

SENSORVEILEDNING

Emnekode:	IRBIO24016
Emnenavn:	Celle- og molekylærbiologi
Eksamensform:	Skriftlig
Dato:	05.11.19
Faglærer(e):	Anette Lie-Jensen Norunn Storbakk Maria Dung Cao Beathe K. Granerud Catherine Halvorsen
Eventuelt:	

Sensorveiledningen skal sikre en faglig forsvarlig og upartisk vurdering. Den bør derfor blant annet sikre at sensor har innsikt i hva som har vært fokus i undervisningen, og at sensor er kjent med hvilke deler av emnets innhold og undervisning som er særlig relevant for vurderingen. Ved klage på karakter har sensorveiledningen en særlig viktig funksjon: den skal bidra til at klagesensor så langt som mulig har samme informasjonsgrunnlag som ordinære sensorer.

Læringsutbytte for emnet:

Generell mikrobiologi

Studenten skal kunne:

- tegne og beskrive prokaryote cellers oppbygning og funksjon.
- gi en oversikt over eukaryote mikroorganismer og deres karakteristika.
- forklare begrepene biofilm og quorum sensing.
- tegne og beskrive en bakteriell vekstkurve.
- beskrive hvilken betydning osmotisk trykk har på mikrobiell vekst.
- klassifisere mikroorganismer basert på deres oksygenkrav.
- beskrive ulike metoder for å begrense eller stoppe mikrobiell vekst.
- Sterilteknikk.
- beskrive og forklare prinsippene for de mest grunnleggende undersøkelsene for påvisning av bakterier, inkludert trinnene i gramfarging.
- forklare betingelser for vekst hos bakterier, og beskrive hvordan kunnskapen kan benyttes i identifikasjon av bakteriene.

Molekylær genetik

Studenten skal kunne:

- gjøre rede for oppbygningen og funksjon til DNA.
- angi forskjeller mellom DNA og RNA.
- beskrive form og funksjon til mRNA, tRNA, rRNA.
- illustrere flyten av genetisk informasjon fra DNA til protein.
- gi en oversikt over struktureringen av genetisk materiale i det humane genom.
- forklare hvordan og hvorfor replikasjon av DNA foregår.
- kjenne til hvordan og hvorfor reparasjon av DNA foregår med fokus på "mismatch repair".
- forklare hva revers transkripsjon er.
- forklare hvordan transkripsjon initieres, elongeres og termineres i prokaryoter.
- beskrive mRNA-prosessering: 5'-cap, 3'-hale og RNA-splicing.
- kjenne til ulike faktorer som regulerer transkripsjon/genuttrykk.
- beskrive proteinsyntese og de sentrale makromolekylene som inngår i prosessen.
- kjenne til begrepet epigenetik.

Virus

Studenten skal kunne:

- definere virus.
- beskrive forskjellen mellom virus og en obligat intracellulær prokaryot celle.
- angi hva virusgenom koder for.
- angi hva virusgenom ikke koder for.
- beskrive morfologi.
- forklare grunnlaget for Baltimors klassifikasjon av virus.
- gi eksempler på replikasjonsstrategier til DNA- og RNA-virus.
- beskrive eksempler på cytopatisk effekt (CPE).
- beskrive prinsippet for plaque assay.
- beskrive bakteriofags lytiske og lysogene livssyklus.
- sammenligne virusreplikasjon i dyreceller og bakterier.
- beskrive resultatet av lysogeni.
- beskrive henholdsvis generell og spesialisert transduksjon.
- forklare henholdsvis akutt, kronisk og latent virusinfeksjon.

Mikrobiell genetik og molekylærbiologiske metoder

Studenten skal kunne:

- angi forskjeller og likheter mellom prokaryot og eukaryot genetisk materiale.
- beskrive genoverføring og rekombinasjon mellom bakterier (konjugasjon, transduksjon og transformasjon).
- forklare hvordan Lac-operon reguleres.
- forklare hva en DNA-vektor er og gi eksempler på nytteverdi av disse.
- forklare hva restriksjonsenzym er og nytteverdien innen rekombinant DNA teknologi.
- redegjøre for konvensjonell polymerasekjedereaksjon (PCR) både mhp ingredienser og temperatursykluser.
- ha kjennskap til real-time PCR/qPCR.
- utføre enkle, grunnleggende genteknologiske metoder på laboratoriet.

Eukaryot cellebiologi

Studenten skal kunne:

- beskrive generelle mekanismer for proteinsortering i eukaryote celler.
- redegjøre for hvordan proteiner går inn i og gjennom sekretorisk vei.
- kunne gi eksempler på proteiner som bruker sekretorisk vei med ulik destinasjon.
- forklare hvordan GTPaser reguleres av GEF og GAP.
- vite hva kinaser og fosfataser er.
- definere endokrin, parakrin og autokrin signaloverføring.
- kjenne til hvordan celler kommuniserer vha ekstracellulære signalmolekyler.
- sammenlikne overflatereseptorene RTK og GPCR.
- beskrive Ras-MAPK kaskaden.
- gjøre rede for de ulike fasene i en eukaryot cellyklus.
- forklare formålet og resultatet av både mitose og meiose.
- vite hvorfor det finnes sjekkpunkter i eukaryot cellyklus.
- forklare hva cyclin-avhengige kinaser er og deres funksjon i cellyklus.
- skal ha kjennskap til generelle prinsipper i cancerutvikling.
- skal kunne beskrive egenskaper en kreftcelle kan tilegne se.g
- skal kunne definere hva oncogener og tumor suppressorgener er.
- forklare hva en stamcelle er og gi eksempler på ulike typer av disse.
- gi eksempler på hva stamceller kan brukes til i medisin.

Litteraturliste

Tortora, Gerard J. Berdell R. Funke & Christine L. Case (2016). Microbiology: an introduction. (12. utg) San Francisco, Calif. : Pearson/Benjamin Cummings.

Sjøberg, Nils Olav (2013). Molekylær genetikk: genteknologi - humant DNA, 333 s. (5. utg.) Nesbru : Vett & viten ISBN 978-82-412-0702-0

Cooper, Geoffrey M. Robert E. Hausman (2014). The cell : a molecular approach. (7. utg.) Washington : ASM Press/Sinauer Associates

Papachristodoulou, Despo. Alison Snape, William H. Elliot & Daphne C. Elliot., (2014) Biochemistry & Molecular Biology, (5. utg) Oxford, ISBN 978 019 960949 9

Undervisningsplan

UKE	DAG	TID	ROM	TEMA	LÆRER
MIKROBIOLOGI					
34	Tirs 20.08.2019	8.15-10.00	S-222	Introduksjon til generell mikrobiologi	NS
	Ons 21.08.2019	10.15-12.00	S-222	Prokaryote celler	NS
	Tors 22.08.2019	8.15-10.00	S-222	Prokaryote celler. Mikrobielle metabolisme	NS
35	Man 26.08.2019	10.15-12.00	S-222	Mikrobiell vekst	NS
	Tirs 27.08.2019	10.15-12.00	S-222	Mikrobiell vekstkontroll	NS
	Ons 28.08.2019	8.15-10.00	S-222	Intro til lab - obligatorisk Dyrkning og identifikasjon av bakterier	BKG/CKH
36	Man 02.09.2019	09.15-16.00	H-126/ H-127	Lab i mikrobiologi - obligatorisk	BKG/CKH /WKL
	Tirs 03.09.2019				
	Ons 04.09.2019				
GENETIKK					
36	Tors 05.09.2019	8.15-10.00	S-222	Det humane genom	AL-J
	Fre 06.09.2019	8.15-10.00	S-222	Replikasjon og reparasjon av DNA	AL-J
37	Man 09.09.2019	8.15-10.00	S-222	Transkripsjon og genuttrykk	AL-J
	Ons 11.09.2019	8.15-10.00	S-222	Translasjon / Proteinsyntese	AL-J
	Fre 13.09.2019	8.15-10.00	S-502	Molekylær genetikk	AL-J
38	Tirs 17.09.2019	12.15-16.00	S-222	Seminar – obligatorisk «Etikk ved assistert befruktning» og «Epigenetikk»	AM BMJ
VIRUS					
39	Man 23.09.2019	10.15-12.00	S-222	Virus	NS
	Tirs 24.09.2019	10.15-12.00	S-222	Virus	NS
	Tors 26.09.2019	8.15-10.00	A-314	Virus	NS
	Fre 27.09.2019	8.15-10.00	A-314	Virus	NS
MIKROBIELL GENETIKK OG MOLEKYLÆRBIOLOGISKE METODER					
40	Man 30.09.2019	8.15-10.00	S-222	Mikrobiell genetikk og molekylærbiologiske metoder	BKG
	Tirs 01.10.2019	8.15-10.00	S-223	Molekylærbiologiske metoder	BKG
	Ons 02.10.2019	8.15-10.00	A-314	Molekylærbiologiske metoder	BKG
EUKARYOT CELLEBIOLOGI					
41	Man 07.10.2019	8.15-10.00	S-222	Cellesyklus	MDC
	Tirs 08.10.2019	8.15-10.00	N-204	Proteinsortering; sekretorisk vei	MDC
	Ons 09.10.2019	8.15-10.00	S-222	Cellekommunikasjon og signalveier	MDC
	Tors 10.10.2019	8.15-10.00	S-222	Stamceller	MDC
	Fre 11.10.2019	8.15-10.00	S-222	Cancer	MDC
44	Man 28.10.2019	08.15-10.00	S-222	Forberedelse til lab – obligatorisk Molekylærbiologi	BKG/CKH
	Tirs 29.10.2019	9.15-16.00	H-126/ H-127	Lab i molekylærbiologi - obligatorisk	BKG/CH
	Ons 30.10.2019	9.15-16.00			
	Tors 31.10.2019	9.15-14.00			
	Fre 01.11.2019	9.15-14.00			

Generell kommentar til løsningsforslagene

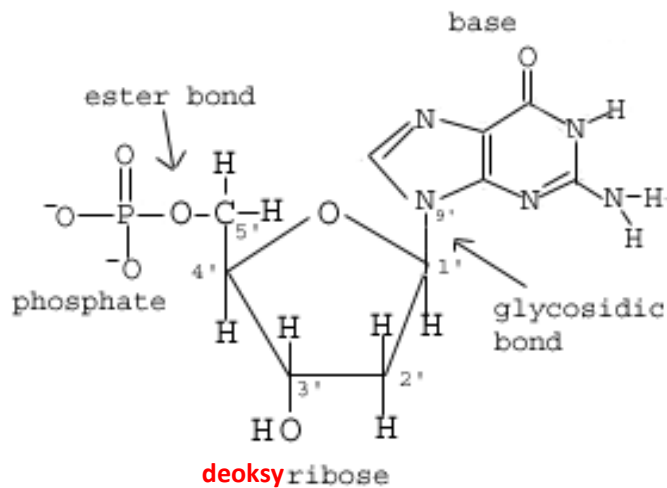
Vurdering: Karakter A-F

<i>Symbol</i>	<i>Betegnelse</i>	
A	Fremragende	Fremragende prestasjon som klart utmerker seg. Kandidaten viser svært god vurderingsevne og stor grad av selvstendighet.
B	Meget god	Meget god prestasjon. Kandidaten viser meget god vurderingsevne og selvstendighet.
C	God	Jevnt god prestasjon som er tilfredsstillende på de fleste områder. Kandidaten viser god vurderingsevne og selvstendighet på de viktigste områdene.
D	Nokså god	En akseptabel prestasjon med noen vesentlige mangler. Kandidaten viser en viss grad av vurderingsevne og selvstendighet.
E	Tilstrekkelig	Prestasjonen tilfredsstillende minimumskravene, men heller ikke mer. Kandidaten viser liten vurderingsevne og selvstendighet.
F	Ikke bestått	Prestasjon som ikke tilfredsstillende de faglige minimumskravene. Kandidaten viser både manglende vurderingsevne og selvstendighet.

Oppgavene er ikke gitt poengsummer, da de hovedsakelig ønskes vurdert ut fra nivå på kunnskap og vurderingsevne, og ikke på bakgrunn av oppnådd poengsum. For karakter A/B må studentene vise fremragende/meget god evne til analyse, syntese og vurdering i tillegg til kunnskap, forståelse og anvendelse. Retteguiden er stikkordsbasert og ikke nødvendigvis 100% utfyllende.

Oppgave 1

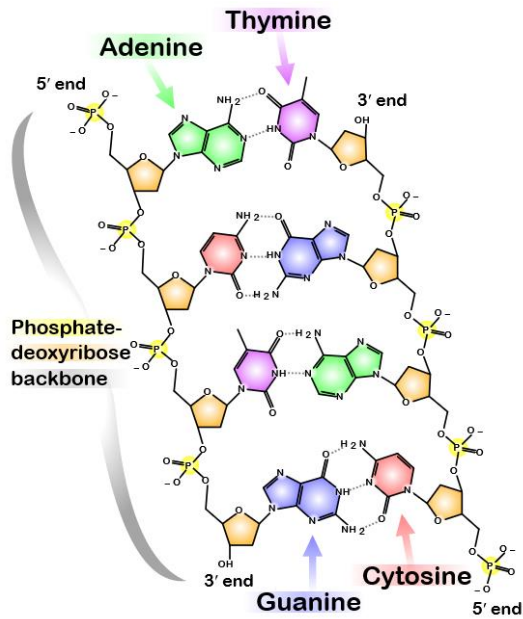
- a) Hvordan er ett nukleotid bygget opp? Hvordan er et DNA-molekyl bygget opp? Tegn og forklar. Hva menes med 3' og 5'-ende av DNA-molekylet?



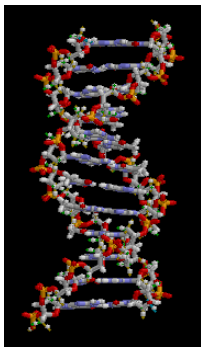
Detaljene i basen er ikke krevd i tegningen av nukleotidet.

Nukleotidene består av fosfatgruppe, suktermolekyl (2'Deoksyribose), base (Pyrimidiner: Cytosin & Tymin. Puriner: Adenin & Guanin). Fosfatgruppen er bundet til suktermolekylet med et esterband og basen er bundet til suktermolekylet med glykosidband. Nukleotidene polymeriseres til et ssDNA-molekyl ved at den frie 3' OH-gruppen på ett nukleotid bindes til den fri 5' fosfatgruppen på ett annet nukleotid. Vi kaller derfor den enden av DNA-molekylet som har en fri 3'OH-grupper for den 3' enden av molekylet, mens den enden som har en fri fosfatgruppe blir den 5' enden.

Disse ssDNA-trådene vil komplementær baseparres med en annen ssDNA (G – C og A – T). Bindingen mellom de to basene er hydrogenband. Trådene vil være antiparallele (5' ende på det ene molekylet vil være 3' ende på det andre).



Disse to trådene vil vri seg som en vindeltrapp. Fosfatgruppene vender ut og danner et negativt ladet backbone/ryggrad.



- a) Noen ganger skjer det feil i replikasjonen og vi får en mismatch. Hva er en mismatch? Når dette skal rettes opp er det viktig at cellen vet hvilken av DNA-trådene som var det opprinnelige templatet. Hvordan gjør prokaryote celler dette? Hva med eukaryote celler?

Mismatch er når du baser ikke er korrekt parret. F.eks. en A mot G eller en C mot en T.

Prokaryote celler:

Adenin i GATC-sekvenser metyleres i prokaryot DNA, men dette tar noe tid, så nydannet DNA mangler disse metyl-gruppene.

Eukaryote celler:

Nydannet DNA-tråd gjenkjennes på grunn av enkeltrådige kutt mellom okazaki-fragmentene på etterfølgende tråd. Mindre bevis for hvordan dette gjøres på ledende tråd.

- DNA-polymerase har noen viktige funksjoner i å sikre korrekt baseparring under replikasjonen. Hva er disse funksjonene? Gi også ett eksempel på hvordan replikasjonsfeil kan rettes etter at replikasjonen er ferdig.
- *DNA-polymerase kan «kjenne» om riktig base er i det aktive setet før basen polymeriseres på den nydannede DNA-tråden og øker dermed andelen korrekte baser sammenlignet med enkel baseparing (uten DNA-polymerase).*
- *DNA-polymerase kan korrekturlese. Det betyr at DNA-polymerase kan kjenne at det ble satt inn et feil nukleotid. Da stopper polymerasen opp, fjerner det gale nukleotidet og forsøker på nytt. DNA-polymerase har 3'-5' exonukleaseaktivitet.*
- *Mismatch repair kan rette opp feil som skjer under replikasjonen, men som ikke rettes av DNA-polymerase sin korrekturlesningsegenskap. Mismatch-repair maskineriet i prokaryoter består av MutS, MutL og MutH. MutS skanner den nylagede DNA-tråden for mismatch. Om den finner en mismatch danner den ett kompleks med MutL og MutH. MutH har endonuklease aktivitet og kutter i tråden. MutS/MutL/helikase fjerner DNA-biten mellom GATC og feilen. Til slutt kommer DNA-polymerase og ligase og fyller inn hullet. Eukaryote har homologer til MutS og MutL, som binder seg til mismatch baser. Deretter fjernes DNA-tråden mellom mismatchen og kuttet mellom okazaki fragmentene. Til slutt kommer DNA-polymerase og ligase og fyller igjen hullet.*

Oppgave 2

- a) Bakterienes behov for oksygen varierer. Hva er grunnen til denne variasjonen? Hvordan kan vi gruppere bakteriene basert på oksygenbehovet?

Delvis redusert oksygen er svært reaktivt (frie oksygenradikaler = giftig oksygen). Reagerer med cellekomponentene: cellene skades/dør.

-Grunnen til variasjon: Hvorvidt bakteriene har enzymer som superoxid dismutase (SOD) og katalase som kan nøytralisere giftig oksygen.

Superoxid dismutase (SOD): $O_2^- + O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Catalase: $2H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$. (eventuelt peroxidase: $H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O$. (ikke dannet O_2))

***-Obligat aerobe**, og, **fakultativ anaerobe** (foretrekker oksygen, men kan også vokse anaerobt), har begge både SOD og katalase.*

***-Obligat anaerobe** mangler begge enzymer og tåler derfor ikke oksygen.*

*Pluss: **-Mikroaerofile** krever noe oksygen men mangler begge enzymene. Dør hvis de eksponeres for normal atmosfærisk oksygen.*

Pluss: **-Aerotolerante anaerobe** har kun SOD.

b) Definer osmose og osmotisk trykk.

Osmose er transport av vann gjennom semipermeabel membran.

Osmotisk trykk er trykket som trengs for å hindre vannet i å bevege seg fra høy til lav **vannkonsentrasjon** (hindre osmose)

Hva skjer med følgende bakterier:

i: obligat halofil i en isoton løsning

Obligat halofil krever like høy saltkonsentrasjon i miljøet som konsentrasjonen av oppløste partikler inne i bakterien: isoton betyr lik. Vanntransport inn i cella tilsvarer da transporten ut. Bakterien lever.

ii: *E.coli* i hyperton løsning

Hyperton betyr høyere saltkonsentrasjon i løsningen enn i cella. Vann går ut av cella til løsningen med lavest vannkonsentrasjon: Bakterien skrumper sammen (plasmolyse).

Svarene skal begrunnes.

c) Forklar begrepet biofilm.

Samfunn av mikroorganismer (bakterier, arkebakterier, protozoer, sopp) omgitt av slimlag som dekker overflaten til levende og ikke-levende overflater.

Slimlaget: ekstracellulær polymerisk substans:- polysakkarider, proteiner og DNA

*-Letter kommunikasjonen. Pluss dersom beskriver **Quorum sensing**: kjemisk celle-celle kommunikasjon for koordinering - produksjon, sekresjon og deteksjon av signalmolekyler som regulerer genuttrykk.*

Resultat: koordinert aktivitet som f.eks toksin/antibiotika sekresjon til gjensidig beskyttelse

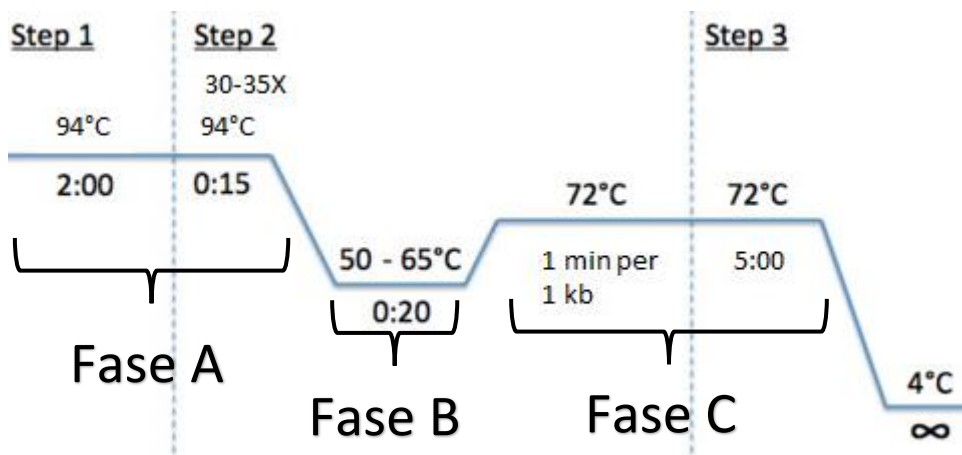
-Letter muligheten for horisontal genutveksling; skaper nye egenskaper. Pluss dersom nevner problem for oss: sprer antibiotikaresistens.

-Gir næring og beskyttelse, bl.a mot antibiotika og desinfeksjonsmidler. Pluss dersom nevner problem for oss: antimikrobielle midler som fungerer i en test/på lab, fungerer dårlig ute på mikroorganismer som lever i biofilm.

Pluss for annen relevant informasjon/utdyping.

Oppgave 3

Læringsmål som testes: Kunne redegjøre for konvensjonell polymerasekjedereaskjon (PCR) både mhp ingredienser og temperatursykluser (samt delvis kjennskap til molekylærbiologiske teknikker).



Figuren over viser en typisk protokoll for en konvensjonell trestegs-PCR.

a) Forklar hvilke reagenser som trengs for å sette opp en PCR.
Termostabil polymerase, nukleotider (dNTPs), buffer med optimal pH for enzymet og optimal saltkonsentrasjon – særlig $MgCl_2$ (viktig kofaktor), forward primer, reverse primer og nukleasefritt vann til ønsket sluttvolum. I tillegg trengs også templat (DNA).

b) Forklar hva de tre fasene i en PCR heter og hva som skjer i de ulike fasene.

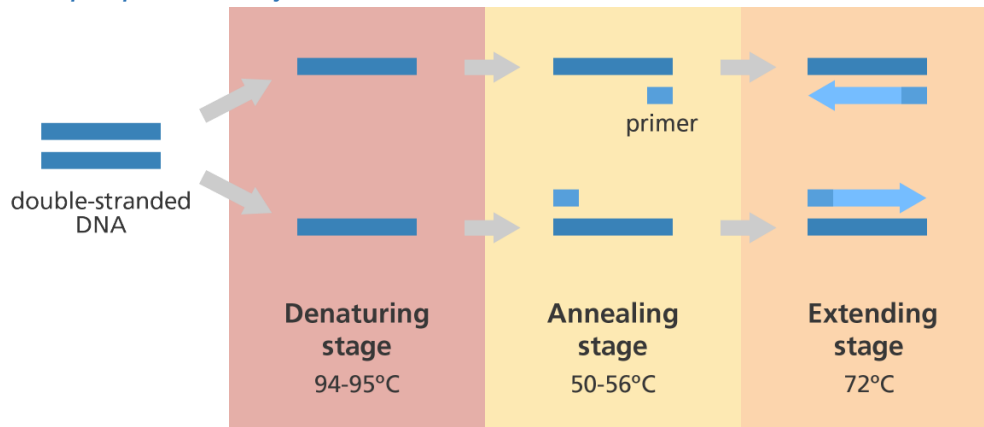
Illustrér gjerne med en tegning.

Fase A: Denaturering. Hydrogenbindingene mellom trådene i dobbeltrådig DNA brytes ved oppvarming til (ca) 92-95 °C. Dobbelttrådig templat (og f.o.m syklus #2 også PCR-produkter) skiller lag til to enkeltråder. Tar ca 15-30 sekunder, men ofte settes tiden en del over det for å være helt sikker på at alt dsDNA er blitt ssDNA.

Fase B: Hybridisering eller annealing. Primere binder seg til sine komplementære sekvenser på ssDNA vha nye hydrogenbindinger. Eksakt temperatur er avhengig av primernes smeltetemperatur (som igjen er avhengig av forholdet mellom innhold av A/T og G/C). Typisk temperatur 50-65°C.

Fase C: Elongering, extension eller polymerisering. Skjer ved 72°C. Polymerasen kobler seg på dsDNA (primer + templat) og legger til nukleotider i 5'-3' retning komplementært til baser på templatet (til polymerasen blir «sliten» de to første syklusene eller til den har kommet til endes på templatet).

Eksempel på illustrasjon:



- c) Du ønsker å klonere PCR-produktet ditt, men før du kommer så langt må du undersøke at du har riktig PCR-produkt. Dette gjør du ved å kjøre en agarose-gelelektroforese. Til din store sorg ser du ingen tydelige bånd på gelen (annet enn størrelsesmarkøren). Hva kan ha gått galt? Utdyp.

Studenten må kunne trekke inn teorikunnskap for å vurdere hva som kan ha gått galt. Bør kunne komme med mer enn et forslag. Eksempler på årsaker til manglende bånd: Glemt å tilsette et reagens eller templat, tilsatt feil reagens (eks gale primere, to forward eller to reverse etc etc), ikke klart å applisere PCR-produkt til brønn, stukket gjennom gelen, gal konsentrasjon av fargestoff etc etc etc. Det teller positivt om studenten klarer å avfeie noen muligheter ut fra benyttede kontroller.

Oppgave 4

- a) Hva slags molekyler er GTPaser? Tegn og forklar hvordan GTPaser er regulert. Gi minst et eksempel på en GTPase.

GTPaser er en stor familie av hydrolytiske enzymer som kan binde og spalte guanosin nukleotider. GTPaser spiller en viktig rolle i signaloverføringen i cellene. GTPaser kan slås «av» eller «på» ved at de binder seg til GTP (aktiv form) eller GDP (inaktiv form).

To viktige regulatoriske proteiner som regulerer aktiviteten til GTPasene er:

- GEF (Guanosin Nukleotid Exchange factor)
- GAP (GTPase-Aktiverende Protein)

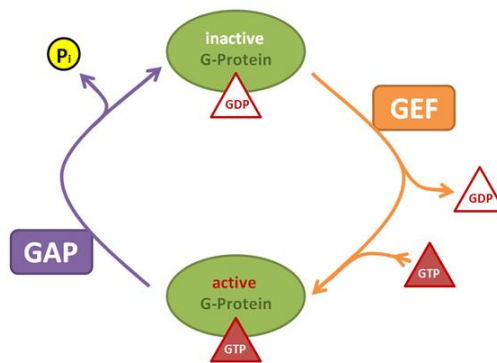
GEF påvirker GTPasen til å bytte ut GDP og erstatte med ny GTP. Binding av ny GTP fører til aktivering av GTPasen som da kan overføre signalet videre.

For å inaktivere GTPasen trenger vi regulatorisk proteinet GAP.

GAP påvirker den hydrolytiske evnen til GTPasen og hydrolyserer GTP til GDP. GTPase bundet til GDP vil være i inaktiv form og signaloverføringen opphører.

Eksempel på GTPase er RAS (monomerisk GTPase), G-protein (heterotrimerisk GTPase), ++

Studentene kan tegne ulike varianter av tegningen.



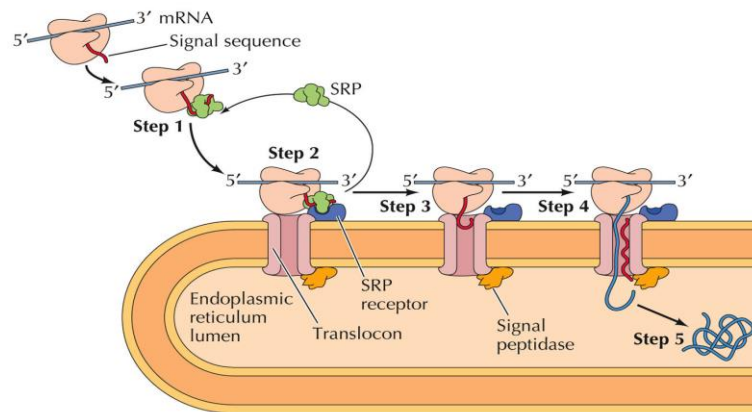
- b) Beskriv hvordan proteiner transporteres til ER. Beskrivelsen skal inneholde forklaring av begrepet co-translasjon.

Proteiner som transpores til endoplasmatisk retikulum (ER) har en aminosyresekvens, kalt signal-sekvens (ca.20 aminosyrer), som typisk er lokalisert ved N-terminalen av polypeptidkjeden.

Signal-sekvensen blir gjenkjent og bundet av signal recognition particle (SRP) som binder både ribosomet og signal-sekvensen og stopper translasjonen. Komplekset føres til ER.

SRP binder til en SRP-reseptor på membranen til ER. Ribosomet festes til en translokator (trans-membrankompleks med et hulrom i midten). SRP og SRP-reseptor dissosieres og signal sekvensen føres inn gjennom translokatoren. Proteinets syntetiseres og føres rett inn i ER lumen såkalt «co-translasjon». Signal-sekvensen klippes av og proteinet frigjøres i ER lumen.

Tegningen er ikke et krav.



c) Hva slags farlige egenskaper kan en kreftcelle tilegne seg?

- *Opprettholde proliferasjonssignaler*
- *Unngå hemming av cellevekst*
- *Indusere inflammasjon*
- *Evne til å invadere og metastasere*
- *Uendelig celledeling*
- *Genom instabilitet*
- *Stimulere angiogenese*
- *Resistent mot apoptose*
- *Reprogrammere energi metabolismen*
- *Unngå immunforsvaret*