

Løsningsforslag eksamen

Emne 74618 Cellebiologi I,
torsdag 25 mai 2000-05-28

OPPGAVE 1

- a) De tre hovedmåtene for transport av proteiner i cellene er:
porttransport, vesikkeltransport og "gated" transport

Porttransport: Proteiner som skal inn i cellekjernen syntetiseres i cytosol og fraktes inn til kjernen. Disse proteinene har en signalsekvens/mønster (signal patch) som gjenkjennes av proteiner i cytosol (medlemmer av hsp familien). Signal - patch gjenkjennes bare hvis proteinet er korrekt foldet. Proteinets transporteres gjennom kjerneporekomplekset i foldet tilstand ved en energi (ATP) krevende prosess. Signal patch spaltes ikke av etter at proteinet er kommet inn i cellekjernen. Dette er en fordel fordi slike proteiner kan gjenopptas i cellekjernen etter at kjernekonvolutter er blitt gjendannet (Telofasen) i celledelingen. Kjerneproteinene gjenopptas i kjernen etter at kjernekonvolutter/ kjerneporekompleksene er blitt dannet i dattercellene.

Gated transport: De fleste mitokondrielle proteiner syntetiseres i cytosol, og har minst ett signalpeptid som gjenkjennes av proteiner i cytosol (av hsp familien), og dirigeres til proteinkanaler i den mitokondrielle membranen. Hvis proteinet har bare ett signalpeptid havner proteinet inn i matrixrommet i mitokondriet. Proteinets folder seg ut ved transport gjennom denne proteinkanalen, prosessen krever ATP og involverer hsp70 både på cytosolsiden og matrixsiden, proteinet trekkes inn i mitokondriet ved at hsp70 inne i matrix bindes, mens hsp70 på cytosolsiden frigis. Etter at proteinet er inne i matrixrommet spaltes signalpeptidet av, og proteiner folderes. Multiple signalpeptider kreves for at proteinet skal dirigeres til den indre eller ytre mitokondriemembranen, eller til intermembranrommet.

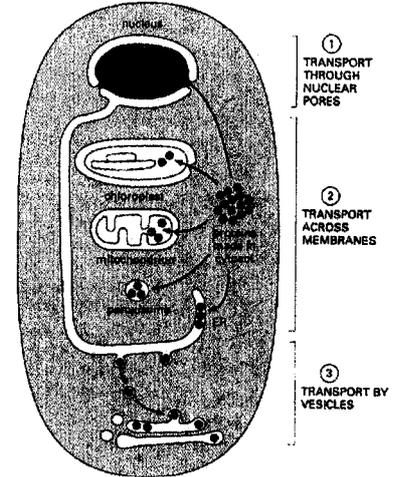
Vesikkeltransport: Proteiner som skal til andre organeller i celler eller skilles ut fra cellen transporteres i vesikler. Syntesen starter på ribosomer i cytosol. De første aminosyrene i polypeptidene gjenkjennes av Signal Recognition Particle (SRP) som dirigerer ribosomet med det påbegynte proteinet til ru endoplasmatiske retikulum (ER). Syntesen foregår ved at det polypeptidkjeden transporteres over ER membranen samtidig med translasjonen. Proteinene transporteres fra ER til Golgi i vesikler. Hvis proteinet ikke inneholder flere signalsekvenser transporteres det i vesikler fra Golgi til celleoverflata hvor det skilles ut uten regulering. Signalsekvenser dirigerer proteinene til Golgi, ER eller vesikler, eller viser at proteinen skal skilles ut ved regulert exocytose.

- b) Exocytose foregår ved sammensmelting av vesikler med plasmamembranen. Innholdet i vesiklene blir frigjort ekstracellulært. Spesialiserte proteiner på vesikkelmembranen, v-SNARE, som er et kjennetegn på hvilken type 'last' vesikkelen inneholder, kjennes igjen av molekyler av t-SNARE typen på plasmamembranen. Disse type molekyler sørger for spesifisitet i bindingen av exocytotiske vesikler med plasmamembranen. Sammensmeltingen med plasmamembranen er en energikrevende prosess katalysert av fusjonsproteiner.

Exocytose av proteiner deles inn i to typer: konstitutiv og regulert.

Konstitutiv exocytose er konstant utsendelse av proteiner uavhengig av eksterne stimuli. Eksempel på dette er celler som skiller ut slim til de ulike slimhinnene i kroppen.

Regulert exocytose foregår som følge av eksterne stimuli. Eksempler på dette er nerveceller eller hormonproduserende celler. Ved regulert exocytose aktiveres sammensmelting av exocytotiske vesikler som på forhånd er fylt opp med proteiner / signalpeptider som skal sendes ut ved stimuli. Disse er lokalisert nær plasmamembranen å ligger klare til å smelte sammen med denne for deretter kunne frigjøre innholdet sitt raskt ved mottak av signal. Reseptorer i plasmamembranen mottar og viderefremidler signaler om sekresjon, via Ca^{2+} eller andre budbæreremolekyl.



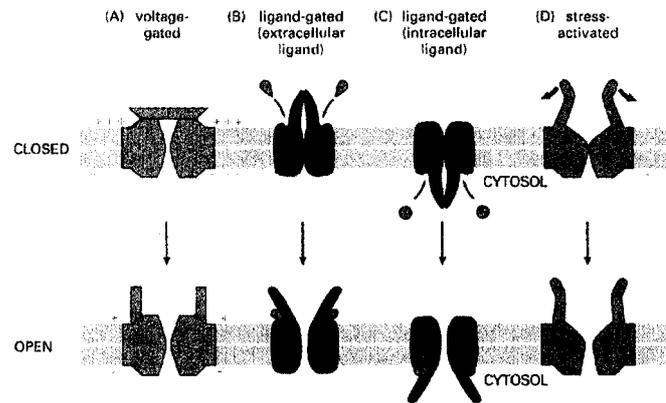
c) De tre typer ionekanaler i plasmamembranen er: **ligand-kontrollerte, spenningskontrollerte og mekanisk strekk-kontrollerte.**

Ligand-kontrollerte ionekanaler: åpnes/lukkes ved at en ligand (f.eks. et hormon, neurotransmitter) bindes til bindingssted på ionekanalen (reseptor funksjon). Slike type ionekanaler finnes på nerveceller, epitelceller i nyrer.

Spenningskontrollerte ionekanaler: Åpnes/lukkes når membranpotensialet over plasmamembranen endres. Finnes på nerveceller, muskelceller

Mekanisk stress kontrollerte:

Finnes på hårceller i indre øret, muskelceller. Åpnes/lukkes når plasmamembranen utsettes for mekanisk stress



Mekanismer for ionekanaltransport.

Antar at proteinene som danner slike ionekanaler har en aminosyrekjede på cytoplasmatisk side som foldes som en ball og passer inn i kanalen. Når kanalen aktiveres ved en av de tre ovenfor nevnte kontrollmekanismer, antas det at proteinene som danner ionekanalene endrer konformasjon slik at 'ballen' fjernes fra kanalen som derved åpnes, eller plasseres i kanalen som derved lukkes.

Ioner diffunderer passivt gjennom ionekanalene med sin elektrokjemiske gradient, dvs med sin gradient i konsentrasjon og elektrisk potensialendring (som avhenger av konsentrasjonen av ioner ekstracellulært og intracellulært). Ionefluksen avhenger dermed av:

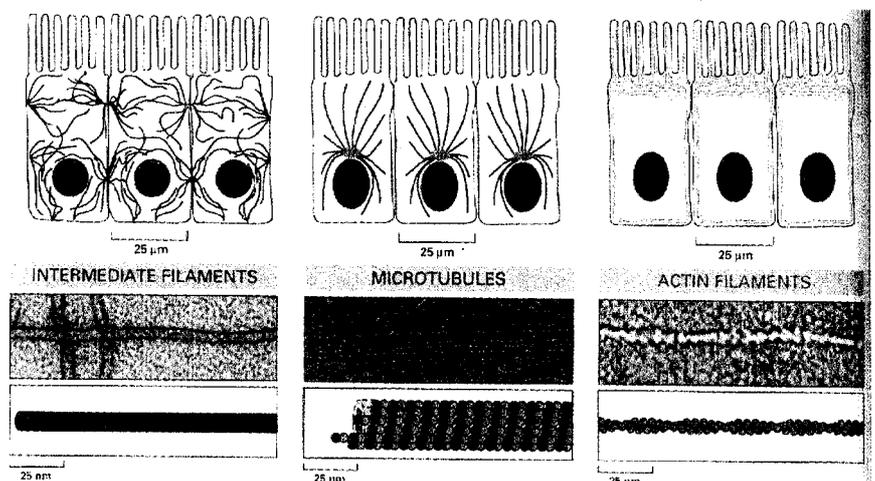
- elektrokjemisk gradient
- permeabilitet k som blant annet avhenger av antall ionekanaler i membranen.

Diameteren av ionekanalene og ladning og polariteten av proteinene som danner kanalen bestemmer hvilke type ioner som kan passere

OPPGAVE 2

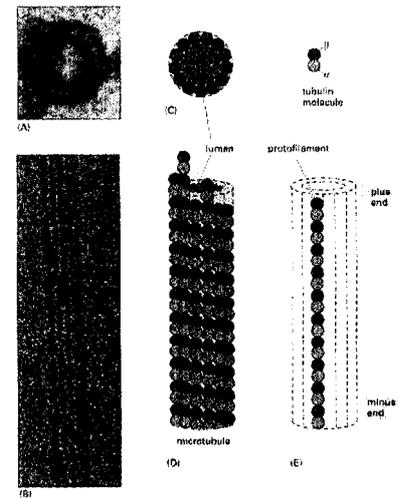
a) De tre hovedtypene av filamenter i cellenes cytoskjelett er : mikrotubuli, mikrofilamenter, og intermediære filamenter. Alle tre er satt sammen av flere enheter (monomerer).

Mikrotubuli Mikrotubuli er uforgrenede sylindere med en diameter på ca 25 nm med en sentral åpen kanal, bygd opp av tubulin enheter. To monomere, α - og β -tubulin, danner til sammen en heterodimer. Mikrotubuli er bygd opp av slike heterodimerer (se skisse). En rekke av heterodimerer parallelt med lengdeaksen kalles et protofilament, og en mikrotubulus består av 13 slike protofilamenter. I enkelte strukturer i cellene finnes dubletter eller tripletter av mikrotubuli, se skisse. Dubletter finnes i flimmerhår og flageller, mens

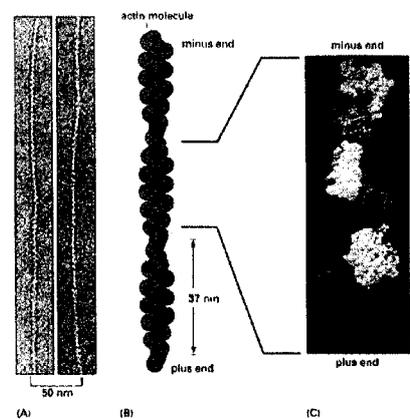


tripleter finnes i centriolene, strukturen hvor spindelapparatet starter under celledelingen, og i "basal bodies", strukturen hvor mikrotubuli i flagellene vokser fra.

Heterodimerene som fester seg på en voksende mikrotubulus er GTP bundne. Etter en stund hydrolyseres GTP til GDP og P, noe som fører til at de ikke lenger er like sterkt bundet. Dette gjør at mikrotubuli er dynamisk ustabile. Hvis de mister hetten av GTP-bundet heterodimer, vil hele strukturen dissosiere raskt. Spesielle mikrotubulus assosierte proteiner kan stabilisere, mikrotubuli. Vekst av mikrotubuli foregår mye raskere på den ene enden (+ enden) enn på den andre (- enden).



Mikrofilamenter Mikrofilamenter er tynne, tette fibre med en diameter på 7 - 9 nm i diameter. Monomeren i mikrofilamentene er aktin (disse filamentene kalles ofte **aktinfilamenter**). Aktin er et globulært protein med bindingssteder for ATP, myosin, og andre aktinbindende molekyler. To kjeder av aktinmonomere tvinnes rundt hverandre og danner en dobbel heliks. For at aktinmonomere kan bare bindes til den voksende kjeden hvis de har Mg²⁺ og ATP bundet. ATP hydrolyseres en stund etter at monomeren er blitt bundet til det voksende filamentet. De ATP-bundne enhetene stabiliserer mikrofilamentene. Som mikrotubuli har mikrofilamenter en plus ende og en minus ende, karakterisert ved en mye raskere polymerisering på plus enden enn minus enden. Disse strukturene er polare. Forskjellige aktin-bindende proteiner bidrar til stabilisering av mikrofilamentene.



Intermediære filamenter

- familie av relaterte proteiner som varierer med celletype, med et felles sentralt område med α -heliks struktur (ca 300 aminosyrer). Globulære domener på hver side av det sentrale området, varierer.
- to slike polypeptidkjeder tvinnes rundt hverandre, parallelt, se skisse.
- to slike dimerer legges antiparallelt, to lange rekker av slike tetramerer danner et protofilament.
- fire slike protofilament danner et intermediært filament, tett pakket, ikke lost som pi figuren. Totalt 32 polypeptidkjeder i et tverrsnitt.

(Kommentar: I figuren i boka (12-5, Wolfe) ser det ut som om det er 16 polypeptidkjeder i tverrsnittet, mens det av teksten går frem at et protofilament sannsynligvis består av to kjeder av tetramerer => gir oktamerer => 32 i tverrsnitt.)

- varierende diameter, ligger rundt 10 nm
- danner mer uregelmessige mønster i cytosol enn det mikrotubuli og mikrofilamenter gjør (går på kryss og tvers, ikke langs rette linjer)

b) Alle filamenttypene bidrar til å gi cellen mekanisk styrke og til å opprettholde cellenes form.

Intermediære filament

- det viktigste bidraget til cellens mekaniske styrke.
- laminin tilhører intermediært filament familien, danner et rutelignende nettverk på innsiden av kjernens dobbeltmembran, er med og opprettholder cellekjernens fasong.
- Intermediært filament er festet til desmosomer som danner celle-celle kontaktpunkter, og til hemidesmosomer som forankrer celler til ekstracellulær matrix.

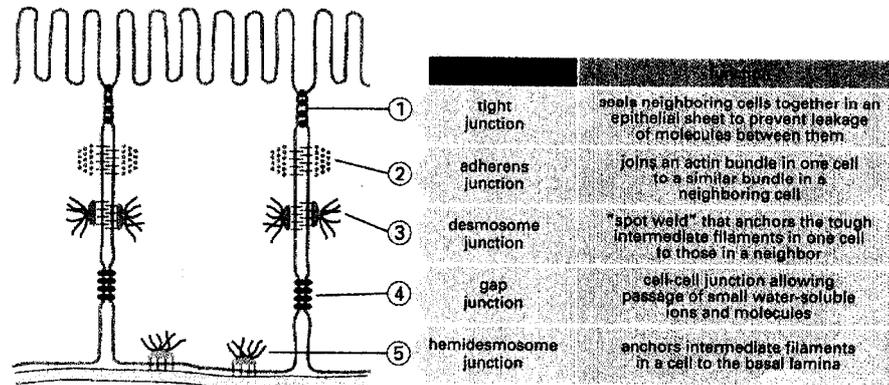
Mikrotubuli

- Involvert i bevegelse av organeller og vesikler, fungerer som veier for transport. Mikrotubulus-assosierte motorproteiner bundet til vesikler eller organeller beveger seg langs mikrotubuli, derfor er mikrotubuli viktige for organisering av cytoplasma.
- Mikrotubuli danner det mitotiske spindelapparatet som trekker de to kromatin-trådene til hver sin spindelpol under mitose.
- Mikrotubuli i cilia og flageller er ansvarlige for bevegelsen av disse.

Mikrofilament

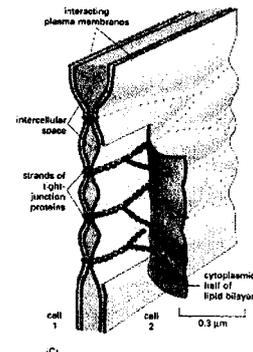
- Er involvert i cellebevegelse, både i celletyper som har amøbe-lignende bevegelser, eks. makrofager og fibroblaster, og i muskelceller som kontraherer.
- Ansvarlig for cytokinesen. En kontraktil ring dannes av mikrofilamenter og aktinbindende proteiner, sammensnøring av plasmamembranen => deling av cytoplasma.
- Er med på å bygge opp mikrovilli, spesialiserte utvekster på celleoverflaten. Under plasmamembranen i mikrovilli finnes bunter av mikrofilamenter holdt sammen av aktin- bindende proteiner.
- Mikrofilamenter er festet til adherens junctions som danner celle-celle kontaktpunkt.

b) Følgende junctions mellom naboceller finnes:



Tight junction

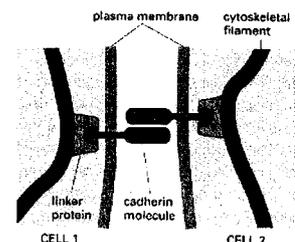
Sammensmelting mellom plasmamembranproteiner på to naboceller. Opptre ofte i serie, dvs sammensmelting mellom en rekke plasmamembran proteiner slik at transmembrane proteiner i et domene av plasmamembranen ikke fritt kan diffundere til andre deler



Adherens junction

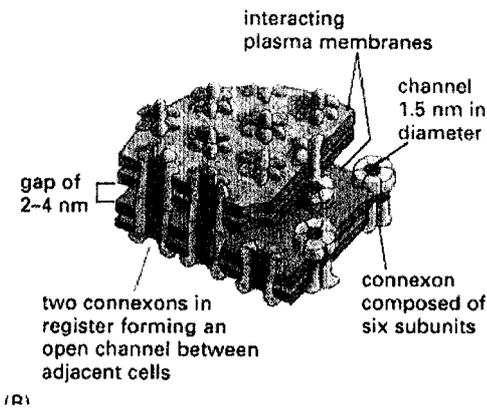
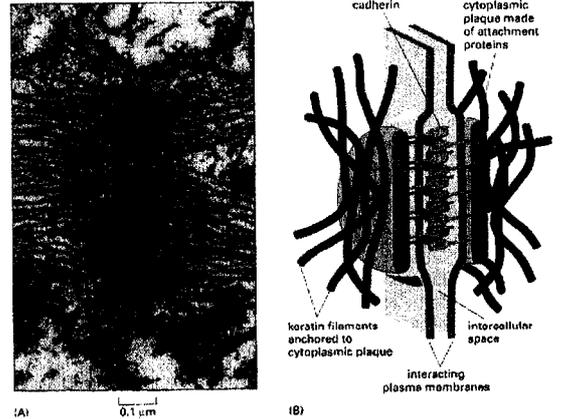
Danner forbindelsespunkt mellom aktinfilamen i en celle med aktinfilament i naboceller, og på den måten gir mekanisk forbindelse mellom cytoskjelett-komponenter.

Aktinfilament blir forbundet via et aktinbindende protein til transmembrane cadherin. Den extracellulære delen av cadherin assosierer (Ca²⁺ avhengig) med cadherin fra nabocellene.



Desmosomer

Intermediære filament bindes til proteiner som danner en såkalt plaque rett under plasmamembranen. Transmembran proteiner ofte sakalte cadheriner er bundet til proteiner i plaquet og til cadheriner på nabocellen. Cadheriner på nabocellen er igjen bundet til protein i plaquet rett under plasmamembranen som igjen er bundet til intermediært filament.



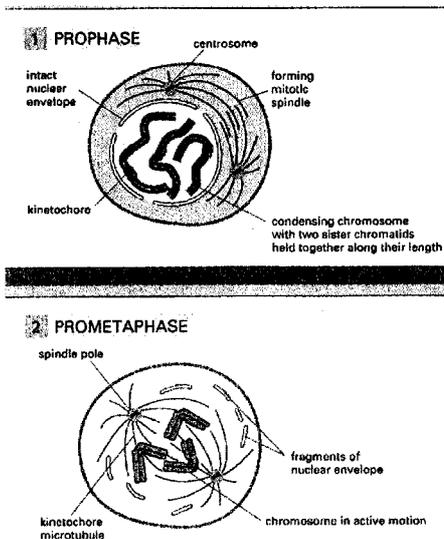
Tight junctions

Protein kanal mellom to celler, slik at cytoplasms i naboceller er i direkte kontakt.

Proteinkanalen består av 4-6 proteiner som danner en såkalt connexon. Connexon i to naboceller er plassert slik at de danner en kanal mellom cellene.

OPPGAVE 3.

a) Cellene gjennomgår fasene Profase – prometafase – metafase – anafase – telofase – cytokinese ved celledelingen. De sentrale hendelser i disse fasene er:

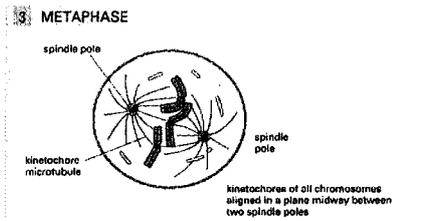


Profase:

- overgang fra G2 til M
- Kromatin kondenserer til en mer kompakt struktur
- Mikrotubuli reorganiseres ved at de depolymeriseres og danner det mitotiske spindelapparatet. Det mitotiske spindelapparatet består av mikrotubuli organisert ut fra to poler, centrosomer, utenfor kjernen.

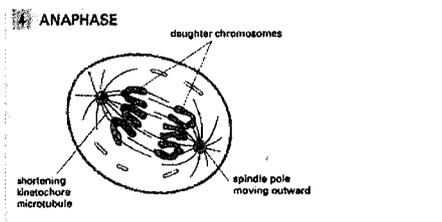
Prometafase:

- Kjernekonvolutten destabiliseres (ved fosforylering av laminin) og går over til en vesikkelform
- Spindelen går inn i området hvor kromosomene befinner seg
- Kromosomene assosierer med spindelen ved kinetochore som fester seg til centromeren på kromosomene
- Kromosomene blir aktivt beveget ved hjelp av spindelapparatet



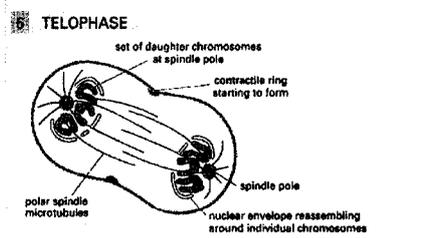
Metafase:

- Kromosomene blir opplinjert i ekvatorplanet til spindelen, og midt mellom spindelpolene
- Hver kromosompar er forbundet med ett kromosom til hver spindelpol



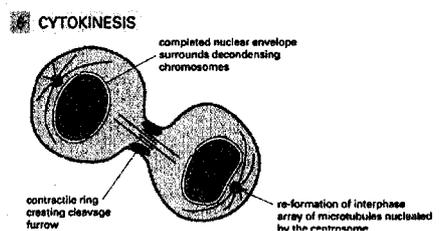
Anafase:

- Parene av kromatidene blir synkront trukket mot spindelpolene av mikrotubuli bundet via kinetochore to kromatidene, og spindelpolene blir separert fra hverandre.



Telofase:

- De to settene av datter kromatider kommer fram til spindelpolene
- Mikrotubuli forankret til kinetochore kromatider depolymeriseres
- Kjernekonvoluttene begynner å gjendannes rundt hvert sett av datterkromatider (straks kjernemembranen igjen er inntakt, kan transport av kjerneproteiner, spesielt for replikasjon, transkripsjon, gjenopptas)
- Kromatidene dekondenserer
- Deling av cytoplasma starter (dannelse av den kontraktile ring)



Cytokinese

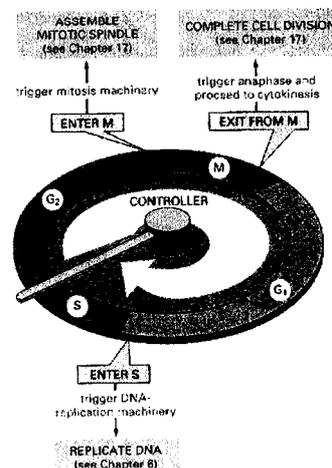
- Cytoplasma deler seg. En kontraktile ring (aktin + myosin) avsnører plasmamembranen, og danner to datterceller, med en kjerne i hver.

b) De fire hovedfasene av celledelingen og hovedtrekk av hva som skjer der er:

- | | |
|---------|---|
| G1-fase | Gap-1 fase: Transkripsjon og translasjon |
| S-fase | Syntese-fase: DNA replikasjon, Transkripsjon og translasjon |
| G2-fase | Gap-2 fase: Transkripsjon og translasjon |
| M-fase | Celledeling som detaljert under delspørsmål 3a) |

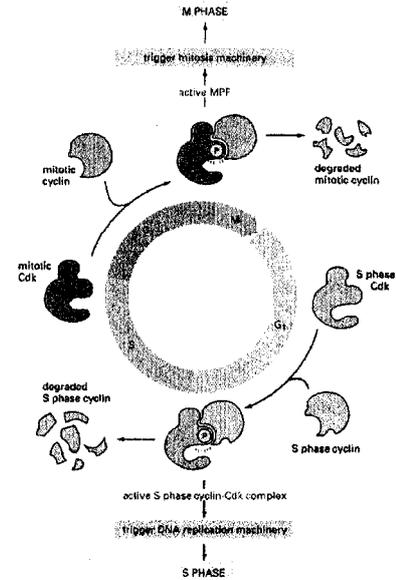
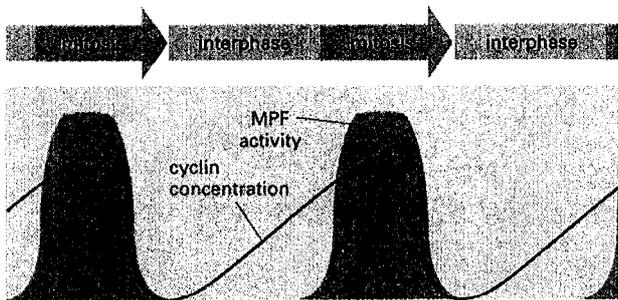
Det finnes tre kontrollpunkter i cellyklus:

- sein G1 (også kalt restriksjonspunkt), undersøker om cellen er stor nok til å fullføre cellyklus, og om miljøet som omgir cellen er gunstig.
- inngangen til mitose, tester om alt DNA er replikert, om cellen er stor nok (skal være ca fordoblet i forhold til starten av G1) til å gå inn i mitose, og om miljøet er gunstig.
- utgangen av mitose, i metafase, tester om alle kromosomene ligger i ekvatorplanet midt mellom spindelpolene for kromatidridene kan trekkes til hver sin spindelpol.

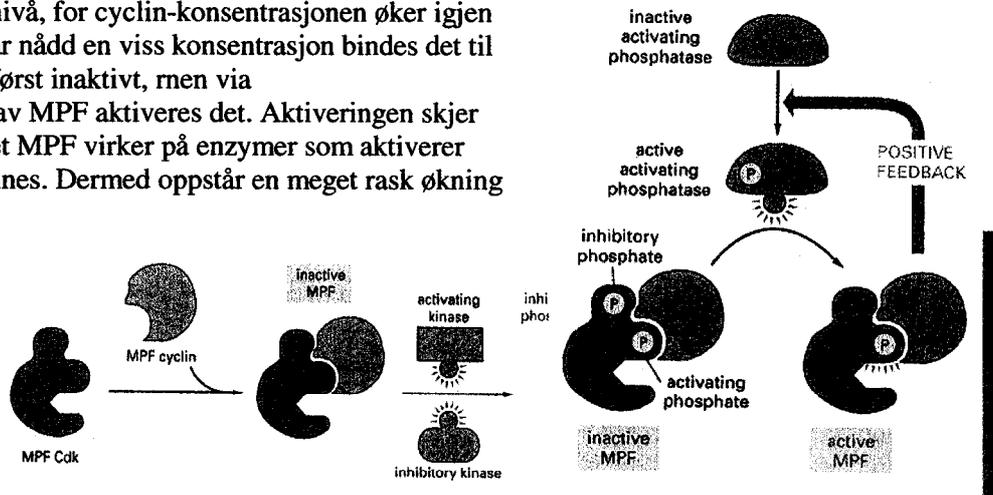


Sjekkpunktene utgjøres av de to familiene av proteiner kalt cycliner og cyclin-avhengige kinaser (cdk). Det finnes to hovedklasser av cycliner, mitotiske cycliner som bindes til cdk i løpet av G2 og som er nødvendige for at cellen skal gå inn i mitose, og G1 cycliner som bindes til cdk i løpet av G1 og som er nødvendige for at cellen skal gå inn i S-fase.

Sjekkpunktet inn i mitose er best kjent. Komplekset av mitotisk cyclin og tilhørende cdk danner et kompleks kalt mitotisk-promoting-faktor (MPF). Konsentrasjonen av MPF varierer gjennom celledyklusen, konsentrasjonen av cyclin øker jevnt utover interfase og begynnelsen av mitose, som vist på figuren nedenfor.



Ved overgangen metafase-anafase i mitose ødelegges cyclin plutselig, konsentrasjonen faller til bunnivå, for cyclin-konsentrasjonen øker igjen i neste interfase. Når cyclin har nådd en viss konsentrasjon bindes det til cdk og MPF dannes. MPF er først inaktivt, men via fosforylering/defosforylering av MPF aktiveres det. Aktiveringen skjer ved positiv tilbakekopling i det MPF virker på enzymer som aktiverer det slik at mer aktivt MPF dannes. Dermed oppstår en meget rask økning av aktiviteten av MPF som vist i figuren.



Den nøyaktige mekanismen for degradering av cyclin ved overgangen metafase-anafase er ikke kjent, men cyclin har en aminosyresekvens, men en regner med at selve aktivering trigger en rekke hendelser som fører til en forsinket inaktivering (i forhold til aktivering) ved proteolyse. Ved degraderingen av cyclin inaktiveres MPF og cellen kan fullføre og gå ut av mitose.

Sjekkpunktet ved metafase-anafase overgangen sikrer at cellene ikke går inn i anafase før metafase er fullført, dvs alle kromosomene skal befinne seg i planet midt mellom spindelpolene for kromatidtrådene trekkes til hver sin spindelpol.

Funksjonen til MPF er via fosforylering å drive cellen inn i mitose. MPF induserer kondensering av kromosomene, nedbrytingen av kjeme-konvolutter, og organiseringen av det mitotiske spindelapparatet. MPF kan virke direkte eller indirekte via en kaskade av fosforyleringer der MPF fosforylerer andre kinaser som så aktiveres og aktiverer

nye kinaser osv, og tilslutt inntreffer den cellulære responsen. To eksempler der MPF fosforylerer proteiner direkte er fosforylering av lamin på innsiden av kjemekonvolutten som trigger nedbrytingen av kjemekonvolutten og fosforylering av histon HI som antas å være involvert i kondenseringen av kromosomene.

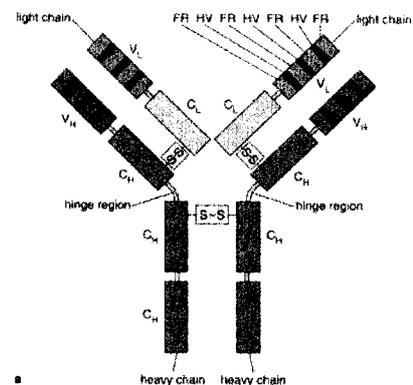
Mekanismen for sjekkpunktet i sein GI fase er dårligere kjent, men prinsippet er antatt å være det samme som ved mitose-sjekkpunktet. Komplekset av GI cyclin og cdk gjør cellen i stand til A passere restriksjonspunktet slik at cellen gir inn i S-fase.

G0 tilstand er en modifisert G1 tilstand hvor cellesykluskontrollapparatet er nedbygd, og cellene fungerer uten videre celledeling.

OPPGAVE 4

a) Strukturen av et immunoglobulin

Et immunoglobulin består av to lette kjeder (k) to tunge kjeder, a,g,d,e eller m, holdt sammen av disulfidbindinger. Et immunoglobulin består av ett par k-kjeder, og ett-par l-kjeder (like, ikke heteropar). De to lette kjedene består av et konstant domene, og et variabelt domene. De tunge kjedene består av et variabelt domene, og 3 konstante domener. De variable domene deles videre inn i 3 hypervariable aminosyresekvenser og 4 framework sekvenser med liten variasjon i aminosyresekvensen. Det variable domenet er foldet slik at de hypervariable domene danner en kløft på enden av Y-armen av immunoglobulinet. Denne kløften er bindingsstedet for antigenet.



b) Aktivering av B-celler.

B-celler gjenkjenner fremmed antigen som bindes til et immunoglobulin på B-celle overflaten. Antigen/antistoff komplekset tas inn i cella ved endocytose. I endocytotiske vesikler brytes antigenet ned i fragmenter av proteolytiske enzymer. Vesikler med nysyntetiserte MHC klasse II molekyl (syntetisert i ER, modifisert gjennom Golgi apparatet, og sortert i trans Golgi nettverk til endocytotisk vesikkel) smelter sammen med de endocytotiske vesiklerne. Antigen fragmenter bindes til MHC klasse II molekyl og transporteres til celleoverflaten i vesikkelen.

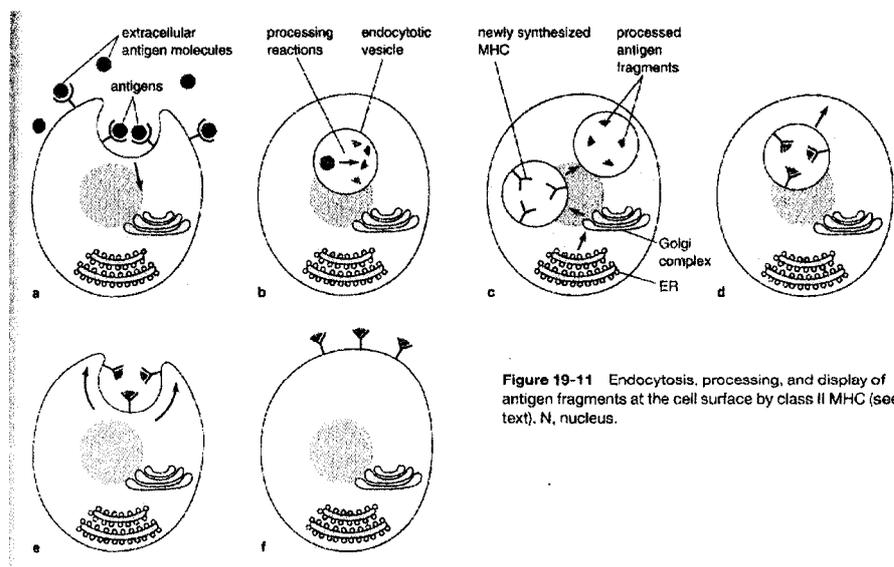


Figure 19-11 Endocytosis, processing, and display of antigen fragments at the cell surface by class II MHC (see text). N, nucleus.

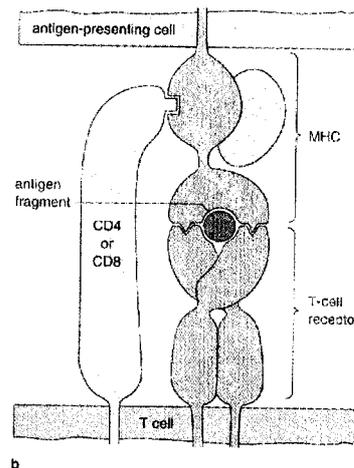
Vesikkelen smelter sammen med plasmamembranen slik at MHC klasse II molekyl med bundet antigen fragmenter befinner seg på celleoverflaten

Aktivering av B-celler krever aktiverte T_{helper} celler. T_{helper} celler aktiveres ved at T celledreseptorer bindes til MHC klasse II molekyl på overflaten av B-celler (makrofag ved primær immunrespons, B-celler ved sekundær immunrespons). MHC klasse II molekylet må ha antigen/fremmede protein fragmenter bundet til seg, for at T_{helper} celledreseptor skal bindes. Denne bindingen er sval, og stabiliseres ved at antigenet CD4 på overflaten av T_{helper} celledreseptor bindes

til MHC klasse II molekylet. (Aktivering av T_{helper} celle krever også et annet signal: enten ved interleukin (IL-1) som skilles ut av antipresenterende celler, eller ved binding mellom B7 på overflaten av antipresenterende celle og CD28 på T_{helper} celle. Kravet om dette andre signal står ikke beskrevet i Wolfe, men er omtalt i forelesningen i 74618, og beskrivende figur er utdelt i forelesningene).

Aktiverte T_{helper} celler skiller ut vekstfaktorer, såkalte interleukiner. Interleukinene virker på B cellene slik at de aktiveres, dvs, deler seg og modnes til plasmaceller som produserer antistoffer mot det samme antigenet som genererte immunresponsen.

Antistoffene sirkulerer i blodbanen. Når de møter bakterier med antigen som genererte immunresponsen vil bakteriene angripes ved en av følgende mekanismer:

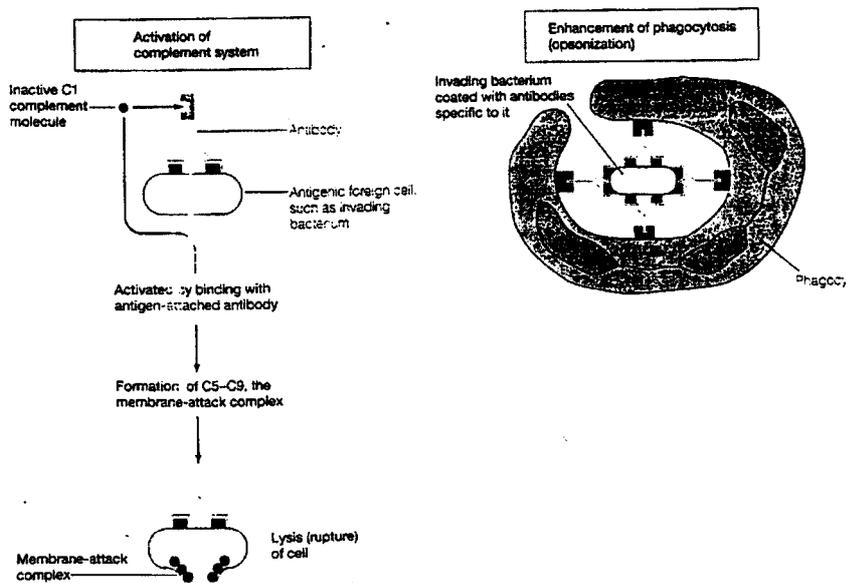


Aktivering av komplement systemet:

Antistoffet bindes til antigen på overflaten av bakterien. Proteinet C1 i komplementkaskaden bindes til F_C delen av antistoffet. Dette initierer komplementkaskaden der sluttproduktet er dannelse av en transmembran proteinkanal (membrane - attack - complex). Protein-kanalen dannes ved at proteinet C9 polymeriseres av C8 slik at en proteinkanal dannes. Dermed vil vann strømme inn i cellen på grunn av osmose, og cellen sprekker (lyser).

Aktivering med antistoff-mediert fagocytose:

Antistoffet bindes til antigenet på overflaten av bakterien. Fc delen av immunoglobulinet bindes til Fc reseptoren på overflaten av fagocytterende celler. Dermed trigges fagocytosen, og bakterien 'spises opp'.



OPPGAVE 5

a) Plasmamembranens fluiditet avhenger av:

kolesterol
glykolipider
integral proteiner

b) Fosfatidylserin er det eneste av de viktigste plasmamembranlipidene som er negativt ladet, og:
finnes i begge lipidmonolagene
finnes kun i lipidmonolaget mot ekstracellulært område
finnes kun i lipidmonolaget som vender mot cytosol.

- c) Fluidegenskapene til membranen bestemmer:
transport av et molekyl over membranen
bevegelsen av integral proteiner
osmose
- d) Vev tåler og utsettes for trykk-krefter på grunn av:
aktin
collagen
glycosaminoglycaner
- e) Organellen som trolig stammer fra en annen organisme er:
lysosomer
Golgi-apparatet
mitokondria
- f) Hovedfunksjonen til Golgi-apparatet er:
Syntetisere proteiner
Modifisere proteiner
Resirkulere proteiner
- g) Proteiner ansvarlig for kontakt mellom celle og ekstracellulær matrix er:
cadheriner
selektiner
integriner
- h) Glukose kan passere plasmamembranen ved:
Passiv diffusjon
Fasilitert diffusjon
H⁺-pumpe
- i) Prosessering av primær RNA-transkript til mRNA for translasjon skjer ved hjelp av:
SNARE's
snRNA's
snRNP's
- j) RNA syntetiseres gjennom celledyklus i:
hele interfasen
S-fasen
G1-fasen
- k) Hovedfunksjonen til mitokondria er:
bryte ned makromolekyler
syntetisere proteiner
syntetisere ATP
- l) Hovedfunksjonen til lysosomer er:
bryte ned makromolekyler
syntetisere proteiner
syntetisere ATP
- m) Proteinfilamentnettverket på innsiden av kjernemembranen består av:
intermediære filament
aktin filament
mikrotubuli