

Arvelig immundefekt

2. Arvelig immundefekt

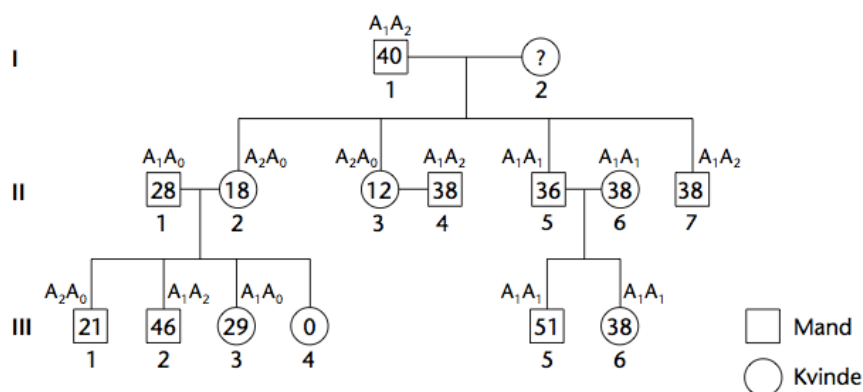
- A. En arvelig immundefekt hos mennesket skyldes mangel på enzymet ADA, *adenosin-deaminase*. Der findes tre alleler, som hver koder for en variant af ADA-enzymet, se figur 1. Man har bestemt aminosyresekvensen i disse enzymer. Analysen af enzymerne viste, at ADA 1 og ADA 2 kun adskiller sig ved en enkelt aminosyre, idet alanin er erstattet af valin.

A_1 - og A_2 -allerne koder for enzymer med normal enzymaktivitet, mens A_0 koder for et ikke-fungerende enzym.

Figur 2 viser et stamtræ over en familie, hvor alle tre alleler og også sygdommen forekommer. De enkelte personers relative enzymaktivitet er angivet i symbolerne. En relativ enzymaktivitet på 30 og derover anses for normal, da den giver et normalt fungerende immunforsvar.

Enzymaktiviteten for I-2 er aldrig blevet bestemt.

Allel	Enzymvariant
A_1	ADA 1
A_2	ADA 2
A_0	ADA 0



Figur 1.

Figur 2. Stamtræ over en familie, hvor ADA-mangel forekommer.

a. Hvilken mutation kan føre til den nævnte ændring i aminosyresekvensen?

En ændring i basesekvensen kaldes en genmutation, og en genmutationer, hvor et basepar i DNA ændres til et andet basepar kaldes substitutionsmutationer. Hvis ændringen i baseparret koder for samme protein som før, kaldes mutationen en tavs mutation, da den ikke kommer til udtryk. Kommer ændringen derimod til udtryk ved at kode for et nyt protein, kaldes mutationen en missense-mutation.

Den nævnte ændring i aminosyresekvensen kommer til udtryk ved at kode for et nyt protein, valin. På en oversigt over den genetiske kode og hvilke aminosyrer de koder for, kan det ses, at alanin dannes ved tripletterne GCA, GCT, GCG og GCC. Valins tripletter kræver kun en ændring af det andet basepar fra C til T, idet valin dannes ved tripletterne GTA, GTT, GTG og GTC.

b. Giv en mulig forklaring på, at enzymvarianterne ADA 1 og ADA 2 kan have samme aktivitet trods forskellen i aminosyresammensætningen.

En punkt mutation kan have meget forskellig betydning for organismen, idet ændringen enten kan være tavs og uden betydning, eller ændringen kan medføre, at der bliver dannet et ny aminosyre, som har stor betydning for proteinet. F.eks. hvis ændringen sker i bindingsstedet/den aktive del for et enzym, og gør så enzymet ikke længere kan bindes.

Enzymvarianterne ADA 1 og ADA 2 har kun en enkelt ændring i aminosyresekvensen. Forskellen mellem de to aminosyrer alanin og valin er minimal og ændringen er derfor uden betydning. Begge aminosyrers radikaler er upolære/hydrofobe og minder i høj grad om hinanden. Den forskellige opbygningen af aminosyrerne har heller ikke ændret på strukturen og den lille ændring er ikke i enzymets aktive del. Derfor kan enzymerne vil have samme aktivitet.

c. Analysér figur 2. Angiv genotypen hos I-2 og III-4, og forklar forskellen i enzymaktivitet hos personerne II-2 og II-5.

Figur 2 viser et stamtræ over en familie, hvor allelerne A_1 , A_2 og A_0 forekommer. Hvert af familiens medlemmer (på nær I-2 og III-4) har fået bestemt deres genotype og deres relative enzymaktivitet, og det gør det muligt at følge nedarvningen af sygdommen.

Manden i første generation er rask og har genotypen A_1A_2 og hans relative enzymaktivitet på 40 bekræfter dette. Kvinden i første generation har ikke fået bestemt genotypen, og for at bestemme denne, er det muligt at kigge på deres børns genotyper.

II-2 og II-3 har begge genotypen A_2A_0 , dvs. de begge har sygdommen. Men da I-1 ikke har allelen A_0 kan det konkluderes, at I-2 har minimum en allel for enzymvarianten.

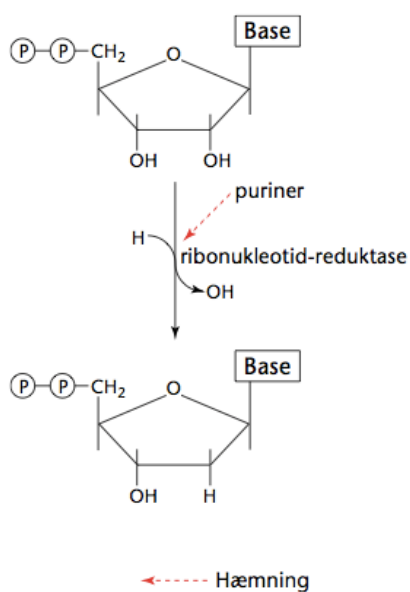
For at bestemme anden allel hos I-2, kigges der på II-5s genotype, A_1A_1 . Idet at genotypen er homozygot for enzymvarianten A_1 , betyder det at hver forælder må have bedraget med en allel. I-2s genotype er bestemt til A_1A_0 .

Der er stor forskel på enzymaktiviteten hos II-2 og II-5, og det skyldes genotyperne. II-2 har en allel for et fungerende enzym og et for det ikke-fungerende enzym. Det resulterer i nedsat enzymaktivitet, da der bliver dannet halvt så meget af enzymet ADA, som der kunne have været. II-5 er derimod homozygot for den fungerende enzymvariant A_1 og har en normal enzymaktivitet.

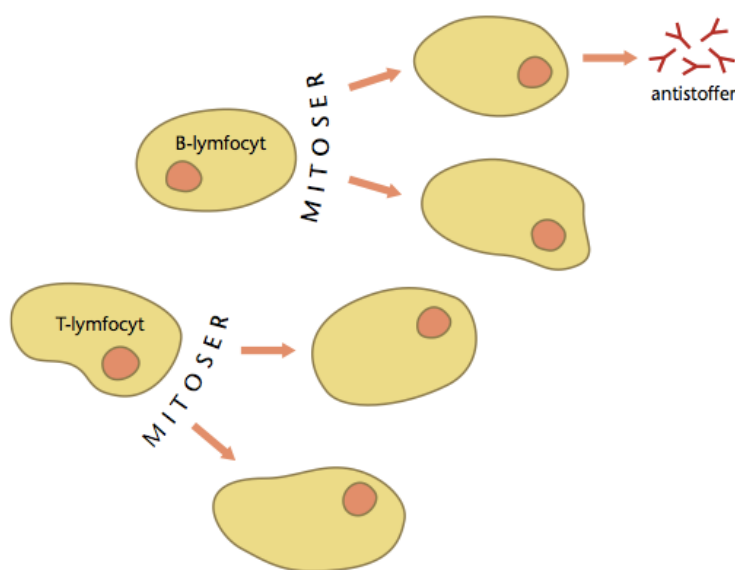
I tredje generation har III-4 en enzymaktivitet på 0. Genotypen kendes ikke, men når enzymaktiviteten er 0 tyder det på, at der ikke er nogle fungerende enzymer til at danne ADA, dvs. A_0A_0 . For at bekræfte dette undersøges forældrenes genotyper, A_1A_0 og A_2A_0 . Når begge forældre har en allel for A_0 , er det muligt at III-4 kan være homozygot herfor. Det kan konkluderes at III-4 har genotypen A_0A_0 .

B. ADA, *adenosin-deaminase* er nødvendig for nedbrydning af puriner i cellerne. Hvis ADA er inaktivt, ophobes purinerne i cellerne. Puriner er giftige i høje koncentrationer, bl.a. fordi de hæmmer enzymet ribonukleotid-reduktase, se *figur 3*. Dette skader især celler i deling, der syntetiserer DNA. Personer med ADA-mangel rammes ofte hårdt af infektioner, der normalt ville være harmløse. Som behandling har man forsøgt:

- Injektion med ADA.
- Injektion med IgG.
- Knoglemarvstransplantation.



Figur 3. Syntese af DNA-nukleotider.



Figur 4. Deling og differentiering af B- og T- lymfocytter.

a. **Beskriv processen vist i *figur 3* og forklar, hvorfor ADA-mangel kan medføre, at DNA-dannelsen hæmmes.**

Figur 3 viser syntetiseringen af et DNA-nukleotid med enzymet ribonukleotid-reduktase. Enzymet tilhører første enzymgruppe oxidoreduktaser, som katalyserer overførsel af elektroner mellem stoffer (redoxreaktioner). På figuren ses, at der er tale om en reduktion. Dvs. der sker en tilførsel af elektroner til ribonukleotidet, så stoffet fraspalter en hydroxygruppe og optager et frit hydrogenatom. Stoffet er efter reaktionen et deoxyribosenukleotid, som er byggestenene i DNA.

Den røde pil på figur 3 viser, at puriner hæmmer enzymet ribonukleotid-reduktase. Hvis der er en for høj koncentration af puriner, vil enzymet ikke kunne katalysere processen vist på figuren, og der vil kun blive dannet i begrænsede mængder DNA.

b. **Forklar, hvorfor personer med ADA-mangel ofte rammes hårdt af infektioner. Inddrag *figur 3* og *figur 4*.**

Som forklaret ovenfor, vil ADA-mangel medføre en hæmning af DNA-dannelse. Det medfører, at cellerne ikke kan dele sig. Når kroppen bliver ramt af en infektion går immunforsvaret i gang med at bekæmpe patogenene. Det sker ved at en makrofag omslutter patogenet, så det præsenterer antigenet på ydersiden. Dette er nødven-

diget for, at en T-lymfocytcelle kan aktiveres. Når T-lymfocytten er aktiveret, begynder den at sende signalstoffer til makrofager, T-dræberceller og B-lymfocytter. Desuden skal den kunne lave en deling så den også kan differentiere sig selv til en T-huskecelle. Når B-lymfocytten bliver aktiveret af signalstoffet fra T-lymfocytten, vil den dele sig og differentieres til henholdsvis plasmaceller og B-huskeceller, som danner antistoffer mod antigenerne.

Når en person lider af ADA-mangel, vil cellerne være begrænset i at lave mitose. Det har stor indflydelse på immunforsvaret, som vil have mangel på celler. Hvis personen får en infektion, vil der være færre T-lymfocytter til at aktivere de andre celler. På samme måde vil B-lymfocytterne heller ikke kunne dele sig, og der vil ikke blive dannet huskeceller eller antistof i samme mængde og hastighed, som hos en rask person.

c. Vurder fordele og ulemper ved de tre nævnte behandlingsformer

En injektion med ADA vil formindske den høje koncentration af puriner, og det vil medføre, at der igen kan dannes deoxynukleotider, så cellerne kan dele sig. Når cellerne kan dele sig vil immunforsvaret virke optimalt igen. En ulempe for denne behandlingsmetode er, at den er kortvarig. Kroppen kan fortsat ikke danne nok af enzymet, og det vil kræve at personen vil fortsætte sin behandling hyppigt for resten af livet.

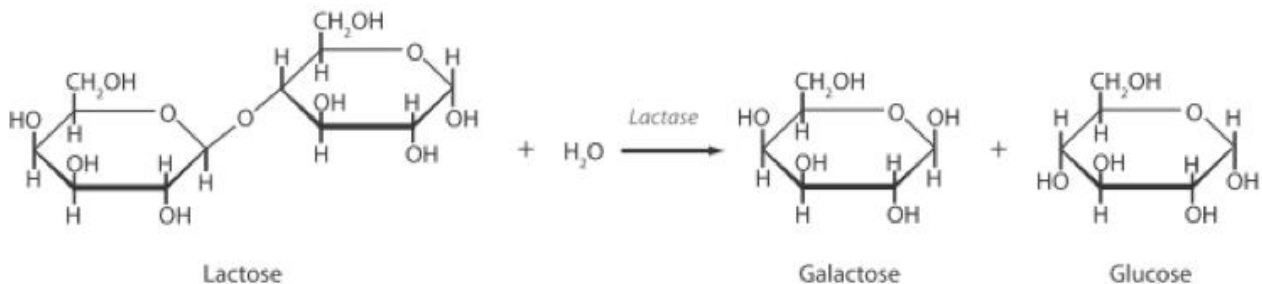
En injektion med antistoffet IgG vil gøre kroppen mere modstandsdygtig overfor sygdomme. IgG har en høj affinitet og dannes typisk ved sekundære infektioner, og giver således et forspring for immunforsvaret, når der er en infektion. Til gengæld hjælper det ikke kroppen på længere sigt, da det ikke ændre på problemets kerne.

En behandling med knoglemarvstransplantation¹ (eller stamcelletransplantation) vil være en langsigtet behandling. Knoglemarven består af en væske med ikke-differentierede stamceller i. Da immunforsvarets dele bliver dannet i knoglemarven, gør det muligt at udskifte de gener, som koder for det ikke-fungerende enzym. Dette gøres ved at stamceller fra en rask donor transplanteres vha. blodtransfusion ind i patientens rygmarv. Kroppen vil i de fleste tilfælde lade cellerne differentiere dem selv og kroppen vil nu have et velfungerende immunsystem. Problematikken i knoglemarvstransplantation er, at det kræver en forbehandling som dræber de nuværende celler med "fejlgenerne" og svækker immunsystemet, så de nye stamceller ikke frastødes. Oftest er forbehandlingen kemoterapi og evt. stråling, som der er forbundet en risiko ved. Desuden er det dyrt og det er ikke altid muligt at finde en donor, som har arvemateriale som ligner patientens, og så er stamcelletransplantation ikke en mulighed.

¹ <http://www.auh.dk/om+auh/afdelinger/det+danske+knoglemarvsdonorregister/hvad+er+en+knoglemarvstrans-plantation-c7->

Bioteknologieksamen. opg. 1, maj 25, 2013

Mennesker er i stand til at nedbryde lactose (mælkesukker) som børn. I store dele af verden mister den voksne befolkning dog helt eller delvist denne evne og bliver lactoseintolerante. Lactoseintolerante får i større eller mindre grad maveproblemer og diarré, hvis de indtager mælk.



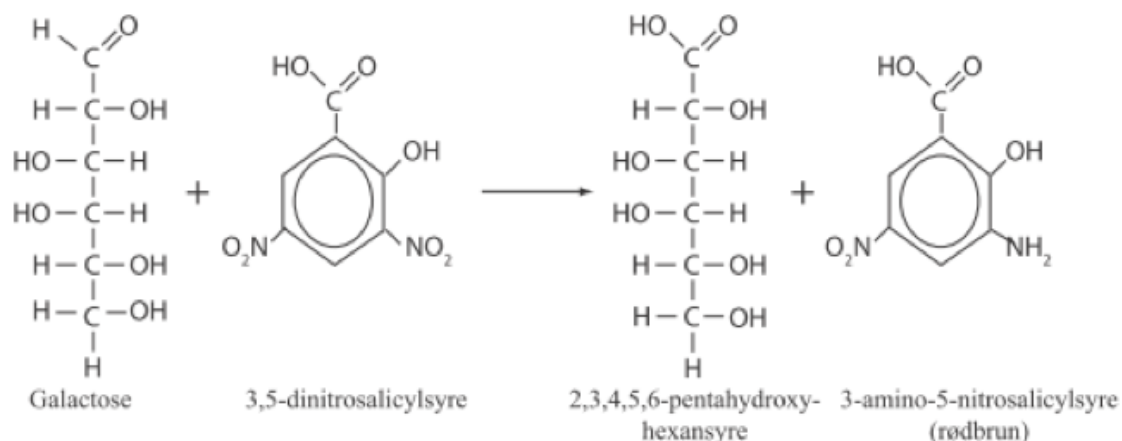
Figur 1. Nedbrydningen af lactose.

1. Angiv hvilken enzymklasse *lactase* tilhører.

Lactase tilhører enzymklassen hydrolaser. En hydrolase spalter et organisk molekyle under optagelse af vand. På figur 1 ses det organiske molekyle lactose som under optagelse af vand bliver spaltet til galactose og glucose.

Koncentrationen af lactose i mælk kan bestemmes ved en spektrofotometrisk metode. Først behandles mælken med *lactase*, så lactose nedbrydes til glucose og galactose som vist i figur 1.

Glucose og galactose kan ved reaktion med 3,5-dinitrosalicylsyre danne den rødbrune forbindelse 3-amino-5-nitrosalicylsyre, der absorberer lys ved 540 nm, vist i figur 2.



Figur 2. Princippet for reaktion mellem galactose og 3,5-dinitrosalicylsyre. Reaktionen er ikke afstemt. Glucose reagerer på tilsvarende vis.

2. Argumenter for, at der er tale om en oxidation af galactose i reaktionen vist på figur 2.

En oxidation er en reaktion med oxygenatomer, som virker på molekylets funktionelle gruppe uden at springe carbonskelettet. Der kan ikke ske en oxidation uden, at der

sker en reduktion af et andet molekyle. Det kaldes også en redoxproces. På figur 2 ses galactose med en række hydroxygrupper og en enkelt aldehyd for enden. Ved reaktionen afgiver 3,5-dinitrosalicylsyre sine to oxygenatomer fra den ene nitrogruppe, og optager to hydrogenatomer, og reaktionen opfylder på den måde kravene til at være en oxidation. Forholdet i reaktionen mellem galactose og 3,5-dinitrosalicylsyre vil være 2:1 i forhold til molekylantal. Reaktionen skal selvfølgelig også afstemmes som en redoxreaktion.

I et forsøg lod man en række standardopløsninger af galactose og glucose reagere med 3,5-dinitro-salicylsyre. Absorbans af opløsningerne blev målt ved 540 nm, se figur 3.

Samlet koncentration af galactose og glucose (mM)	Absorbans
0	0
2,0	0,198
4,0	0,397
6,0	0,595
8,0	0,794
10,0	0,992

Figur 3. Sammenhørende værdier for den samlede koncentration af galactose og glucose og absorbans ved 540 nm. Kuvettebredde 1,0 cm.

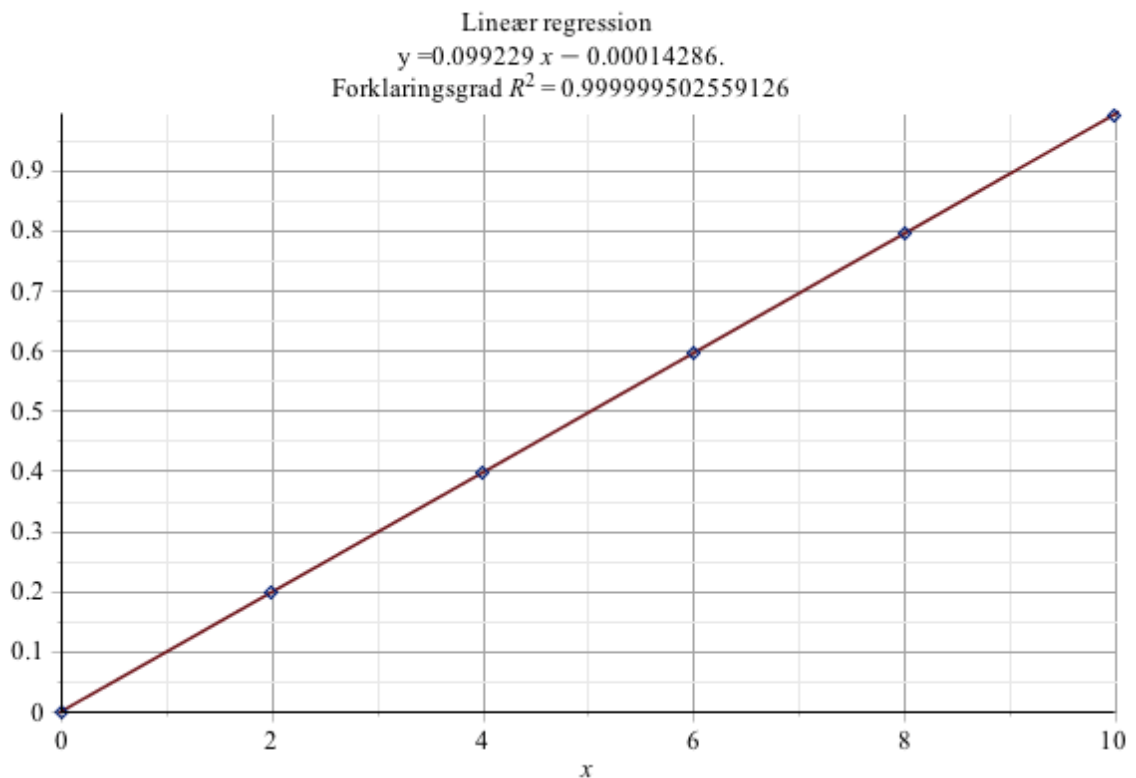
3. Eftervis at måleresultaterne fra ovenstående forsøg vist i figur 3 er i overensstemmelse med Lambert-Beers lov.

Lambert-Beers lov:

$$A = \varepsilon_{\lambda} * l * [S]$$

hvor A er absorbansen, ε_{λ} er ekstinktionskoefficienten, l er længden af lysvejens længde (bredden af kuvetten som den er blevet målt i) og [S] er den aktuelle stofmængdekonzentration. Da længden af lysvejen er 1,0 cm kan der ses bort fra l i denne beregning. En standardkurve laves ved at lave en lineær regression mellem stofmængdekonzentrationen og absorbansen.

På figur 1 kan den fremstillede standardkurve ses og ovenover står funktionen for den lineære sammenhæng som er tegnet. Det ses på R-værdien er meget tæt på 0, så det må kunne konkluderes at måleresultaterne stemmer overens med Lambert-Beers lov.



Figur 1

Efterfølgende blev mælk behandlet med *lactase* og fortyndet 100 gange med vand. Derefter reagerede den fortyndede mælk med 3,5-dinitrosalicylsyre, og absorbansen blev målt ved 540 nm i en kuvette med en bredde på 1,0 cm. Absorbansen blev målt til 0,513.

4. Bestem koncentrationen af lactose i mælken. Resultatet angives i mM.

Ud fra funktionen givet over standardkurven findes stofmængdekonzentrationen af galactose og glucose, når absorbansen er 0.513:

$$\text{solve}(A(s) = 0.513, s) = 5.171321624$$

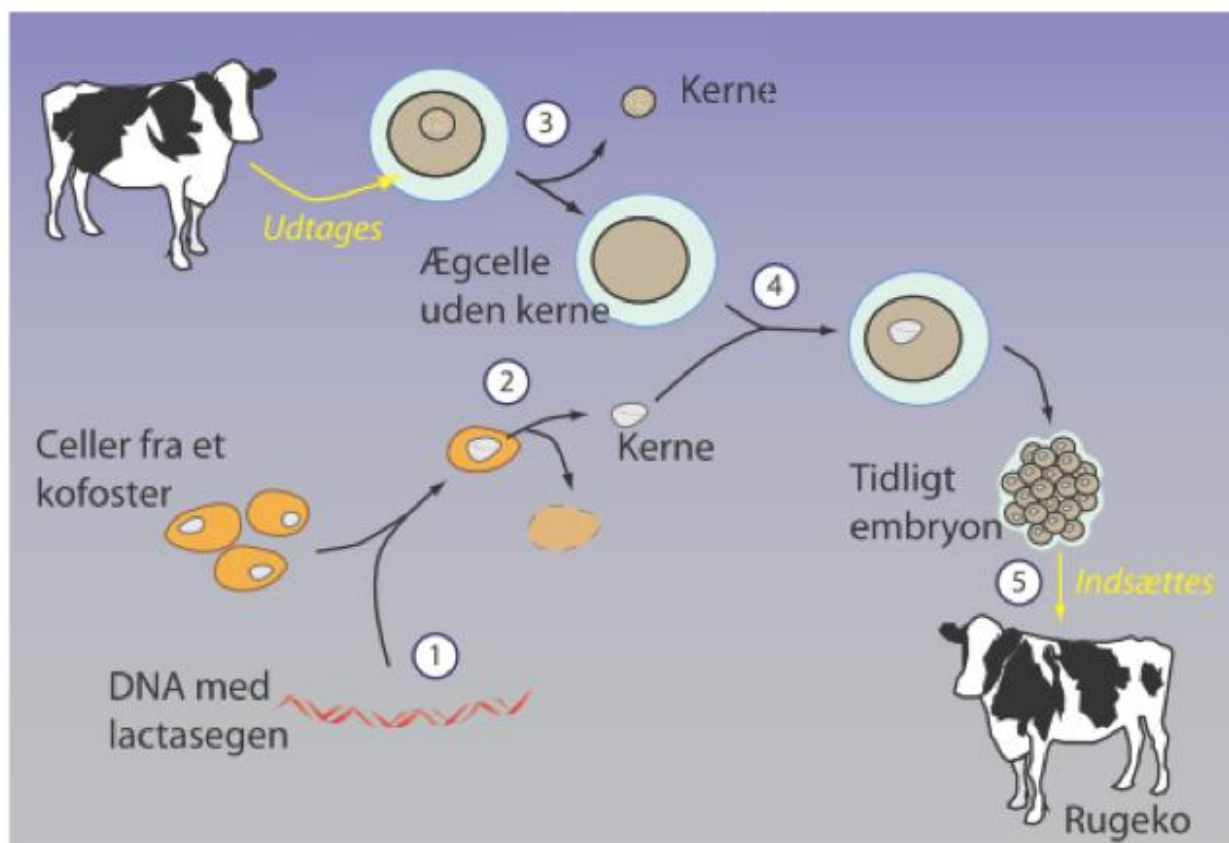
Når lactose spaltes til galactose og glucose er forholdet 1:2, derfor skal den fundne stofmængdekonzentration halveres. Desuden skal den ganges med 100, da mælken er fortyndet 100 gange.

$$5.171321624 \text{ mM} \cdot 50 = 258.5660812 \text{ mM}$$

Konzentrationen af lactose i mælken er bestemt til 258.6 mM

Forskere har fremstillet en ko, der producerer mælk med et lavt indhold af lactose. Princippet i metoden er at indsætte et ekstra gen for *lactase* i en celle fra et kofoster. Den transformerede celle anvendes til fremstilling af en genmodificeret ko, se figur 4.

Den genmodificerede ko producerer *lactase* i yveret, og dermed nedbrydes lactose i mælken.



Figur 4. Fremstilling af en genmodificeret ko.

5. Skriv en kort figur tekst til figur 4, der beskriver hvordan en genmodificeret ko kan fremstilles.

DNA med lactasegen syntetiseres i laboratoriet (1). DNA indsættes i en celle fra et kofoster og cellekernen med DNA isoleres (2). Fra en ko udtages en ubefrugtet ægcelle og opretholdes i laboratoriet så den ikke vokser eller deler sig. Kernen fjernes (3). Ægcellen uden kerne og kernen med DNA smeltes sammen ved f.eks. at tilføje en elektrisk strøm (4). De kernetransplanterede æg vokser et par dage og det tidlige embryo indsættes i rugekoen (5).

En anden metode til at producere mælk med lavt indhold af lactose er ved hjælp af en genmodificeret skimmelsvamp. Et gen for *lactase* er fundet i en bakterie, der lever i Grønland. Genet er oprenset og indsat i en skimmelsvamp, der nu kan producere *lactase* i store mængder. Lactaseenzymet er aktivt selv ved lave temperaturer og kan tilsættes almindelig mælk, så lactose nedbrydes. Mælken kan på den måde anvendes af lactoseintolerante personer.

6. Diskuter fordele og ulemper ved de to metoder nævnt ovenfor til produktion af mælk med lavt lactoseindhold.

En skimmelsvamp bruges ofte som cellefabrik til mange forskellige slags produkter, da der findes varianter som ikke har toksiner, som også ses ved osteproduktion. Det er en stor fordel at bruge skimmelsvamp, da dens generationstid er kort på mellem 3-6 timer, og det er let at fermentere dem. Desuden kan lactaseenzymet være aktivt ved lave temperaturer og kan tilsættes almindelig mælk, så lactoseintolerante personer ikke skal være afhængige af at have lactosefrimælk til rådighed. Skimmelsvamps metoden

vil højst sandsynligt også være meget billigere end ved genmodificering af køer. En ting man skal være opmærksom på, at man har med de rigtige svampe at gøre, da der er nogle skimmelsvampe som producerer meget giftige mykotoksiner.

Man slipper også for etikken omkring at genmodificere køer, ved at bruge skimmelsvampe. Hvis der er et lidt større marked for at producere mælk med et lavt indhold af lactose, kan det være en fordel at genmodificere køer, fordi når en ko først er genmodificeret, så vil koen til evig tid producere lactose-fri mælk, som kan sælges ligesom almindelig mælk. Hvis koen får en kalv og der senere avles på kalven, så kan det være muligt at avle køer med lactase-enzymet, hvis ikke genet er lethalt. Hvis genet er recessivt skal man ud i flere generationer eller man skal genmodificere en tyr. Ulempen er at det tager lang tid og det er dyrt.