

## FREMSTILLING AF INSULINPRODUCERENDE CELLEFABRIKKER I DET VIRTUELLE LABORATORIUM

Udgangspunktet for dette tema er Det Virtuelle Laboratorium og undervisningsmateriale om cellefabrikker fra Biotech Academy. Temaet handler om udvikling og brug af cellefabrikker med det formål at danne proteinet insulin: Ved hjælp af genteknologi indsættes fremmede gener i mikroorganismer så de omdannes til cellefabrikker, der producerer værdifulde medicinske stoffer som fx insulin. Diabetes og behandling af diabetes vha. hormonet insulin berøres kort, mens der er vægt på forskning i nye typer insulin samt udfordringerne der er forbundet med fremstilling af alternative insulinpræparater. Bioinformatik med søgning i NCBI, Uniprot og PDB indgår som et væsentligt element sammen med strukturanalyse i Uniprot, Virtual Ribosome og PyMOL. Undervisningsforløbet er gennemført på 10 moduler af halvanden time med et bioteknologihold der går i 1.g<sup>1</sup>.

### Kernestof

- bindingstyper i proteiner
- proteiner og aminosyrer - struktur og egenskaber
- molekylært og cellulært grundlag for genregulering og proteinsyntese
- genteknologi, herunder gensplejsning og genmodificerede organismer
- eksperimentelle arbejdsmetoder der anvendes inden for bioteknologi og lægemiddelindustri: celledyrkning, transformation, test af fremstillet insulin på dyremodeller.

### Supplerende stof

Det supplerende stof omhandler sygdommen diabetes, biologisk produktion vha. cellefabrikker, forskning i fremstilling af insulinproducerende cellefabrikker.

### Notebookfil med diasshow, arbejdsopgaver mm

I forløbet brugte vi en SMARTnotebook-fil der indeholder diasshow med figurer, arbejdsopgaver, links, oversigt over delforløb, opsamlinger med mere. Undervejs blev der tilføjet elevprodukter, elevnoter og andet, og eleverne bidrog til at fylde indhold i filen via en interaktiv tavle. Eleverne fik med jævne mellemrum elektroniske handouts med udvalgte slides i pdf-format. Notebook-filen kan konverteres til en powerpoint præsentation, ligesom de håndskrevne noter, svar på opgaver osv. kan slettes i notebookfilen. Filen har flere formål: At præsentere indholdet og arbejdsopgaver i de enkelte moduler, at samle informationer, opgaver og produkter et enkelt sted samt at skabe overblik over forløbet som helhed.

### Eksperimentelt arbejde og produkter

Eleverne skal stifte bekendtskab med molekylærbiologiske værktøjer og teknikker gennem to øvelser; en øvelse om bioinformatik og en virtuel øvelse hvor der fremstilles cellefabrikker. Opgaveformuleringerne ses nedenfor.

I bioinformatikøvelsen som omhandler insulin, anvender eleverne databaser og programmer til at undersøge DNA- og aminosyresekvenser, transkribere DNA til RNA og undersøger sekundær og tertiær struktur. Eleverne guides igennem databaser og programmer af to videotutorials mens de løser en bunden opgave. Besvarelsen af opgaven afleveres og evalueres af underviseren.

I den anden øvelse fremstiller eleverne insulinproducerende cellefabrikker i Det Virtuelle Laboratorium, og arbejder sig gennem de forskellige trin i processen med at fremstille cellefabrikker. Produktet er en screencast, hvor eleven viser og forklarer processen fra design af DNA-sekvens over fremstilling af cellefabrikker til test af produkt. Produktet afleveres og evalueres af underviseren<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Link til forløbsbeskrivelse:

[https://www.lectio.dk/lectio/73/studieplan/forloeb\\_vis.aspx?phaseid=3114858816&prevurl=studieplan.aspx%3fholdelementid%3d2504934482%26displaytype%3dugeteksttabel](https://www.lectio.dk/lectio/73/studieplan/forloeb_vis.aspx?phaseid=3114858816&prevurl=studieplan.aspx%3fholdelementid%3d2504934482%26displaytype%3dugeteksttabel)

<sup>2</sup> Tre eksempler på screencasts i Det Virtuelle Laboratorium

[http://www.youtube.com/watch?v=529DeZkrMls&feature=bf\\_prev&list=PL111F0B443541FF18&in...](http://www.youtube.com/watch?v=529DeZkrMls&feature=bf_prev&list=PL111F0B443541FF18&in...)

[http://www.youtube.com/watch?v=nlwocj-lCqU&feature=bf\\_next&list=PL111F0B443541FF18&in...](http://www.youtube.com/watch?v=nlwocj-lCqU&feature=bf_next&list=PL111F0B443541FF18&in...)

Eleverne vejledes i fremstilling af poster som på en interessant måde formidler emner der er relateret til forskning i insulin og behandling af diabetes. Artiklerne *Genetisk tuning af cellefabrikker* og *Udvikling af hurtigtvirkende insulin* er velegnede til at lave posters over. Som afrunding afholdes postersession, hvor eleverne præsenterer deres posters med et oplæg. Poster kan evalueres af undervisningen hvis der er behov.

Har man lyst til at inddrage alignment og fylogener kan opgaven på sidste side benyttes.

### Øvelse: Bioinformatikøvelse

1. Opgaver til NCBI's hjemmeside
  - a. Indsæt kodende DNA streng (CDS)
  - b. Indsæt den fulde protein-sekvens som kan findes på NCBI's hjemmeside
2. Opgaver til UNIPROT's hjemmeside
  - a. Hvor mange aminosyrer indgår i præ-pro-insulin?
  - b. Angiv med tal hvilke aminosyrer der indgår i præ-pro-insulin
  - c. Angiv med tal hvilke aminosyrer der indgår i pro-insulin
  - d. Angiv med tal hvilke aminosyrer der indgår i insulin
  - e. Hvor mange aminosyrer indgår i insulin?
  - f. Tag et screenshot af den sekundære struktur og indsæt her og fortæl kort hvad farvekoderne betyder.
  - g. Hvad er  $M_{\text{insulin}}$  – altså den molare masse for insulin? Bemærk at man for proteiner angiver den molare masse i Da (Daltons) og ikke g/mol som I kender fra mængdeberegninger.
3. Opgaver til PDB's hjemmeside
  - a. Hvad er koden for den 3D struktur vi bruger?
  - b. Hvad er opløsningen på den 3D strukturen?
4. Opgaver til Pymol
  - a. Indsæt et billede af 3D strukturen hvor I viser "main chain" med "sticks".
  - b. Indsæt et billede af 3D strukturen hvor I viser "cartoon" visning med A og B kæden i forskellige farver.
  - c. Indsæt et billede af 3D strukturen hvor I viser "surface".
  - d. Indsæt et billede af 3D strukturen hvor I viser "hydrogen-bindinger".
  - e. Hvilke andre bindinger findes i proteiner?

### Til læreren

Eleverne vil komme til at arbejde med følgende sider og værktøjer:

- NCBI: Finde kodende DNA-sekvens for humant insulin samt aminosyresekvensen for den kodende del
- Virtual Ribosome: Translation af DNA-sekvens til aminosyresekvens.
- UNIPROT: Undersøge sekundær struktur mm.
- PDB: hente kode for 3D-struktur
- PyMOL: Undersøge insulins 3D-struktur, interne bindinger i molekylet, alfa-helix, beta-sheet. OBS skal installeres inden brug.

### Øvelse: Fremstilling af cellefabrikker i Det Virtuelle Laboratorium

Lav en screencast vha. [www.screencast-o-matic.com](http://www.screencast-o-matic.com) hvor du demonstrerer arbejdsgangen i at fremstille en cellefabrik. Produktionen skal vare omkring 5-7 minutter.

- Ganske kort indledning med formål
- Løbende præsentation af de 7 trin i fremstillingen af cellefabrikker
- Løbende forklaring af hvad du gør og hvorfor du gør det (ikke noget med at det gør du fordi at du ved at det virker)
- Kort afrunding

Upload din screencast til youtube og sørg for at det kun er personer med linket der kan se videoen. HUSK at give os linket så vi kan se hvordan du fremstiller cellefabrikker.

## Til læreren

Eleverne forventes at gennemgå følgende trin

- Design af DNA-sekvens med promotor, ribosombindingssted, start- og stopcodons, det kodende gen og terminator
- Gensplejsning af gærceller med den designede DNA-sekvens vha. elektroporator
- Selektion af transformerede gærceller på antibiotikamedie
- Bestemmelse af optimale pH og temperaturforhold for vækst
- Dyrkning i fermentor
- Oprensning af produkt vha. HPLC (kun berørt ganske overfladisk)
- Test af produkt i kombination med saftevand på diabetiske og normale mus - produktet var enten hurtigtvirkende eller langsomt-virkende insulin afhængig af hvilket gen der blev valgt i design-trinnet

## Særlige fokuspunkter

Eleverne skal kunne

- beskrive insulins opbygning og redegøre for sammenhæng mellem struktur, egenskaber og funktion
- gennemføre kvantitative og kvalitative eksperimenter og undersøgelser
- dokumentere og formidle eksperimenter og undersøgelser mundtligt
- vurdere, hvordan konkret anvendelse af bioteknologi kan påvirke samspillet mellem levende organismer og deres omgivelser

Formidling

- Lave screencast med gennemgang af fremstilling af cellefabrikker i det virtuelle laboratorium
- Lave poster
- Præsentation af poster ved postersession

IT-værktøjer

- Anvende NCBI, Virtual Ribosome, Uniprot, PDB, PyMol,
- Anvende Screencast-o-matic
- Fremstille cellefabrikker i Det Virtuelle Labortorium (Biotech Academy)

## Undervisningsmaterialer

- Diabetes og insulin. Novo Nordisk; 17-18
- Videolink om RNA splicing: <http://www.youtube.com/watch?v=4X8eK15R8yY>
- Grundbog i Bioteknologi 1; 40-42, 81-86, 145-151
- Cellefabrikker: Den bioteknologiske rute fra DNA til protein, Biotech Academy
- Genetisk tuning af cellefabrikker, Biotech Academy
- Udvikling af hurtigtvirkende insulin, Biotech Academy
- Det virtuelle laboratorium, Biotech Academy
- Posterdesign, Biotech Academy: <http://www.biotechacademy.dk/Bioindex/Poster.aspx>
- Vejledning Bioinformatik del 1 af 2 <http://www.youtube.com/watch?v=-pfxTepHECE>
  - Det centrale dogme, introns, exons og splicing
  - Polypeptiders opbygning, herunder primær og sekundær struktur
  - Søgning i NCBI-databasen, herunder nukleotidsøgning, CDS, FASTA
  - Anvendelse af Virtual Ribosom: Translation af nukleotidsekvens fra NCBI til aminosyresekvens og forklaring readingframe
- Vejledning Bioinformatik del 2 af 2 <http://www.youtube.com/watch?v=r-JhoVhzs6s>
  - Søgning i Uniprot: BLAST af aminosyresekvensen fra NCBI som sammenligner sekvensen med andre polypeptider, sortering og udvælgelse af søgeresultater, gennemgang af informationer i BLAST'et og unik identifikationskode

- Søgning i PDB-database: Søgning på Uniprot identifikationskode, fortolkning af søgeresultater, PDB-identifikationskode
- Anvendelse af PyMOL: Henter data fra PDB og laver 3D-struktur af proteinet, visualisering af strukturer vha forskellig repræsentationer (cartoon, sticks, bindinger, sekundære strukturer mm), lave billeder af 3D-strukturer

## Undervisningsplan

Modul	Lektie	Emne	I timen <sup>3</sup>	Fokuspunkter
1	Diabetes og Insulin s. 17-18 Videolink om RNA splicing Videovejledning Bioinformatik del 1	Introduktion til bioinformatik. Det centrale Dogme med vægt på RNA splicing og proteinmodificering.		Anvende af NCBI <sup>4</sup> og Virtual Ribosome <sup>5</sup> til bioinformatikøvelse
2	Grundbog i Bioteknologi 1 s. 145-151 Videovejledning Bioinformatik del 2	Proteiners opbygning, bindinger og tredimensionale struktur (alfa-helix og beta-sheet).		Anvende Uniprot <sup>6</sup> og PDB <sup>7</sup> samt PyMOL <sup>8</sup> til bioinformatikøvelse
3	GBT1 s. 40-42 og 81-86	Bindinger i proteiner		
4	Cellefabrikker: Den bioteknologiske rute fra DNA til protein (Læs til og med figur 2.3 om design af cellefabrikker hjemme – trin 1 læses i timen)	Cellefabrikker. Fremstilling af gen ud fra aminosyresekvens.	Arb. Ark: Cellefabrikker – trin 1 til 7	Artikellæsning – Læs og forstå
5	Cellefabrikker: Den bioteknologiske rute fra DNA til protein (Læs trin 2 og 3 om fremstilling af cellefabrikker) Besvar spørgsmål i arbejdsarket	Genregulering, ekspressionsvektor, valg af celletype til cellefabrikken.	Arb. Ark: Cellefabrikker – trin 1 til 7	Artikellæsning – Læs og forstå
<b>Bioinformatikøvelse – Opgave afleveres</b>				
6	Cellefabrikker: Den bioteknologiske rute fra DNA til protein (Læs trin 4 til 7 om fremstilling af cellefabrikker) Besvar spørgsmål i arbejdsarket	Gensplejsning, selektion og dyrkning af cellefabrikker. Oprensning af protein.	Arb. Ark: Cellefabrikker – trin 1 til 7	Artikellæsning – Læs og forstå Rundtur i Det virtuelle Laboratorium
7	Genetisk tuning af cellefabrikker (Læs til "Terminator af transskriptionen")	Genregulering vha. Promotor.	Opsamling på fremstilling af cellefabrikker	Selvevaluering vha. quiz Opsamling på bioinformatikøvelse Hvad kan man spørge om til dagens tekst?
8	Genetisk tuning af cellefabrikker (Læs resten)	Genregulering vha. promotor, ribosombindingssted, terminator og start- og stop-codons. Optimering.		Selvevaluering vha. quiz Hvad kan man spørge om til dagens tekst?
9	Udvikling af hurtigtvirkende insulin (skim) Posterdesign	Aminosyresekvens betydning for insulins kemiske egenskaber.	Fremstilling af posters og oplæg (i grupper)	Formidling og præsentation
<b>Fremstilling af cellefabrikker i Det Virtuelle Laboratorium</b>				
10	Forbered oplæg til postersession		Postersession Opsamling på forløb	Formidling og præsentation

<sup>3</sup> Se notebookfil for diasshow, opgaver, elevprodukter mm.

<sup>4</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>5</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/VirtualRibosome/>

<sup>6</sup> <http://www.uniprot.org/>

<sup>7</sup> <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

<sup>8</sup> <http://www.pymol.org/>

## Insulin

- Besvar spørgsmål 1 og 2 i opgaven "Insulin og arv"<sup>9</sup>.
- Find aminosyresekvensen for præ-pro-insulinet fra menneske (brug sekvensen fra bioinformatikøvelsen) og udfør et "Blast" på Uniprot så du får en liste over de aminosyresekvenser der mest ligner præ-pro-insulinets aminosyresekvens fra menneske. Brug videovejledningen til databaserne<sup>10</sup> til at gennemføre blast.
  - Tabel 1: Udfyld med organisme, Uniprot Access nr, Aminosyresekvens i A- og B-kæde.
  - Tabel 2: Lav parvis sammenligning af aminosyresekvenser fra de seks organismer og vurder
    - Hvilke organismes insulin ligner umiddelbart mest menneske-insulin?
    - Hvilken organismes insulin ligner umiddelbart mindst menneske-insulin?
  - Videovejledningen<sup>11</sup> viser man med GeneBee<sup>12</sup> laver alignment af DNA- eller aminosyresekvenser og får et fylogenetisk træ.
    - Udfør alignment med fylogenetisk træ på dine aminosyresekvenser.
    - Kommenter alignment og diskuter informationerne i det fylogenetisk træ.
    - Stemmer træet overens med dine overvejelser om hvilken organismes insulin der ligner menneske-insulin?

**Tabel 1: Aminosyresekvens i A- og B-kæde fundet på Uniprot**

Organisme	Uniprot access nr	Aminosyresekvens i A-kæde	Aminosyresekvens i B-kæde
Homo sapiens	<a href="#">P01308</a>		
Chimpanze	<a href="#">P30410</a>		
Gris	<a href="#">P01315</a>		
Kanin	<a href="#">P01311</a>		
Hund	<a href="#">P01321</a>		
Hamster	<a href="#">P01313</a>		

**Tabel 2: Parvis sammenligning af forskelle i A- og B-kæde**

Sammenlign aminosyresekvenserne to og to så du kan se hvor mange forskelle der er mellem organismerne.

	Homo sapiens	Chimpanze	Gris	Kanin	Hund	Hamster
Homo sapiens	-	-	-	-	-	-
Chimpanze		-	-	-	-	-
Gris			-	-	-	-
Kanin				-	-	-
Hund					-	-
Hamster						-

<sup>9</sup> <http://www.vire.dk/frykman/opgaver/2006-vejledende/3-insulin%20og%20arv%202006-2vejl.pdf>

<sup>10</sup> <http://www.youtube.com/watch?v=r-lhoVhzs6s&feature=related>

<sup>11</sup> <http://www.youtube.com/watch?v=WOkPVQa2oro&feature=related> Der er nogle fejl i videoen, og alignment er ikke korrekt. Der bør laves en ny videovejledning hvor alignment er korrekt.

<sup>12</sup> [http://www.genebee.msu.su/services/malign\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html) alternativt [http://www.genebee.msu.su/services/phtree\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html)