denne proces er sandsynlig under forholdene.



(4) Pyruvat + NADH + H⁺ ⇌ Lactat + NAD⁺

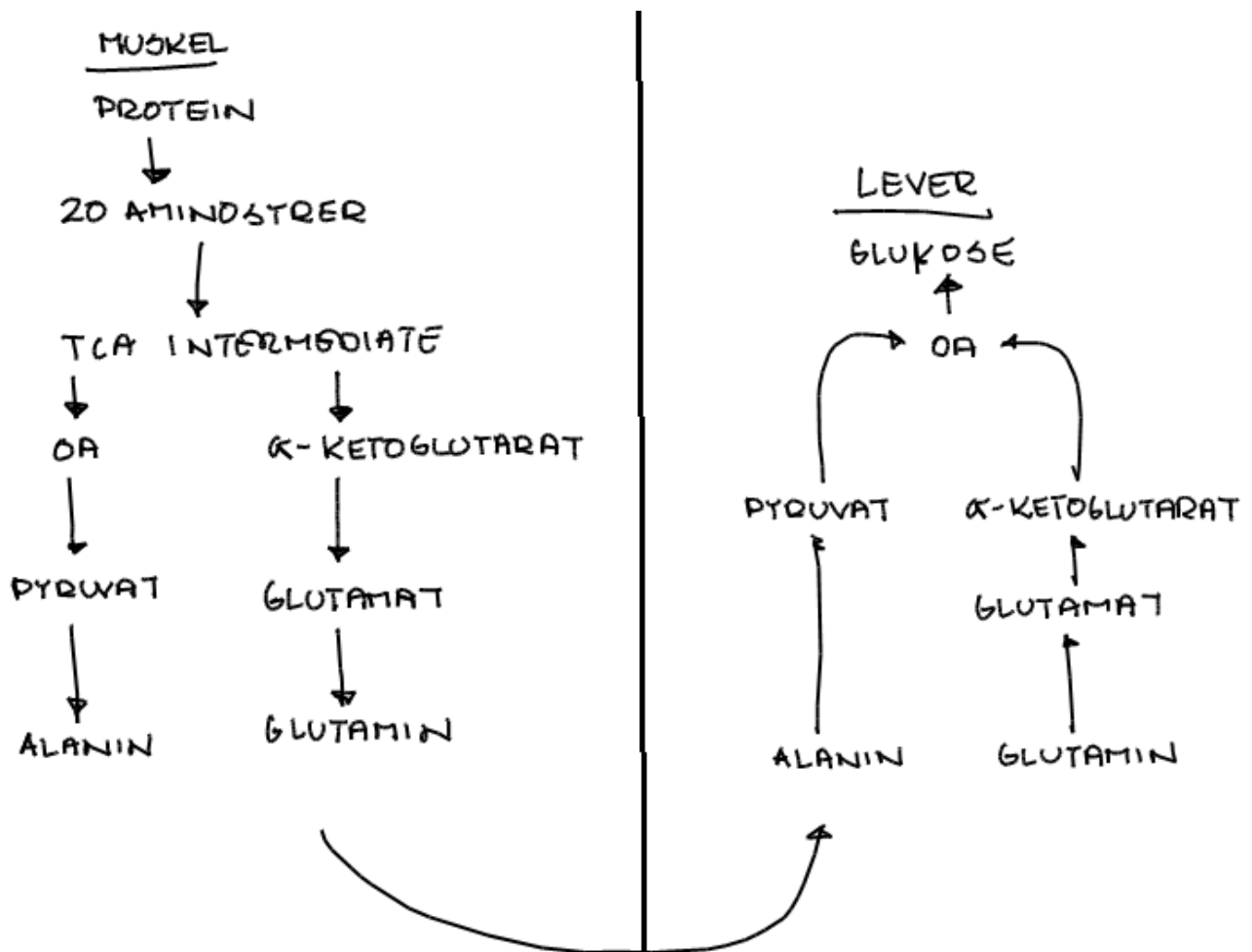
Denne proces finder ikke sted i leveren efter 3 dages faste, da der er tale om anaerob fermentering, som kun finder sted ved høj iltomsætning.

(5) Pyruvat + glutamat ⇌ Alanin + alfa-ketoglutarat

Denne proces finder sted i leveren efter 3 dages faste.

Som følge af lavt blodsukkerniveau falder insulin-koncentrationen, mens glucagon- og cortisolkoncentrationen stiger. Insulin hæmmer proteolytisk aktivitet i muskelcellen, mens

stresshormonet cortisol aktiverer den. Dermed nedbrydes musklens proteiner og de fremkomne aminosyrer omdannes til TCA intermediates. Disse omdannes for mestendels videre til enten alanin eller glutamin og transporteres til leveren, hvor glucagon-induceret-aminosyreoptag fører dem ind i hepatocytten. Via omveje omdannes begge til oxaloacetat, siden PEP (ved hjælp af PEP carboxykinase) og endeligt glukose. Formålet er endnu en gang glukoneogenese. Selvom kun ca. 15 % af musklens aminosyrer udgøres af alanin eller glutamat, er ca. 50 % af de aminosyrer leveren modtager fra musklen en af disse to. Dette skyldes omtalte vej, som illustreres nedenfor:



b) Angiv også hvilke processer, der er hæmmet i lever under faste og giv en forklaring på hensigtsmæssigheden af dette.

Se ovenstående opgave

d) Angiv ligeledes hvilke af de 5 processer, der er vigtige for ATP-forsyningen i a) hjerne og b) erythrocytter

Hjernen

1: Vigtig: nødvendig for oxidativ fosforylering

2: Vigtig: samme ræsonnement som i 5

3: *Særligt vigtig*: under faste, da leveren omdanner acetyl-CoA til ketonstoffer, som udnyttes af hjernecellerne til oxidativ fosforylering – blod/hjernebarrieren gør det svært for hjernecellerne at optage frie fedtsyrer, hvorfor acetyl-CoA primært kommer fra ketonstofferne.

4: *Ikke vigtig*

5: Vigtig ifm. faste, da den fri glukose der følger i kølvandet på leverens ketoneogenese, forsyner hjernen med glukose og dermed ATP

Erythrocytter

1: Vigtig: her dannes 2 ATP

2: Vigtig: Finder ikke sted i erythrocyt eller hjerne, men er for begge vigtige under faste. Samme ræsonnement som ved hjernen (se ovenfor).

3: *Ikke vigtig*: erythrocytten har intet mitokondrie, hvorfor ketonstoffer til oxidativ fosforylering er unødige.

4: *Særligt vigtig*: vedligeholder koncentrationen af oxidations-agenten NAD^+

5: Vigtig ifm. faste: se ovenfor under afsnit om hjernen.