

Oefeningenexamen

Geïntegreerd Practicum Fysiologie-Biochemie:

31 maart 2021

Los de opgaven op met behulp van een rekenblad (Excel, Google spreadsheet, LibreOffice Calc) of R. Je kan je oplossing doormailen tot 31 maart om 19u00.

Een volledige oplossing bevat:

- ... het bestand met je dataverwerking: om je examen te kunnen verbeteren, zijn ook de gebruikte formules nodig. Ben je niet zeker hoe je bestand door de uploadprocedure zal geraken (“maar ik had die figuur er écht wel bij staan...”), voeg dan ook een .pdf-bestand toe. In een .pdf-bestand worden geen formules weergegeven, dus een bewerkbaar bestand met je oplossing is essentieel.
- ... een beschrijving van je aanpak (tekst, formules, voorbeeldberekeningen, schema’s) en een kort besluit (1 zin kan volstaan). Handgeschreven en ingescand mág maar wat niet leesbaar is, wordt niet verbeterd.
- om alle bestanden samen te houden, begin je elke bestandsnaam met een kernwoord (mag je zelf kiezen) uit de opgave en vermeld je daarna ook je familienaam. Bijvoorbeeld: `citraatsynthase_Michiels.tex`.

Vermeld in ieder document je naam en gebruik eenduidige benamingen voor kolommen, gegevens en berekende grootheden.

Tabel 1: Standaardreeks eiwitbepaling. (formule voor a in de ijklijn $y = ax$: $a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$)

μL standaardoplossing	A_{595}
0	0.071
10	0.199
20	0.291
40	0.544
60	0.626
80	0.866

Tabel 2: Eiwitbepaling konijnennierenextract.

μL extract	A_{595}
20	0,064
40	0,117
60	0,173

- Op 1 g nierweefsel van een konijn wordt een eiwitextractie gedaan. Dit levert 4 mL extract op.

(a) (3 points) Hierop wordt een eiwitbepaling uitgevoerd.

- Van een standaardoplossing met 1 mg/ml eiwit werden welbepaalde volumes (zie tabel 1) telkens aangelengd tot 1 mL met gedestilleerd water.
- Vervolgens werd 3 mL reagens A toegevoegd en bleven de stalen 1 uur incuberen.
- Vóór het meten van de absorptie werd nog 200 μL kleurreagens toegevoegd.
- Van elk staal wordt de absorptie bij 595 nm gemeten. De meetresultaten staan in tabel 1.
- Een deel van het extract wordt 2x verdund en daarna op dezelfde manier behandeld als de standaardoplossing. De gebruikte hoeveelheden en gemeten absorpties worden weergegeven in tabel 2.

Bereken het eiwitgehalte van het extract.

- (b) (3 points) Diacylglycerol-acyltransferase (DGAT) is een enzyme dat aan coenzyme A gebonden vetzuren bindt aan diacylglycerol en zo de synthese verzorgt van triacylglycerol. De activiteit van het enzyme wordt gemeten via radioactieve tracers (^{14}C -gelabeld oleoyl-CoA wordt gekoppeld aan 1,2-diacylglycerol tot ^{14}C -trioleoylglycerol). Hiervoor mengen we 35 μL ^{14}C -oleoyl-CoA, (50 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$, 56 mCi/mmol) met een overmaat aan 1,2-dioleoylglycerol (opgelost in 175 mM Tris HCl buffer met pH 8,0) en een aantal μL van bovenstaand eiwitextract (eindvolume 250 μL). De reactie wordt gestopt na 30 minuten door toevoegen van 1,5 mL van een mengsel bestaande uit 2-propanol, heptaan en water (80:20:2, v/v). Het geheel wordt geschud en er wordt nog 1 mL heptaan extra toegevoegd. De organische fase en de waterige fase ontmengen, waarbij de organische fase het gevormde trioleoylglycerol bevat en de

Tabel 3: Radio-activiteit in de organische fase i.f.v. toegevoegd volume extract.

hoeveelheid extract (μL)	radio-activiteit (μCi)
0	0
10	3,20
20	6,19
30	9,18

waterige fase de restanten van het oleoyl-CoA. 1 mL van de volledige heptaanfase wordt getransfereerd naar de scintillatieteller voor bepaling van de radioactiviteit in de fractie. De resultaten worden weergegeven in tabel 3.

Bereken de specifieke activiteit van het DGAT.

- (c) (2 points) Bereken de totale activiteit en de activiteit per gram nierweefsel.

2. (6 points) Op 20 augustus 2020 wordt Alexei Navalny onwel op het vliegtuig van Omsk naar Moskou. Zijn entourage heeft weinig vertrouwen in de plaatselijke gezondheidszorg en op 23 augustus wordt Navalny -nog steeds in kunstmatige coma- getransporteerd naar een Duits ziekenhuis. De symptomen doen de Duitse artsen vermoeden dat Navalny werd blootgesteld aan een zenuwgif. De Russische autoriteiten vinden alleen al de gedachte aan een vergiftiging absurd en wijzen erop dat Navalny een ernstige pinda-allergie heeft.

Het doelwit van de verdachte zenuwgiften is acetylcholinesterase (AChE), dat de afbraak van de neurotransmitter acetylcholine katalyseert. Novichok (nog vers in het toxicologisch geheugen sinds de vergiftiging van Sergei en Yulia Skripal in 2018) en andere zenuwgiften werken in op de affiniteit van AChE voor zijn substraat: acetylcholine zal dan niet langer afgebroken door AChE, wat leidt tot een overstimulatie van zowat alle zenuwen. Oncontroleerbare spiercontracties (ook sluitspieren, zweet- en traankanaaltjes, peristaltiek,... en uiteindelijk ook het hart!) en helse pijn zijn het onmiddellijke gevolg.

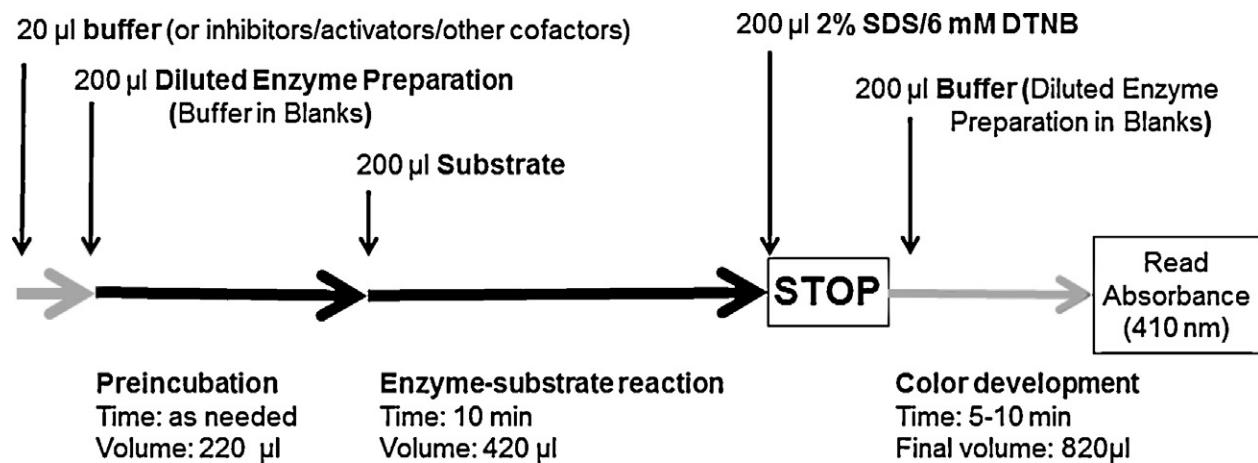
De levensverwachting van de Navalny daalt met de minuut. De afdeling diagnostiek moet zo snel mogelijk uitsluitsel brengen. Hiervoor worden de enzymkarakteristieken van AChE in het serum bepaald. Als substraat wordt in deze test acetylthiocholine (ATCh) gebruikt. Dit wordt omgezet in thiocholine, dat vervolgens onmiddellijk en volledig weg-reageert met dithiobisnitrobenzooat (DTNB) tot een geel ion ($\epsilon = 10,5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Het protocol voor de activiteitsbepaling wordt schematisch weergegeven in figuur 1. De resultaten worden weergegeven in tabel 4.

Bepaal K_m van het enzym in het bloed van Navalny. De concentratie AChE in het gebruikte serumstaal bedraagt $0,1 \text{ mg/mL}$.

Actief AChE heeft een K_m van $0,25 \text{ mM}$. Kan de oorzaak van de toestand van Navalny te wijten zijn aan een zenuwgas of is het toch die pinda-allergie?

Tabel 4: Absorbantiewaarden voor de activiteitsbepaling van acetylcholinesterase.

$\mu\text{L ATCh stock}$	$A_{410 \text{ nm}}$
80	0.270
110	0.331
140	0.379
200	0.453



Figuur 1: Het protocol voor activiteitsbepaling van acetylcholinesterase. De 200 µL substraat bestaat uit het volume, vermeld in tabel 4, aangelengd tot 200µL met buffer. De concentratie van de stockoplossing ATCh is 2 mM.