

Integreret eksamen i medicinsk celle- og vævsbiologi inklusiv excitable celler - ITX-e
Søndre Campus



2047

08 maj 2023

Planlagt: 09:00 - 14:00

Eksamensnr: 2047

Plads: EH-2071

Side 1 af 28

KØBENHAVNS UNIVERSITET
DET SUNDHEDSVIDENSKABELIGE FAKULTET

Integreret eksamen i Medicinsk Celle- og Vævsbiologi inklusive Excitable celler

(SMEB12004E/SMOB15004E/SODA15021E)

Medicin og odontologi, 2. semester

Molekylær biomedicin, 3. semester

8. maj 2023

(5 timer)

Opgavesættet består af 14 sider inkl. forside.

© Dette dokument er beskyttet af lov om ophavsret.

Eksamensvejledning:

Du skal besvare alle opgaver og alle underspørgsmål samt spotprøven.

Der benyttes VirMik til spotprøven. Der logges ind med Username: KU-brugernavn/password
(spotprøven findes under Exams/Med_AlmHist).

Hjælpe midler:

- Det er tilladt at medbringe ”Kemiske data og oversigter” 3. udgave af J. og M.R. Christoffersen. Der må ikke være notater i det medbragte materiale eller lapper (post-it). Understregninger og farveoverstregninger er tilladt.
- Adgang til Documenta Biochimica et Biophysica (2022).
- Adgang til lommeregner indeholdt i Office pakken samt LYX, Maple og MathType.

Praktiske forhold:

Vi lægger vægt på, at din besvarelse er klart disponeret, og at sprogbugen er i overensstemmelse med fagenes terminologi. Bemærk at copy/paste af opgaver kan resultere i ændringer af figuropsætninger og opgavenummerering.

Medicinsk Celle- og Vævsbiologi

Opgave I

”Vascular endothelial growth factor A” (VEGFA) er en vækstfaktor, som bl.a. stimulerer nydannelse af blodkar (angiogenese) og regulerer blodkar homøostase via receptor tyrosin kinaser (RTK).

Antistoffer, som kan neutralisere VEGFA, anvendes til behandling af specifikke øjensygdomme karakteriseret ved øget nydannelse af blodkar og til kombinationsbehandlinger af specifikke kræftsygdomme.

1. Angiv 6 cancerkarakteristika (”Hallmarks”).

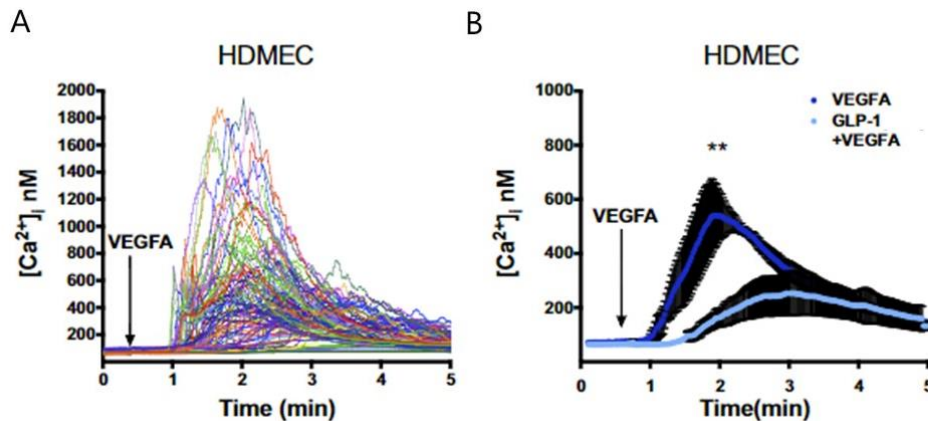
Nedenfor ses 6 cancerkarakteristika:”Hallmarks”

1. Uhæmmet proliferation/celledeling
2. Angiogenese
3. Resisterer væksthæmning
4. Metastase/invasive
5. Modstår apoptose
6. Replikativ immortalitet

2. Redegør for, hvorvidt VEGFA er et proto-onkogen eller en tumor suppressor.

Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) er en vækstfaktor, som stimulerer nydannelsen af blodkar via receptor tyrosin kinaser, RTK. Aktivering af RTK gennem en dimerisering af de inaktive monomerer, medfører en krydsphosphorylering af RTK’erne. Dette kan blandt andet aktivere MAP-kinase signaleringsvejen eller Akt signaleringsvejen, som i sidste ende fremmer proliferation, cellevækst og dedifferentiering, som er kendte cancerkarakteristika. En neutralisering af VEGFA må derfor virke til behandling mod specifikke øjensygdomme karakteriseret ved øget nydannelse af blodkar og til af specifikke kræftsygdomme, som det også er angivet i opgaveteksten. Derfor kan vi gå ud, fra at VEGFA er et proto-onkogen.

I et studie undersøgte man effekten af VEGFA og tarmhormonet ”glucagon-like peptide 1” (GLP-1) på intracellulær calciumsignalering i humane endothelceller (HDMEC, figur 1).



Figur 1. Intracellulær calciumsignalering i HDMEC celler målt ved anvendelse af en fluorofor.

A: Målinger af den intracellulære frie calciumkoncentration i HDMEC celler (hver celle er repræsenteret af en farve) stimuleret med VEGFA over tid (minutter). **B:** Gennemsnit af en række målinger over tid af den intracellulære frie calciumkoncentration i HDMEC celler stimuleret med VEGFA alene (øverste kurve) og i HDMEC celler behandlet i 15 minutter med GLP-1 før stimulation med VEGFA (nederste kurve). ** indikerer en p-værdi på mindre end 0,01. Modificeret fra Egholm et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016.

3. Forklar resultaterne i figur 1A. Svaret skal inkludere den signaleringsvej, som leder til ændringer i den intracellulære frie calciumkoncentration.

I figur 1A ses sammenhængen mellem den intracellulære frie calciumkoncentration i nM i HDMEC-celler stimuleret med VEGFA og tiden i minutter. Dette tyder på at VEGFA har en effekt på HDMEC-cellerne, idet vi ser en øget Ca^{2+} koncentration i disse celler over tid, især til tiden 2 min. I figur 1B ses gennemsnittet af en række målinger over tid af den intracellulære frie calciumkoncentration i HDMEC-celler stimuleret med kun VEGFA og dernæst HDMEC cellerne behandlet med GLP-1 før stimulation med VEGFA. Ved stimulation med VEGFA alene, er der langt højere Ca^{2+} koncentration end ved end ved både GLP-1 og dernæst VEGFA. Dette kunne antyde, at GLP-1 har en hæmmende/inhiberende effekt på VEGFA, ifm. HMEC cellernes Ca^{2+} koncentration. En signaleringsvej hertil kunne være G_q -proteinsignaleringsvejen, hvor en aktivering af G_q -proteinet, fører til aktivering af phosphorlipase C. Phosphorlipase C spalter PIP2 til IP3 og DAG, hvor IP3 medfører aktivering af IP3 receptorer, der dermed fører til stigning af den intracellulære koncentration af Ca^{2+} .

4. Redegør for hvert udsagn (a og b) om resultaterne i figur 1B kunne fremkomme ved at:

a. GLP-1 regulerer VEGFA induceret IP_3 syntese.

Som også forklaret i opgaven ovenfor, vil IP_3 syntese føre til aktivering af IP_3 receptorer, som dermed resulterer i øgede intracellulære calciumkoncentrationer. Derfor kan udsagn a) godt forklare resultaterne i figur 1, hvor vi ser høje calciumkoncentrationer ved stimulering med VEGFA.

b. GLP-1 regulerer aktiviteten af calciumpumper i ER.

Hvis GLP 1 aktiverer calciumpumper i ER, såsom en RyR receptor, vil dette frigive calcium fra ER til cytosolen, hvorved vi også vil få en øget koncentration af calcium i cytosolen, altså en høj intracellulær calciumkoncentration. Men dette stemmer ikke overens med resultaterne i figur b, hvor stimulation med både VEGFA og GLP-1, nedsætter Ca^{2+} koncentrationer ift. kun stimulation med VEGFA. Derfor kunne udsagn b) ikke forklare resultaterne i figur 1B, idet vi må formode at GLP-1 enten virker hæmmende på VEGFA, eller kan den alternativt have en inhiberende effekt på aktiviteten af calciumpumper i ER.

GLP-1 signalerer via G-protein koblede receptorer (GPCR).

5. Angiv for hvert udsagn (a-d), hvorfor dette er enten sandt eller falsk.

a. GPCR indeholder ét transmembrant segment.

Dette udsagn er falsk, fordi GPCR indeholder 7 transmembrane segmenter, idet det er et 7-pass transmembrant protein, som krydser membranen 7 gange.

b. GPCR proteinet består af et G-protein (GTPase) og et ligand-bindingssite.

Dette udsagn er sandt, idet GPCR både har et sted, hvor det binder en ligand eller signalmolekyle på ekstracellulær siden, samt et intracellulært domæne, hvor G-proteinet aktiveres gennem en GTPase.

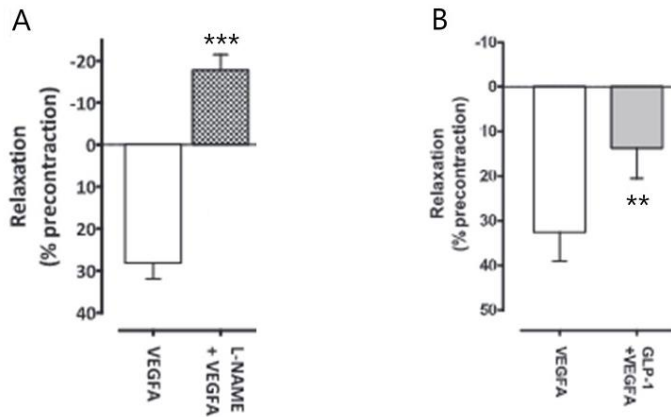
c. GPCR signalering kræver en konformationsændring af proteinet.

Dette udsagn er sandt, idet GPCR signalering kræver en konformationsændring af proteinet, hvor alfa-komplekset binder GTP og dissocierer fra betagamma-komplekset.

d. Nogle GPCR kan aktiveres af fotoner.

Dette udsagn er sandt, for G_t -proteinet (transducin) aktiveres af fotoner (lysenergi), som igen aktiverer omdannelsen af cGTP til GMP.

Isolerede arterier blev opsat i en myograf og stimuleret til ca. 80 % vasokonstriktion (kontraktion), hvorefter graden af vasodilatation (relaksation) efter tilsætning af VEGFA alene eller i kombination med en nitrogenoxid syntase (NOS) hæmmer (L-NAME) eller GLP-1 blev undersøgt (figur 2).



Figur 2. Isolerede arterier opsat i en myograf blev stimuleret til at kontrahere sig, hvorefter graden af relaksation efter tilsætning af VEGFA alene eller i kombination med L-NAME (A) eller GLP-1 (B) blev målt som procent af den initiale kontraktion. ** og *** indikerer p-værdier på henholdsvis mindre end 0,01 og mindre end 0,001. Modificeret fra Egholm et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016.

6. Forklar, med udgangspunkt i figur 2A, hvorledes VEGFA må formodes at ændre på arteriernes kontraktion. Svaret skal inkludere den signaleringsvej, som leder til ændringen.

I figur 2A ses det, at VEGFA alene fører til en relaksation på omkring 30%, sammenlignet med tilsætning af VEGFA i kombination med L-NAME, hvor graden af relaksation mindskes betydeligt (til omkring -20%). Dette resultat stemmer overens med, at NOS fremmer relaksation i glatmuskulatur, og hæmning af NOS ved tilsætning af L-NAME, som er en NOS hæmmer, har en modsatrettet og inhiberende effekt på relaksationen.

En signaleringsvej som leder til ændring af denne er G_s -proteinets signaleringsvej, hvor en forhøjet Ca^{2+} koncentration (som resultat af aktivering af IP3 receptoren) fører til dannelse af Ca^{2+} -calmodulin komplekset. Ca^{2+} -calmodulinkomplekset aktiverer CamkinaseII, som igen aktiverer NOS, ved omdannelse af arginin til citrulin og NO. Nitrogen oxid, NO kan diffundere frit til den glattemuskelcelle og aktivere guanylat cyklasen. Guanylat cyklasen omdanner GTP til cGMP. cGMP aktiverer PKG, som phosphorylerer RhoA til dens inaktive form RhoAP. RhoAP kan dermed ikke phosphorylere/aktivere ROK, og ROK igen ikke kan phosphorylere MLCP.

Myosin light chain phosphatase bliver dermed ved med at være aktiv, og fortsætter med at defosforilere myosins lette regulatoriske kæder. Dette mindsker dannelse af tværbroer, samt midkser kontraktionen hvorved relaksationen fremmes.

7. Forklar, med udgangspunkt i figur 1B og 2B, effekten af GLP-1 på VEGFA inducerede ændringer i arteriernes kontraktion.

I figur 1B så vi at tilsætning af GLP-1 modvirkede effekten af VEGFA. Dette ses også i 2B, hvor relaksationsgraden mindskes ved tilsætning af både GLP-1 og VEGFA, sammenlignet ved VEGFA alene. Dette kunne forklares ved, at en nedsat Ca^{2+} -koncentration vil mindske dannelse af Ca^{2+} -calmodulin komplekset, og dermed også nedsætte effekten af CamKinaseII. CamkinaseII vil dermed ikke kunne danne lige så meget NO, som kunne diffundere over i den glattemuskelcelle, og vi vil ikke få en lige så stor relaksation som vi så i figur 2A.

Opgave II

ApoE genet koder for apolipoprotein E, som blandt andet er med til at transportere kolesterol i blodbanen. *ApoE* genet er en del af et "gene-cluster", som ligeledes består af *ApoC1* og *ApoC2*.



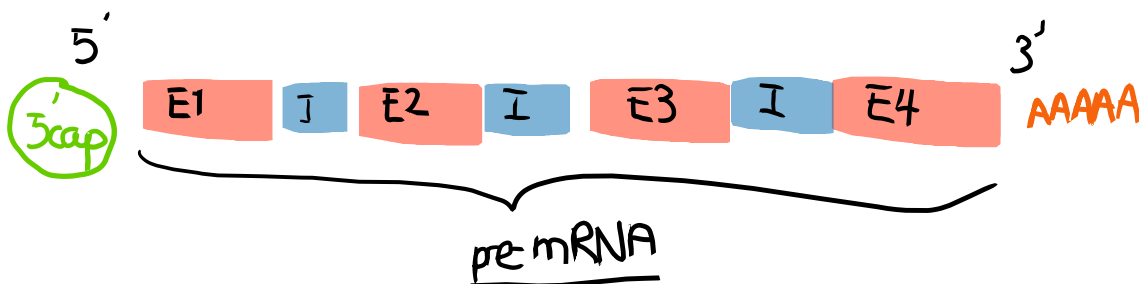
Figur 1. *ApoE* transskriptionsenheden. Den åbne læseramme, som koder for ApoE proteinet, er markeret med sort. Modificeret fra Husain et al., *Frontiers in Neuroscience* 15, 2021.

1.

a. **Beskriv (evt. ved hjælp af en skitse) opbygningen af ApoE mRNA (med modifikationer) ud fra transskriptionsenheden af *ApoE*.**

Nedenfor ses en skitse af opbygningen af ApoE mRNA med modifikationer fra 5' enden til 3' enden.

Exons 1 til 4 er angivet med rød, adskilt af introns (I) 1 til 3 markeret med blå. Disse exons splices ud under splicingprocessen. Modifikationer ses ligeledes, hvor 5' cap er markeret med lysegrøn og poly-A-halen (polyadenylering) er markeret med orange ved 3' enden.



b. **Angiv de teoretisk mulige ApoE mRNA splejsningsvarianter.**

De teoretisk mulige splicingvarianter er 4. (idet det første exon skal bære 5' cappen, og det sidste exon skal bære poly-A-halen, hvorved disse ikke kan splices ud)

2. Beskriv, hvordan et "gene-cluster" af relaterede gener opstår.

Geneclustre eller genefamilier opstår f.eks. ved homolog rekombination, hvis generne ender med at blive dupliserede. Dette sker ved homolog rekombination, idet man bruger et nærtliggende DNA-streng som template til at fikse DNA-strengs-skaden eller bruddet. Her kan der opstå overlap af strengene, hvorved vi får disse gene-clustre af genrelaterede gener.

ApoE proteinet findes i tre isoformer (E2, E3 og E4). Ved hjælp af DNA sekventering er der fundet en nukleotid-ændring i *ApoE3*, som medfører, at ApoE3 isoformen indeholder cystein på aminosyreposition 112, mens ApoE4 isoformen indeholder arginin på denne position. DNA sekvensen i *ApoE3*, der indeholder kodon for cystein, er: **5'-GTGCGGC-3'**

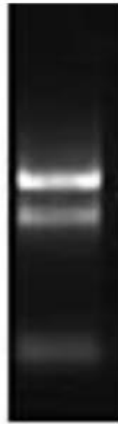
3. Redegør for, hvilken nukleotid-forskel i kodon for aminosyre 112 der forårsager forskellen mellem ApoE3 og ApoE4 isoformerne.

De nukleotidsekvenser der kan kode for cystein er UGU og UGC. De nukleotidsekvenser, der kan kode for arginin derimod er fire forskellige: CGU, CGC, CGA eller CGG. Det er Wobble-base parring, der muliggør at flere sekvenser der kan kode for samme aminosyre ved 3 positionen i kodontriplettet. Den nukleotidforskel i kodon for aminosyre 112, der forårsager forskellen mellem ApoE3 og ApoE4 isoformerne er dermed U og C.

4. Angiv, hvorfor dideoxy-nukleosid trifosfater (ddNTP'er) anvendes til Sanger sekventering af DNA.

Dideoxy-nukleosid trifosfater (ddNTP'er) anvendes til Sangerssekventering, således at vi kan finde den rette nukleotidsekvens ved at undersøge, hvilket komplementært basepar, der vandrer længst tilsvarende rækkefølgen for nukleotidsekvensen. (Eksempel: således at ddNTP'et G kan matches med C i den ukendte nukleotidsekvens).

Total RNA oprenses fra eukaryote celler og analyseres efterfølgende ved gel-elektroforese (figur 2).

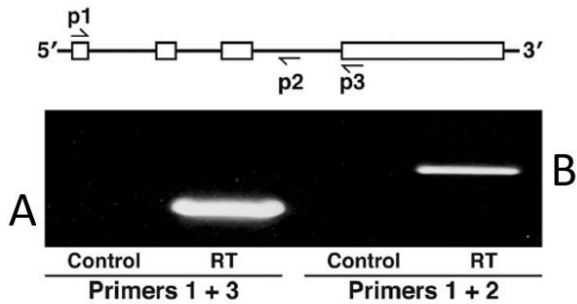


Figur 2. Gel-elektroforese af total RNA fra eukaryote celler. Modificeret fra Wang et al., Photochemical analysis, 2011.

5. Forklar resultatet i figur 2.

I figur 2 ses gel-elektroforese af total oprenset RNA fra eukaryote celler. Ribosomal RNA er det eukaryote celler har klart mest af. Ved det øverste, kraftigste og mest koncentrerede bånd må vi derfor antage, at dette er ribosomalt RNA (rRNA) fra den store ribosomale subunit. Det næste bånd må ligeledes være rRNA, men fra den lille ribosomale subunit. Til sidst i gelen har vi et mindre koncentreret bånd, hvor RNA'et er vandrer længst, hvorfor vi må formode, at dette er mindre RNA-typer, som udgøres af mRNA, tRNA, miRNA mfl.

Expression af *ApoE* genet i musehjerner blev analyseret med RT-PCR ved brug af to forskellige primersæt. Resultaterne viste tilstedeværelse af et produkt A ved brug af primersæt p1+ p3 og et produkt B ved brug af primersæt p1+p2 (figur 3).



Figur 3. Ekspresion af *ApoE* genet i musehjerner blev undersøgt med RT-PCR. **Øverst:** Analysen blev udført med to primersæt (p1+p3 og p1+p2). **Nederst:** Gel-elektroforese af RT-PCR produkterne (A og B). "Control" angiver analyser, hvor der ikke er tilsat revers transskriptase. Modificeret fra Xu et al., J Neuroscience 28, 2008.

6. Forklar resultatet i figur 3.

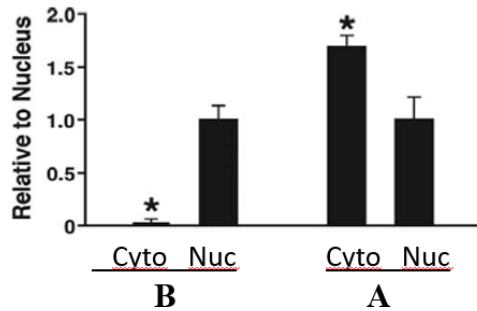
Ved kontrol ser vi intet resultat, idet der ikke er blevet tilsat reverse transskriptase.

Ved primers 1+3 derimod, ser vi et kraftigt og koncentreret bånd, der er vandret længst i gelen.

Dette kunne forklares ved, at produkt A er tilstede på primer 3 og primer 1, på de exons vist i figuren øverst. Der er relativt meget af produkt A sammenlignet med produkt B, men det er vandret længst i gelen, og må derfor være mindre/letter end produkt B.

Ved primers 1+2 ses et mindre kraftigt, men stadig tydeligt bånd, der ikke er vandret ligeså langt i gelen som med primers 1+3. Dette må være fordi primer 2, som sidder på et intron splices ud. Dog er der stadig en tilstedeværelse af produkt B på primer 1 ved det første exon, hvorfor vi stadig ser et bånd i den nederste figur.

Niveauerne af de RNA, som giver ophav til PCR produkterne A og B, i kerne og cytosol fra nerveceller blev undersøgt ved hjælp af kvantitativ RT-PCR og de to primersæt beskrevet i figur 3.



Figur 4. Relative niveauer af de RNA, som giver ophav til PCR produkterne B og A, i cytosol (Cyto) og kerne (Nuc) fra nerveceller blev analyseret med kvantitativ RT-PCR. * indikerer en p-værdi på mindre end 0,01. Modificeret fra Xu et al. J Neuroscience 28, 2008.

7. Forklar, med udgangspunkt i figur 4, hvorvidt det RNA, som giver ophav til RT-PCR produkt B, bliver translateret.

Ved produkt B ser vi et forholdsvis højt relativt niveau af de RNA, som giver opgave til PCR-produkterne i nucleus, men derimod et lavt relativt niveau af produktet i cytosolen. Man må derfor gå ud fra, at produkt B ikke bliver translateret, idet man ellers ville se et højt niveau af stoffet i cytosolen *såvel* som i kernen, idet translationsprocessen foregår i cytosolen og ikke i nucleus.

Ved produkt A derimod, ses i højt relativt niveau af de RNA-produkter, som giver opgave til produktet i cytosolen, og *samtidigt* ses også et ret højt relativt niveau af dette i nucleus. Dette indikerer derfor, at produkt A i høj grad bliver translateret.

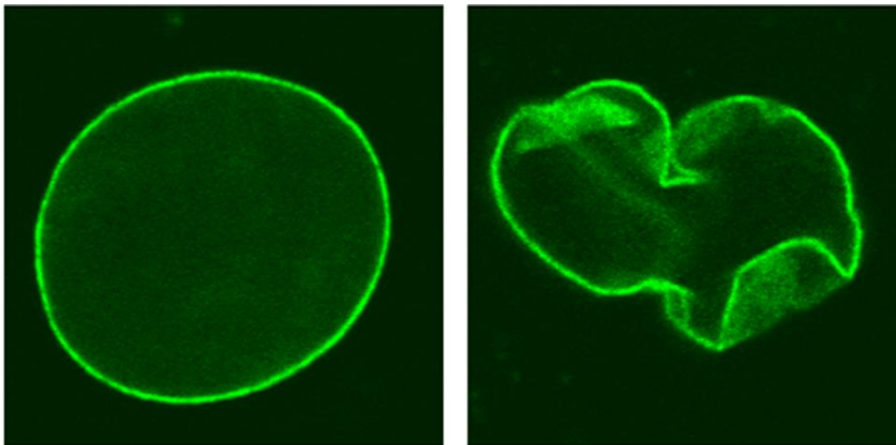
Opgave III

Kernen har en meget vigtig funktion i langt de fleste af kroppens celletyper og er involveret i en række sygdomme.

1. Beskriv, hvorledes proteiner selektivt bliver transporteret ind i kernen.

Proteiner fra cytosolen bliver selektivt transporteret ind i nucleus gennem det vi kalder kerneporer eller "nuclear pore complexes". Kerneporer er transmembrane proteiner, som sidder i forankret kernemembranen, De tillader import af bestemte proteiner, med den rette størrelse, hvorfor nucleus' indhold forbliver inde i kernen trods tilstedeværelsen af disse kerneporer.

Personer med Hutchinson-Gilford progeria syndrom (HGPS) ældes meget hurtigere end normalt. På cellulært niveau er HGPS karakteriseret ved, at morfologien af kernemembranen er forandret (figur 1).



Figur 1. Fluorescensfarvning af et snit gennem en kerne fra en normal celle (til venstre) og fra en celle hos en person med HGPS (til højre). Fra doi.org/10.1371/journal.pbio.0030395.

2.

a. Redegør for, hvilket strukturelt kerneprotein, der kan være defekt hos en person med HGPS.

På figuren ovenfor ses det tydeligt at kernemembranen struktur hos en person med HGSP er meget mere ustruktureret og "krøllet", sammenlignet med en kerne fra en normal celle til venstre. De proteiner som opretholder kernemembranen integritet, struktur og form er laminer. Derfor er der muligt, det der kan være en defekt hos laminerne hos en person med HGSP.

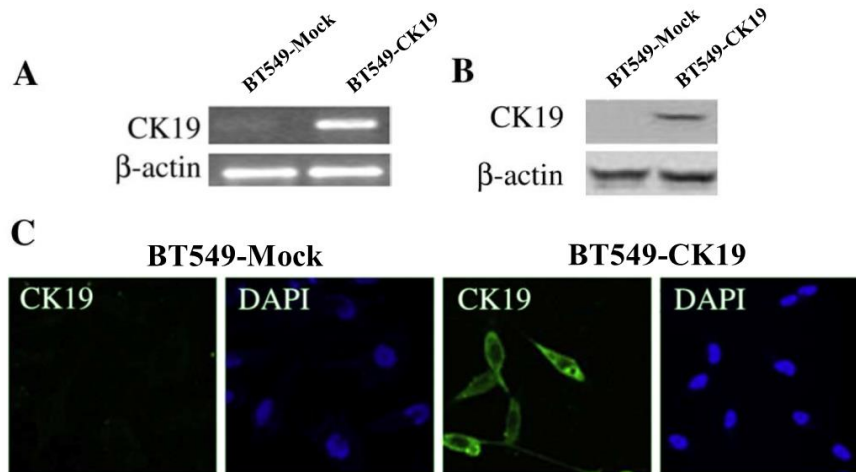
b. Angiv 2 andre proteiner, der er nødvendige for at opretholde kernemembranens integritet.

Derudover findes der også SUN- og KASH-proteiner (som hæfter sig sammen i det perinucleære rum) i kernemembranen, som er nødvendige for at opretholde kernemembranens integritet.

3. Redegør for, hvorledes kernemembranen destabiliseres under mitosen.

Under mitosen, mere specifikt i profasen og i prometafasen, vil kernen først kondenseret/fortættes og efterfølgende vil kernemembranen destabilieres. Denne destabilisering af kernemembranen udføres af M-Cdk'er, et kompleks dannet af cykliner og cyklin-dependent-kinaser. Disse M-Cdk'er phosphorylerer laminerne i kernemembranen, hvorved kernemembranen destabiliseres og fragmenteres, som er kendetegnet ved prometafsen.

En forskergruppe undersøgte ekspresionen og effekten af proteinet CK19 på en række cellulære processer i en cancercellelinje (BT549). I disse forsøg blev BT549 cellerne transfekteret med enten en CK19 ekspressionsvektor (BT549-CK19) eller en kontrolvektor (BT549-Mock).



Figur 2. Ekspresionsanalyser på BT549 celler transfekteret med enten en kontrolvektor (BT549-Mock) eller med en CK19 ekspressionsvektor (BT549-CK19) **A:** Gel-elektroforese af CK19 RT-PCR produkter fra BT549-Mock og BT549-CK19 celler. **B:** Analyse af CK19 ekspresion i BT549-Mock og BT549-CK19 celler ved anvendelse af western blot med antistoffer rettet mod CK19 og β -aktin. **C:** Immuncytokemisk farvning af CK19 protein i BT549-Mock og BT549-CK19 celler ved anvendelse af antistoffer (visualiseret i grønt). Cellekernerne er visualiseret ved DAPI i blåt. Modificeret fra Bambang et al. Experimental Cell Research, 2009.

4. Forklar resultatet i figur 2A og 2B. Svaret skal indeholde, hvilken yderligere information forskergruppen opnår ved at undersøge ekspresionen af CK19 med western blot, frem for kun at anvende RT-PCR.

I figur 2A ses tilstedeværelsen af BT549-CK19 grundet et stærkt koncentreret bånd ud fra denne. Derimod ses det, at BT549-Mock ikke er tilstede, og kan forklares ved at de ikke er transfekterede med en CK29 ekspressionsvektor.

I figur 2B ses et svagere bånd ud fra BT549-CK19 end ved RT-PCR-analysen i figur 2A, og stadig ingen tilstedeværelse af BT549-Mock. Dette kan forklares ved, at der her er tilsat antistoffer rettet mod CK-19, hvorfor deres ekspresion er mindskes, men dog ikke helt forsvundet. Dermed får forskergruppen, ved anvendelse af western blot og ikke kun RT-PCR, informeret at selv ved at antistof rettet mod CK-19, er dette ikke nok til en "slukke" helt for ekspresion ved BT549-CK19. (Beta-actin er i begge tilfælde anvendt som loading control, for at kontrollere, at der er lige meget produkt tilsat begge brønde.)

5. Forklar resultatet af figur 2C. Svaret skal indeholde, hvilken yderligere information forskergruppen opnår ved at undersøge ekspressionen af CK19 med immuncytokemisk farvning, frem for kun at anvende western blot.

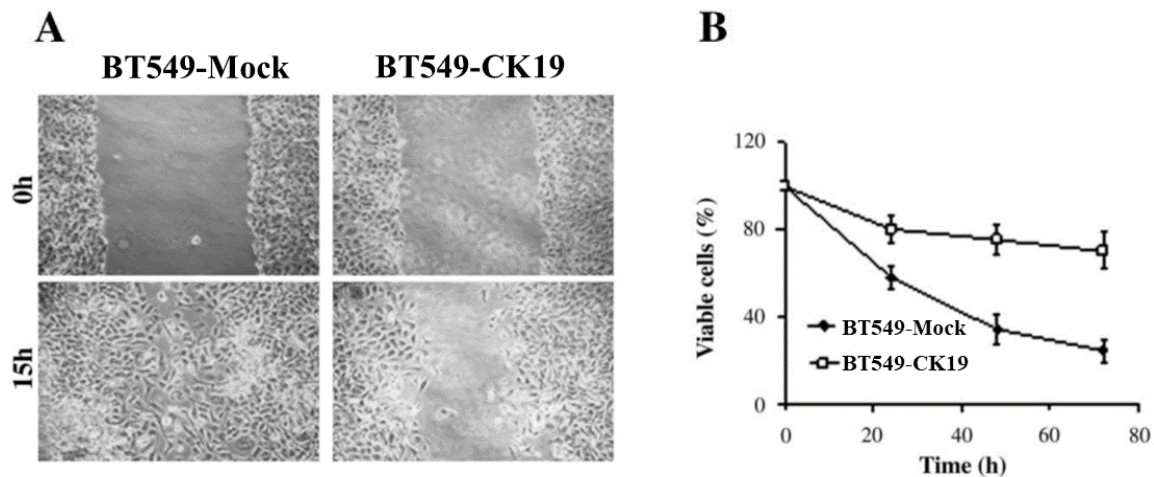
Ift. Tilstedeværelse af CK-19 stemmer resultaterne i figur 2C overens med resultaterne i 2A og 2B.

Der ses nemlig ikke CK-19 hos BT549-Mock, men stadig CK-19 ved BT549-CK19 cellerne.

Her kan man dog også se cellekerner, som er til stede ved både BT549-Mock og BT549-CK19, som er visualiseret ved DAPI med blå. Cellekernerne hos BT549-Mock ser mindre kondenserede ud end hos BT549-CK19, som er tætte og antages derfor for at være intakte.

Ved immuncytokemisk farvning får forskergruppen yderligere opnået, undersøgelse af ekspressionen af CK19, men også dennes effekt på cellernes cellekerner.

Forskerne undersøgte proliferationen (celledelingen) af BT549-Mock og BT549-CK19 celler, og resultaterne viste, at proliferationen var den samme for de to cellyper (resultatet er ikke vist). Forskergruppen udførte derefter analyser af en række cellulære processer i de transfekterede BT549 celler. Resultater fra et "Scratch wound healing assay", og et assay som måler levende celler ("viability assay"), er vist i figur 3.



Figur 3. **A:** "Scratch wound healing assay", hvor BT549-Mock og BT549-CK19 celler blev dyrket til 100 % tæthed, hvorefter cellerne blev skrabet af i det centrale område. De løse celler blev herefter fjernet ved udskiftning af dyrkningsmediet, og området blev fotograferet umiddelbart efter (0h) samt igen efter 15 timer (15h). **B:** Analyse af den relative mængde af levende ("viable cells") BT549-Mock og BT549-CK19 celler over tid (op til 75 timer) efter tilsætning af kemoterapimidlet doxorubicin. Modificeret fra Bambang et al. *Experimental Cell Research*, 2009.

6. Forklar resultaterne i figur 3A.

Figur 3A viser "Scratch wound healing assay", hvor BT549-CK19 og BT549-Mock cellerne blev dyrket til 100% tæthed, hvorefter de blev skrabet. Efter 15 timer ses det af der er langt flere celler i BT549-Mock end ved BT549-CK19, da der stadig er et mellemrum efter skrabet i det centrale område i BT549-CK19 cellerne. Vi må derfor konkludere, at selvom proliferationen er det samme hos begge cellelinjer (som forskerne havde undersøgt men ikke vist), er der trods dette flere viable celler hos BT549-Mock cellelinjen end hos BT549-CK19 ud fra resultaterne i figur 3A.

Forskere ønskede ligeledes at undersøge, om CK19 ekspresion har betydning for tumordannelse og metastasering i en musemodel. De inddelte derfor et antal mus i to grupper og injicerede BT549-Mock celler subkutan (under huden) i den ene gruppe og BT549-CK19 celler subkutan i den anden gruppe. Begge grupper mus blev samtidig behandlet med kemoterapimidlet doxorubicin.

Resultatet af dette forsøg viste 1. at de primære subkutane tumorer var væsentligt større i musene med BT549-CK19 celler end i musene med BT549-Mock celler og 2. at det kun var musene med BT549-CK19 celler, der udviklede metastaser.

7. Forklar ovenstående resultater (1. og 2.) ved inddragelse af figur 3.

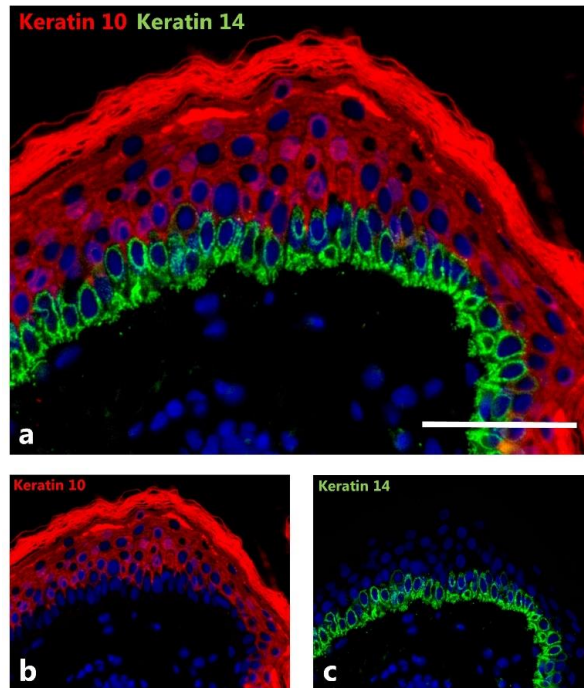
I figur 3B illustreres en analyse af den relative mængde af levende BT549-Mock og BT549-CK19 celler over tid (op til 75 timer) efter tilsætning af doxorubicin. Ud fra figur 3B kan vi tydeligt se, at der er flere viable celler i BT549-Mock linjen end ved BT549-CK19, hvor forskellen bliver større som tiden den går. Denne forskel i viable cells er størst til tiden omkring t75, hvor procenten af viable cells hos BT549-Mock er omkring 75% sammenlignet med BT549-CK19 med en viable cells procent på omkring 30% (værdierne aflæst af figuren og kan derfor være upræcise).

Hos musene med BT549-CK19 var de primære subkutane tumorer væsentligt større end ved BT549-Mock musene, og de udviklede metastaser. Dette må betyde at 1. procentdelen af viable cells faldet drastisk ved BT549-CK19 og 2. musene med BT549-CK19 oplever en dårligere virkning af kemoterapimidlet doxorubicin (dette kan være pga. den lave procent af levende celler, men måske at CK19 har en hæmmende effekt på doxorubicin – dette antages men er ikke sikker).

Hos musene med BT549-Mock var der ingen metastaser og mindre primære subkutane tumorer. Der var dermed flere viable cells og måske også bedre virkning af kemoterapimidlet, uden CK-19.

Opgave IV-A

I kroppens epitheler forekommer der over 20 forskellige keratiner. For at illustrere den heterogene ekspresion af keratiner i epidermis er der udført en immunhistokemisk farvning af hud, vist figur 1.



Figur 1. Immunhistokemisk farvning af epidermis ved anvendelse af antistoffer rettet mod henholdsvis keratin 10 og 14. (a) Ekspresion af keratin 10 ses i rødt og keratin 14 ses i grønt. Samme billede er vist med rødt (b) og grønt (c) hver for sig. Kernerne er farvet blå med DAPI. Bar, 50 μm . © KU 2023.

1.

a. **Beskriv metoden der er benyttet til at udføre den farvning, som er vist i figur 1a.**

Ved immunhistokemisk farvning anvendes både et primært antistof og et sekundært antistof. Det primære antistof er rettet mod den cellebestanddel, der ønskes undersøgt, og det sekundære antistof binder til det primære antistof og udtrykker en farve eller også en fluorescence. Denne kunne eksempelvis være fluorescerende.

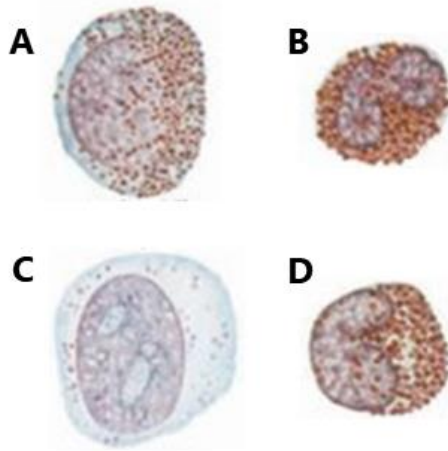
b. **Redegør for, hvilke cellekontakter der kan være påvirket, hvis keratin 10 er defekt som følge af en mutation.**

Hvis keratin 10 (rødt) er defekt som følge af en mutation, kunne dette påvirke de apikale cellekontakter. Dette kunne have betydning for selve forhorningen/keratiniseringen på den apikale flade, som dermed ikke ville kunne hæfte optimalt til det underliggende pladeepithel. Dette kan medføre både tab af struktur såvel som forhorning.

c. Redegør for, hvilke cellekontakter der kan være påvirket, hvis keratin 14 er defekt som følge af en mutation.

Hvis keratin 14 (grøn) er defekt som følge af en mutation, kunne dette påvirke de basale cellekontakter mellem epitelet og den underliggende basalmembran/basal lamina. Det er cellekontakter som hemidesmosomer (og evt. også fokale adhæsioner). Derudover kunne det også ligne, at koblingen mellem basalmembranen og det underliggende bindevæv kunne blive påvirket af sådan en mutation ud fra den grønne farvning i figur 1C.

Rød knoglemarv indeholder celler i forskellige modningsstadier.



Figur 2. Afbildning af 4 udvalgte trin i hæmopoiesen for en bestemt celletypes udviklingsrække.
Modificeret fra Ross & Pawlina.

2.

a. Angiv navnet på den mest differentierede celletype i figur 2.

Navnet på den mest differentierede celletype i figur 2 (B) er en eosinofil granulocyt.

b. Redegør for 3 morfologiske kendetegn der kan bruges til at bestemme differentieringsgraden af cellerne i figur 2. Svaret skal indeholde rækkefølgen af de 4 afbildede stadier fra mindst differentieret og til mest differentieret.

Morfologiske kendetegn for hæmopoiesen for den eosinofile granulocyt (granulopoiesen):

1. Cellen bliver gradvist mindre og mere kondenseret, det samme gælder for. Opnår til sidst en størrelse på omkring 15 mikrometer.
2. Cellen udvikler kraftige, eosinofile granula, og bliver derved også mere eosinofil i det hele taget.
3. Cellens kerne går fra at være en stor kerne til at være lapdelt, og karakteristisk for den eosinofile er en 2-lapdelt-cellekerne.

Rækkefølgen af de fire stadier er: *fra mindst til mest differentieret*

1. C
2. A
3. D
4. B

Granulopoiesen i det hele taget udvikledes således:

Promyeloblast – Myeloblast – Myelocyt – Metamyelocyt – N., E., eller B. granulocyt.

Processen, hvor knoglevæv dannes ved intramembranøs ossifikation, har en del lighedspunkter med brusk histogenese. Der er dog forskel på, hvorledes det nydannede knogle- og bruskvæv ekspanderer i det omkringliggende mesenchym.

3.

a. Beskriv lighedspunkter ved den initiale dannelse af henholdsvis knogle- og bruskvæv ved intramembranøs ossifikation.

Ligheder ved den initiale dannelse af knogle- og bruskvæv ved intramembranøs ossifikation er at der sker ud fra et primært ossifikations center/ chondrofikations center. Mesenchymale stamceller differentieres til hhv. osteoblaster og chondroblaster, der ved begge secernerer ECM. Når cellerne er voksende og har delt sig, dannes en indvæksttap, som forsyner det indre knogle eller den indre brusk med næring samt tillader indgang af flere osteoblaster eller chondroblaster.

b. Forklar forskellen på, hvorledes det nydannede knogle- og bruskvæv ekspanderer.

Nydannede knoglevæv ekspanderer ved, at osteocytter secernerer osteoid (ECM) indtil det bliver til en osteocyt i lacuna. Knogle kan ekspandere ved længdevækst eller ved knogleremodellering, hvor der dannes en Haversk kanal (osterklastrer nebygger, og osteoblasterne bygger op indtil de bliver til osteocytter i lacuna).

Nydannede bruskvæv ekspanderer ved lidt på samme måde, men med andre celler. Chondroblaster secernerer ECM indtil de bliver "fanget" som chondrocytter i lacuna. Kan være følgende brusktyper: Elastisk brusk, fibrøs brusk eller den mest almindelige typer, nemlig hyalinbrusk.

Opgave IV-B, SPOT

SKEMA TIL SPOTPRØVE	
CASE 1	
Spørgsmål 1	Angiv markeret overfladeepithel
Svar	Flerlaget pladeepithel med forhorning (keratinisering)
Spørgsmål 2	Angiv markeret væv
Svar	Tæt uregelmæssigt bindebæv
Spørgsmål 3	Angiv markeret væv
Svar	Glatmuskulatur
CASE 2	
Spørgsmål 4	Angiv markeret væv
Svar	Tværskåret skeletmuskulatur
Spørgsmål 5	Angiv markeret struktur
Svar	Exokrin merokrin mukøst endestykke
CASE 3	
Spørgsmål 6	Angiv markeret struktur/væv
Svar	Neuropil
Spørgsmål 7	Angiv markeret væv
Svar	Spinal ganglion
Spørgsmål 8	Angiv markeret intracellulær struktur
Svar	Nissl substans (rER)
CASE 4	
Spørgsmål 9	Angiv markeret væv
Svar	Exokrint holokrint kirtelvæv
Spørgsmål 10	Angiv markeret væv
Svar	Perifer nerve (PNS)
Spørgsmål 11	Angiv markeret celletype
Svar	Erytrocyt
Spørgsmål 12	Angiv markeret struktur
Svar	Udførselsgang
CASE 5	
Spørgsmål 13	Angiv markeret væv
Svar	Kompakt knoglevæv (substantia compacta)
CASE 6	
Spørgsmål 14	Angiv markeret væv
Svar	Længdeskåret hjertemuskulatur
CASE 7	
Spørgsmål 15	Angiv markeret struktur
Svar	Muskulær arterie

Excitable celler

I. Nerveledningshastighed, aktionspotentialer, og refraktærperiode

1. Redegør for faktorer der kan påvirke nerveledningshastigheden i en perifer nerve.

Nerveledningshastigheden påvirkes af den indre modstand (R_i), som mindskes ved forøget axondiameter. Nerveledningshastigheden øges, når den indre modstand mindskes.

Nerveledningshastigheden øges også hvis membranmodstanden stiger, og dette kan lade sig gøre ved myelinisering som øger ledningshastigheden. Til slut kan temperaturen også have en indvirkning på ledningshastigheden, idet en øget temperatur medfører øget kinetik og dermed en øget nerveledningshastighed.

2. Redegør for den selvforstærkende kobling mellem membrandepolarisering og Na^+ konduktans under den første opadgående fase i aktionspotentialer.

Ved aktionspotentialerens opstroke er det primært Na^+ , som har en betydning, idet de Na^+ v kanalerne er aktive/åbne i denne fase, hvorfor Na^+ konduktans er øget i opstroke. Na^+ er afgørende for depolariseringen og dermed har Na^+ en betydning for aktionspotentialerens amplitude.

3. Redegør for hvilken tilstand spændingsfølsomme Na^+ kanaler befinder sig i 1 ms efter toppen af aktionspotentialer.

1 ms efter toppen af et aktionspotentialer, befinder vi os i efterhypolariseringen. her vil Na^+ kanalerne være lukkede eller deaktiverede. De er ikke Na^+ kanaler der spiller en rolle i denne fase, det er nemlig K^+ kanalerne, som åbner og lukker med et delay.

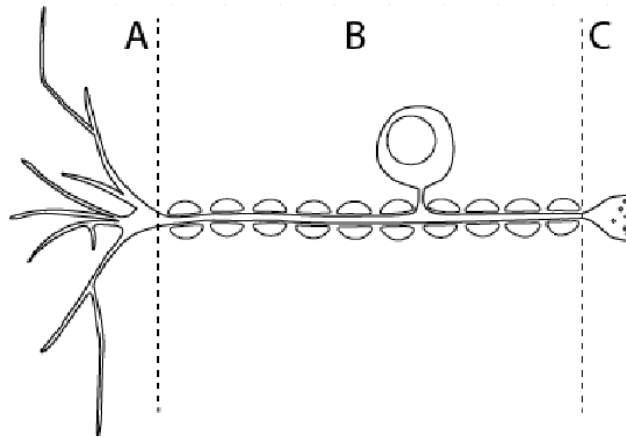
4. Redegør for aktionspotentialerens refraktærperiode.

Refraktærperioden er den periode, hvor man ikke kan generere et nyt aktionspotentialer. Mere specifikt kan dette opdeles i to periode:

1. Den relative refraktærperiode: Her er det svært at generere et aktionspotentialer, men stadig muligt, idet der er nogle Na^+ kanaler, som er aktiverede.
2. Den absolutte refraktærperiode: Her er det umuligt at generere et aktionspotentialer, idet Na^+ kanalerne er lukkede, hvorved der ikke kan ske en depolarisering, og dermed generering af et nyt aktionspotentialer.

II. Strækreceptor

Figuren nedenfor viser en nervecelle der har en strækreceptorfunktion. De to stiplede linjer adskiller tre funktionelle dele af cellen. Sansecellens soma er også indtegnet, men dets funktion skal ikke adresseres i denne opgave.



1.

- a. Angiv hvor i cellen man primært finder strækfølsomme kanaler og hvad man kalder denne del af cellen.**

Man finder primært strækfølsomme kanaler i (A) dendritterne, som opfanger strækket.

- b. Redegør for hvilken funktion de strækfølsomme kanaler har.**

Strækreceptorer registrerer et stræk og de strækfølsomme kanaler har til opgave, at lade Ca^{2+} strømme ind i cellen, således at vi kan få depolariseret cellen. En depolarisering medfører i sidste ende generering af et aktionspotentiale, som kan sendes videre langs axonet af dette neuron.

2.

- a. Angiv hvor i cellen man forventer at finde spændingsfølsomme Na^+ kanaler og hvad man kalder denne del af cellen.**

De spændingsfølsomme Na kanaler findes langs cellens axon (B).

b. Redegør kort for hvilken funktion de spændingsfølsomme Na⁺ kanaler har i denne del af cellen.

De spændingsfølsomme Na kanaler åbner underdepolarisering, og tillader Na influx. Na influx generer en depolarisering og aktionspotentialet ”vandrer” langs axonet indtil det når soma.

3.

a. Angiv to steder i cellen, hvor man forventer at finde spændingsfølsomme Ca²⁺ kanaler samt hvad man kalder disse strukturer.

Spændingsfølsomme Ca kanaler findes både i cellemembranen og i plasmamembranen af det endoplasmatiske retikulum (ER-membranen). Disse kaldes L-type Ca kanaler.

b. Redegør kort for hvilken funktion Ca²⁺ kanalerne har hver af disse to steder i cellen.

I begge de ovennævnte Ca kanaler er funktionen at øge den intracellulære koncentration af Ca. Ved Ca kanaler i cellemembranen bringes Ca fra ekstracellulærrummet til cytosolen. Ved Ca kanaler i plasmamembranen af det endoplasmatiske retikulum, fragtes Ca fra ER til cytosolen. I begge tilfælde øges den intracellulære calciumkoncentration.

Cellen registrerer nu et pludseligt øget stræk af det væv den sidder i.

4. Redegør for hvordan det påvirker cellens aktivitet i henholdsvis A, B og C.

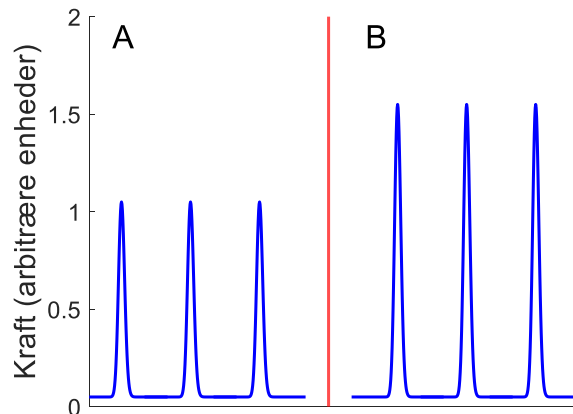
Når et stræk registreres ved dendritterne (A) vil aktionspotentialet begynde sig langs axonet (B) indtil det når soma, hvor nerveimpulset opfanges, og sendes videre langs axonet igen fra Axon Hillock. Ved axonterminal (C), vil aktionspotentialet føre til frigivelse af vesikler med neurotransmitter, som diffunderer over den synaptiske kløft fra den præsynaptiske neuron til den postsynaptiske neuron.

III. Muskelfysiologi

En ukendt muskel monteres i en myograf og muskelvævet stimuleres direkte elektrisk med et interval på 1 sekund. Kraften som funktion af tid ses i figurens panel A.

1. Angiv hvilken eller hvilke muskulaturer, der kan være tale om på denne baggrund.

Glatmuskulatur.



Nu tilsættes der noradrenalin til badet. Der stimuleres fortsat elektrisk og kraften måles igen som funktion af tid (panel B)

2. Redegør for hvilken muskulatur, der kan være tale om på denne baggrund. Herunder den underliggende signalering nedstrøms for noradrenalin.

Noradrenalin er en neurotransmitter, som medfører en kraftstigning efter stimulationen hos det, der må være glatmuskulatur. Noradrenalin går ind og påvirker den intracellulære Ca koncentration ved at aktivere ligand-gatede Ca kanaler. En høj intracellulær koncentration af Ca, medfører dannelse af Ca-calmodulin komplekset, som aktiverer CamKinaseII. CamKinaseII phosphorylerer myosins lette regulatoriske kæder, hvorved vi kan få dannet ATP fra ADP + Pi. Dermed har vi en øget tværbodannelse og øget kontrakten/kraft.

3. Redegør for effekten på kontraktionerne, hvis Ca^{2+} fjernes fra den ekstracellulære væske.

Hvis Ca fjernes fra den ekstracellulære væske vil vi ikke kunne øge den intracellulære koncentration af Ca. Efterfølgende vil dette påvirke Calcium binding til calmodulin samt aktivering af CamkinaseII. Uden phosphorylering af myosins leetterregulatoriske kæder, nedsættes tværbodannelse og dermed og kontraktion og kraften. Vi vil dermed få en relaxation i stedet for en kontraktion.

