

# Oefeningenexamen

Geïntegreerd Practicum Fysiologie-Biochemie:

31 maart 2021

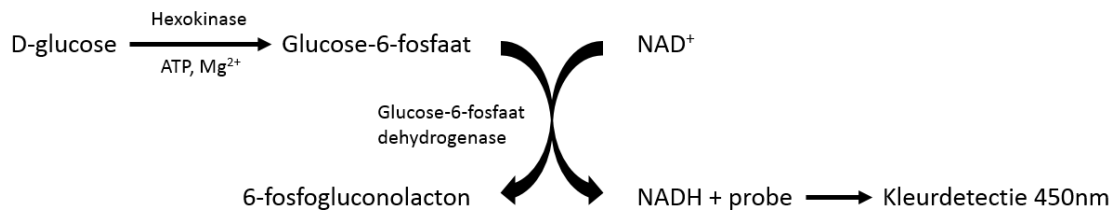
Los de opgaven op met behulp van een rekenblad (Excel, Google spreadsheet, LibreOffice Calc) of R. Je kan je oplossing doormailen tot 31 maart om 19u00.

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.

1. Hexokinases (HK) zijn belangrijke enzymen in het glucosemetabolisme van bacteriën, planten, dieren en mensen. Ze fosforyleren glucose tot glucose-6-fosfaat van waaruit de glycolyse kan starten. Hexokinases bestaan uit vier verschillende isovormen en een tekort of overmaat van een isovorm kan leiden tot ernstige ziektes, zoals de ziekte van Duchenne, hemolytische anemie of uitzaaïing van tumoren. Het is dus uiterst belangrijk dat abnormale hexokinaseactiviteit snel gedetecteerd kan worden.
  - (a) (4 points) Tijdens je vakantiejob in het labo voor klinische biologie van het UZA krijg je de opdracht de hexokinaseactiviteit te bepalen van een celcultuur. Gelukkig bestaat er een protocol om deze test uit te voeren. In deze test wordt glucose omgezet tot glucose-6-fosfaat door de hexokinaseactiviteit van je staal. Glucose-6-fosfaat wordt vervolgens geoxideerd door glucose-6-fosfaat dehydrogenase met de vorming van NADH, dat een kleurloze probe omzet in een gekleurd product met sterke absorbantie bij 450 nm (zie fig. 1).



Figuur 1: Reactiemechanisme hexokinase activiteitsassay

De test gaat als volgt: Aan 10 mg cellen ( $10^6$  cellen) wordt 200  $\mu\text{L}$  ijskoude extractiebuffer toegevoegd. Dit mengsel wordt 10 minuten op ijs bewaard, gevolgd door centrifugatie gedurende 5 minuten op 12000 toeren per minuut. Het supernatans hiervan (180  $\mu\text{L}$ ) wordt overgebracht in een nieuw buisje. 50  $\mu\text{L}$  van dit supernatans wordt toegevoegd aan 50  $\mu\text{L}$  reactiebuffer. Vervolgens wordt 50  $\mu\text{L}$  reactiemix toegevoegd (bestaande uit reactiebuffer, glucose-6-fosfaat dehydrogenase, glucose, kleurloze probe en cofactoren). Dit mengsel wordt bewaard op kamertemperatuur en vervolgens gemeten op 450 nm.

Van je collega krijg je alle gegevens om een NADH-ijklijn te bepalen. Hij nam een bepaald volume (zie tabel 1) van een 1,25 mM NADH-stockoplossing en lengde dit aan tot 100  $\mu\text{L}$  met reactiebuffer. Vervolgens werd hier 50  $\mu\text{L}$  reactiemix aan toegevoegd. De onmiddellijke kleurreactie kon gemeten worden op 450 nm.

Je deed de test zoals hierboven beschreven op een tumorcelkweek en liet de stalen gedurende 20, 40 en 60 minuten incuberen. In tabel 2 worden de resultaten hiervan weergegeven. Bereken de specifieke hexokinaseactiviteit van je staal per mg cellen.

- (b) (4 points) Je baas is uiterst ontevreden. Hexokinaseactiviteit moet namelijk worden uitgedrukt per mg eiwit. Je gaat opnieuw aan de slag. Om het eiwitgehalte in je staal te bepalen, maak je eerst gebruik van een standaardreeks.
  1. Van een standaardoplossing met 1 mg/ml eiwit werden vooraf bepaalde volumes telkens aangelengd tot 1 mL met gedestilleerd water.

Tabel 1: standaardreeks NADH-stockoplossing (formule voor  $a$  in de ijklijn  $y = ax$ :  $a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$ )

$\mu\text{L}$ NADH-oplossing	$A_{450}$
0	0,055
2	0,213
4	0,370
6	0,500
8	0,691
10	0,839

Tabel 2: Absorbantie bij 450 nm na activiteitsassay tumorstalen i.f.v. incubatietijd.

Tijd (min)	$A_{450}$
20	0,489
40	0,758
60	0,996

2. Vervolgens werd 3 mL reagens A toegevoegd en bleven de stalen 1 uur incuberen.
3. Vóór het meten van de absorptie werd nog 300  $\mu\text{L}$  kleurreagens toegevoegd.
4. Van elk staal wordt de absorbantie bij 595 nm gemeten.
5. Na het opstellen van de ijklijn wordt de test zoals hierboven beschreven, uitgevoerd. Het bekomen supernatans wordt gelyofiliseerd en vervolgens geresuspendeerd in de helft van het oorspronkelijke volume. Verder wordt de procedure van de ijklijn gevolgd. De gebruikte hoeveelheden en gemeten absorbanties worden weergegeven in tabel 4.

Tabel 3: Standaardreeks eiwitbepaling.

$\mu\text{L}$ standaardoplossing	$A_{595}$
0	0,000
10	0,078
20	0,133
40	0,246
60	0,363
80	0,453

Bereken nu de specifieke activiteit waar je baas wel blij mee is.

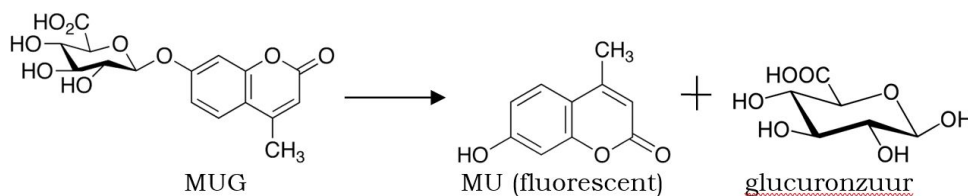
Tabel 4: Eiwitbepaling supernatans

$\mu\text{L}$ supernatans	$A_{595}$
10	0,063
20	0,112
30	0,174

Tabel 5: Standaardcurve (volume MU vs. fluorescentie in RFE)

MU ( $\mu\text{M}$ )	RFE
0,1	75
0,2	151
0,5	405
0,8	589
1,2	912

2. De expressie van het GUS-gen wordt gemeten met behulp van een synthetisch substraat, methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG). Na verwijdering van het glucuronmolecule door GUS, komt methylumbelliferon (MU) vrij, dat fluoresceert bij een golflengte van 450 nm. Het resultaat wordt gemeten in RFE (relatieve fluorescentie eenheden).



Om de activiteit van  $\beta$ -glucuronidase (GUS) <sup>1</sup> onder invloed van een wortelspecifieke promotor te onderzoeken, werden getransformeerde hortensia's aangemaakt. De wortels van 10 plantjes werden afgeknipt en van 10 gram wortels en 500 mL extractiebuffer werd een ruw extract gemaakt.

- (a) (4 points) Er wordt een substraatskinetiek (gegevens in tabel 6) opgesteld om de optimale substraatconcentratie voor verdere proeven met het extract te bepalen. Hiervoor wordt eerst een ijklijn opgesteld voor het reactieproduct (MU) op basis van de gegevens in tabel 5.

Bereken  $K_m$  en  $V_{max}$  voor het glucuronidase in het extract.

- (b) (2 points) Wat is de totale activiteit en de activiteit per gram wortels bij een RFE van 1000?

<sup>1</sup> $\beta$ -glucuronidase katalyseert het afsplitsen van een molecule glucuronzuur van diverse complexe suikerketens, maar ook van enkele specifieke synthetische fluorogene substraten. Het enzym komt van nature niet voor in planten en is dus erg geschikt voor onderzoek naar regulerende sequenties of mechanismen in een plant: je brengt het GUS-gen in het plantenDNA, op een plek die naar je vermoedt onder invloed staat van de te onderzoeken regulerende sequentie, je kweekt de plant op, je voegt substraat toe en je kijkt of, waar, wanneer en hoeveel kleurstof of fluorescentie (afhankelijk van het gekozen substraat) er in de getransformeerde planten wordt gevormd.

Tabel 6: Substraatskinetiek (reactietijd = 10 min)

$\mu\text{L}$ MUG- stockopl. 2mM	$\mu\text{L}$ buffer	$\mu\text{L}$ extract	RFE
10	80	10	190
20	70	10	302
40	50	10	440
60	30	10	496
80	10	10	527