

Biokemi eksamen 2020

Almen biokemi:

Opgave 1

Udviklingen igennem en længerevarende faste kan opdeles i fire faser: en postprandial fase, en postabsorptiv fase, proteinfasen samt ketonstoffasen. Disse faser vil let gennemgås ud fra de forskellige væv med fokus på faste, hvorfor den første fase ikke vil gå i detaljer med.

Leveren vil i den postprandiale fase, altså lige efter et måltid, optage glukose og syntetisere og lagre glykogen. Overstiger glukoseintaget kroppens behov, og er glukogenlagrene fulde, vil leveren udføre glykolyse og forsyne sig selv med ATP ved glukoseforbrænding.

I den postabsorptive fase vil leveren opretholde blodglukoseniveauet ved at danne glukose via glykogenolyse. Denne vil falde med tiden og erstattes af glukoneogenesen, som vil omdanne pyruvat til glukose og derved producere og forsyne blodet med glukose.

I proteinfasen er det altså glukoneogenesen der forsyner væv med glukose. Her er det primært nedbrydning af muskelprotein, der sørger for leveren fortsat kan danne glukose. Leveren danner ATP fra fedtsyreoxidation, men vil også omdanne acetyl-CoA til acetoacetat og beta-hydroxybutyrat, også altså ikke lave TCA-cyklus. Disse ketonstoffer kan hjernen og muskler benytte som energi.

I ketonstoffasen vil leveren primært producere ketonstoffer til hjernen, og lave glukoneogenese, dog meget nedsat, ud fra glycerol og meget lidt ud fra aminosyrer, idet muskler benytter ketonstoffer som brændstof og ikke nedbryder protein så meget længere på dette tidspunkt.

Muskler vil i den postprandiale fase optage muskler via den insulinafhængige GLUT4 transporter. Musklerne vil, ligesom leveren, syntetisere glykogen.

I den postabsorptive fase vil musklernes protein begynde at blive nedbrudt til aminosyrer, således at glukoneogenesen kan forløbe. Musklerne kan derved benytte den noget af den dannede glukose fra glukoneogenesen som energikilde.

I proteinfasen fortsætter muskelprotein med at være kilden til aminosyrer, som kan bruges i dannelse af glukose i glukoneogenesen. Senere i denne fase vil dette dog ophøre, idet ketonstoffer bliver mere tilgængelige, og musklerne kan bruge disse som energikilde, i stedet for glukose.

I ketonstoffasen vil kun en lille del aminosyrer benyttes til at drive glukoneogenesen.

Fedtvæv vil ved fald i insulin (ved fravær af mad) nedbryde triacylglycerol (TAG) til glycerol og fedtsyrer via lipolysen. Disse fedtsyrer kan så oxideres i leveren og benyttes som energikilde, hvilket sker i den postabsorptive fase. Derudover vil lipolysens dannede glycerol kunne benyttes til dannelse af glukose i glukoneogenesen. Det skal fastslås at fedtvæv ikke har enzymet glycerokinase, som fosforilerer glycerol til glycerol-3-phosphat, men dette enzym har leveren. Det er vigtigt for at glycerol kan indgå i glukoneogenesen. Da fedtvæv er den største kilde til TAG, er dette væv vigtigt for glukoneogenesen under faste.

I ketonstoffasen vil glycerol være hovedkilden til glukosedannelse via glukoneogenesen. Dog vil denne proces ikke forløbe i så stor grad længere på dette tidspunkt.

Hjernen vil ved langvarig faste gå over til at benytte ketonstoffer som energikilde, i stedet for glukose. I proteinfasen vil leveren som sagt omdanne acetyl-CoA til ketonstoffer, og hjernen vil begynde at inducere ketonstofnedbrydende enzymer.

I ketonstoffasen vil størstedelen af hjernens energibehov kunne dækkes af ketonstofferne.

Erythrocytter har ingen mitokondrier og er nødsaget til at bruge glukose som energikilde. Dette gør de vha. Coriccyklus, hvor 1 glukose kan omdannes til 2 laktat. 2 laktat kan tilbagedannes til 1 glukose af leveren under brug af ATP og GTP. Coriccyklus kører uændret under faste, idet de anaerobe væv selv forsyner leveren med den mængde laktat, der skal benyttes til at dække glukosebehovet, samt fordi energien fås fra fedtsyreoxidation.

Opgave 2

a)

Glycerol -> glycerol-3-P	- 1 ATP
Glycerol-3-P <=> dihydroxyacetone-P	+ 1 NADH = 1,5 ATP
Dihydroxyacetone-P <=> 3-P-glyceraldehyd	
3-P-glyceraldehyd <=> 1,3-di-P-glycerat	+ 1 NADH = 1,5 ATP
1,3-di-P-glycerat <=> 3-P-glycerat	+ 1 ATP
3-P-glycerat <=> 2-P-glycerat	
2-P-glycerat <=> phosphoenolpyruvat	
Phosphoenolpyruvat -> pyruvat	+ 1 ATP
Pyruvatdehydrogenase: Pyruvat -> acetyl-CoA + CO ₂	+1 NADH = 2,5 ATP
TCA-cyklus -> 2 CO ₂	+ 3 NADH = 7,5 ATP + 1 FADH ₂ = 1,5 ATP + 1 ATP
I alt:	16,5 ATP

Overordnet kan det altså siges at glycerol omdannes til dihydroxyacetone-phosphat, som så kan indgå i glykolysen ved dannelse af pyruvat, og så indgå i TCA-cyklus. I alt dannes 16,5ATP.

b)

Når de reducerede coenzymer NADH og FADH₂ reoxideres under dannelse af ATP, sker det med 1/2 O₂. Da der i alt er 6 NADH og 1 FADH₂, som skal reoxideres, må der nødvendigvis dannes 7·0,5=3,5 O₂ ved den oxidative fosforylering.

Oral biokemi:

Opgave 3

a)

Pellikeldannelse sker på rene emaljeoverflader, ved tilstedeværelse af spyt.

Før emaljen eksponeres til spyt, vil dens overflade være netto negativt ladet, idet hydroxylapatit krystallernes fosfat-ioner vil vende ud mod overfladen.

Denne negative ladning vil elektrostatiske tiltrække de positivt ladede calciumioner i spytet, når emaljen eksponeres overfor spytet. Calciumionerne binder til phosphationen, og danner "ion-dobbeltlaget" i pelliklen. Dog er pelliklen ikke dannet endnu.

Calciumionernes binding til emaljeoverfladen vil forårsage et skift i overfladeladningen, som nu vil være netto positivt ladet.

Denne positive ladning vil nu tiltrække negativt ladede proteiner og glykoproteiner.

Nogle af de første proteiner, der binder til ion-dobbeltlaget, er statherin (som er et phosphorprotein) samt sure prolin-rige proteiner. Sidstnævnte vil være det kvantitativt dominerende protein i den færdigdannede pellikel.

Andre tidlige proteiner, som binder til den tidlige pellikel er MUC5B (en mucin) og histatin.

Senere vil flere proteiner og glykoproteiner binde, såsom lysozym, sIgA, cystatin, laktoferrin, amylase, glukosyltransferase og kulsyreanhydrase.

Pelliklen er etableret allerede ved første proteins binding til ion-dobbeltlaget.

b)

Da proteinerne, som binder til pelliklens ion-dobbeltlag er negativt ladede, vil pelliklen have en negativ nettoladning på overfladen. Dette er problematisk, idet bakterierne, som typisk vil befinde sig i mundhulen, også er negativt ladede på overfladen. Disse vil altså ikke tiltrække hinanden elektrostatiske.

Bakterierne vil befinde sig ca. 10nm fra pelliklen, hvor de vil være i balance mellem frastødningskræfterne og tiltrækningskræfterne. Herfra vil de kunne danne en svag initial binding, som er nem at bryde igen. Hvis bindingen ikke brydes, kan bakterien lave stærkere bindinger, såsom calciumbroer, hydrofobe bindinger og polymerbroer.

Polymerbroer dannes ved bakteriers adhæsiner (enten fimbriae eller afimbriale adhæsiner) genkender sekvenser i molekyler i pelliklen (såsom kulhydratgrupper eller proteiner), og binder specifikt til dem. Disse polymerbroer kan også dannes indbyrdes mellem bakterier, hvor det kaldes co-adhærance (hvis den ene eller begge bakterier er bundet til pelliklen) eller co-aggregering (hvis inden af bakterierne er bundet til pelliklen).

Ved stabil binding af en bakterie til pelliklen, kan bakterien begynde at spalte glykoproteiner fra pelliklen vha. ekstracellulære enzymer, og derved bruge dem i bakteriemetabolismen.

Glykoproteinerne kan også indgå i den ekstracellulære matrix (ECM).

Herefter dannes der mikrokolonier af bakterier vha. co-aggregering og co-adhærance. Samtidig fortsætter binding af andre bakterier til den resterende blottede pellikel.

Kolonisatorerne modner biofilmen ved at danne mere ECM og ved vækst.

Når kolonien vokser, vil nogle metabolisme produkter fra én bakterie kunne bruges som næring for en anden, bakterierne begynder at signalere til hinanden og der vil ske en ændring i biofilmen, som vil blive mere anaerob og mindre permeabel.

Biofilmen på tandoverfladen siges at være velorganiseret, idet bakterierne binder til pelliclen i et bestemt rækkefølge, så den til slut viser stor diversitet mikrobielt.

Typiske primære kolonisorer vil være *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* og *A. naeslundii*. Hvis biofilmen bliver cariogen og sur vil bakterier som *S. mutans*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* og *Veillonella* spp. typisk kunne findes.

c)

Sukrose er et disakkarid bestående af ét glukosemolekyle og ét fruktosemolekyle, bundet sammen med en glykosidbinding. Denne binding er meget energirig (ca. 1 ATP kan høstes ved spaltning). Ved spaltning frigives glukose og fruktose, som bakterierne bruger enten til kulhydratmetabolisme (og derved som næring) eller til dannelse af polysakkarider. Der er tre typer ekstracellulære polysakkarider (EPS), som kan dannes ud fra dette: dextraner og mutaner, som dannes ud fra glukose, samt levaner, som er fruktose polymerer. Disse vil udgøre en stor del af den ekstracellulære matrix (ECM), som vil gøre biofilmen mere struktureret, stabil og anaerob, samtidig med den bliver mindre permeabel. Ved sukrose tilstedeværelse vil EPS dannes hurtigt.

Nogle bakterier kan også danne intracellulære polysakkarider (IPS) ud fra sukrose, som derved kan fungere som et lager af polymerer.

Nogle bakteriers enzymer favoriserer sukrose, hvorfor sukrose vil være den foretrukne kilde til glukose og fruktose for mange bakterier. ECM dannes hurtigere og tykkere ved høj tilstedeværelse af sukrose.

Opgave 4

a)

For at udvinde ATP fra kulhydrater, udfører bakterierne glykolyse, hvor glukose omdannes til 2 pyruvatmolekyler.

Hvis der ikke er ilt til stede, kan NADH ikke reoxideres til NAD⁺ i respirationskæden. Derfor omdannes pyruvat i stedet til laktat vha. laktatdehydrogenase, og får derved reoxideres NADH til NAD⁺, som er nødvendigt for at en ny omgang glykolyse kan foregå.

Pyruvat kan også omdannes til andre syrer (såsom eddikesyre, myresyre, propionsyre og smørsyre) vha. andre enzymer.

Denne syredannelse vil føre til et fald i pH intracellulært. Det er vigtigt at bakterien skiller sig af med denne syre, for at undgå celledød.

Om der dannes laktat eller en anden syre, afhænger af sukkestildeværelsen.

Ved lav tilgængelighed af sukker vil der også være lav koncentration af fruktose-1,6-bisfosfat og glyceraldehyd-3-fosfat, hvilket vil føre til en aktiv pyruvatformatlyase. Dette enzym vil katalysere dannelsen af eddikesyre og myresyre, og også danne en ekstra ATP samt ethanol. Eddikesyre er en svagere syre end laktat, og er også i tilstedeværelse af myresyre, hvilket gør den ikke så let dissocieres ved lavt pH. Derfor sker der ikke så stort et pH fald i plåkvæsken. Desuden danner nogle arter smørsyre og propionsyre ved lav sukkestildeværelse, men dette vil heller ikke ende i så markant et pH fald som laktatdannelse.

Ved høj tilgængelighed af sukker vil der også være høj koncentration af fruktose-1,6-bisfosfat og glyceraldehyd-3-fosfat. Førstnævnte vil stimulere laktatdehydrogenasen, mens sidstnævnte vil hæmme pyruvatformatlyasen. Derved dannes laktat ud fra pyruvat, og der vil ske et fald i pH, større end faldet ved myre- og eddikesyredannelsen.

b)

I plakvæsken er den kritiske pH mht. hydroxylapatit (HAp) omkring pH 5,0. Denne værdi varierer dog fra person til person. Ved denne pH vil HAp hverken udfældes eller opløses.

c)

Spyt har 3 buffersystemer til af begrænse pH fald: bikarbonatbufferen, fosfatbufferen og proteinbufferen.

Buffersystemer virker bedst ved $\text{pH} = \text{pK}_A$.

Bikarbonatbufferen virker bedst ved pH 6,1 og i stimuleret spyt. Den fungerer ved at neutralisere syre, ved at bikarbonationer binder protoner og danner kulsyre, ved dissociering af vand og CO_2 .

Fosfatbufferen virker bedst ved pH 7 og i ustimuleret spyt. Når pH stiger, kompenserer denne ved at binde protoner til hydrogenfosfat og derved danne dihydrogenfosfat.

Proteinbufferen virker bedst ved pH 5-9, men er typisk kun aktiv når de to andre buffersystemer er ineffektive, altså ved lave pH værdier (pH 5). Den virker ved at spytproteiner bufrer når pH ændres ift. deres isoelektriske punkt.

Det er sandsynligvis sidstnævnte, der vil være af størst værdi i dette tilfælde, idet plakken er modnet og pH sandsynligvis er faldet betydeligt.

Derudover indeholder spyt glykoproteiner (såsom agglutinin, mycin og sIgA), som kan agglutinere bakterier, som ikke er bundet til overflader. Ved oral clearance skylles disse bakterier så væk og synkes, således de ikke kan indgå i koloniseringen og bidrage til et yderligere pH fald.

Oral clearance hjælper også med at fjerne større mængder af kulhydrater, som ellers ville kunne indgå i bakteriernes metabolisme.

d)

For at de demineraliserede emaljeområder skal kunne blive remineraliseret, må pH i plakvæsken overstige den kritiske pH mht. HAp, som typisk vil være 5,0. Derudover skal ionaktivitetsproduktet i plakvæsken mht. HAp overstige opløselighedsproduktet i plakvæsken mht. HAp. Ved pH 5,1 burde der allerede kunne udfældes mineral og emaljen kan remineraliseres, og remineralisering ses garanteret ved eksempelvis pH 6, hvis ionaktivitetsproduktet er højere end opløselighedsproduktet. De- og remineralisering ift. kritisk pH i plakvæsken kan illustreres med en Stephan-kurve.