

Elevvejledning til det Virtuelle Kræftlaboratorium

Det Virtuelle Kræftlaboratorium stiller krav til en grundig forståelse af det centrale dogme inden for molekylærbiologien, hvordan DNA oversættes til mRNA, proteiners opbygning og brugen af statistisk t-test.

Formål

Formålet med øvelsen er følgende fire punkter:

- at du trænes i at genkende aminosyrer i en simpel proteinstruktur (pentapeptid = lille protein bestående af 5 (penta) aminosyrer)
- at du trænes i at oversætte DNA til dens komplementære mRNA sekvens
- at du/I foretager en simpel t-test baseret på et gennemsnit
- at diskutere, hvorledes onkogene og tumorsuppresorgener bliver udtrykt i en kræftcelle vi forhold til en normalcelle.

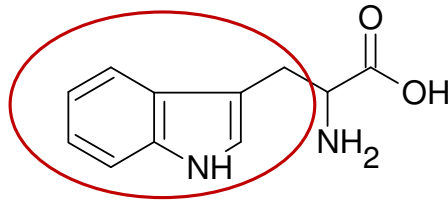
I det følgende gives der vejledning til de dele af øvelsen, som stiller krav til ovenstående punkter.

Proteinstrukturer

The screenshot shows a virtual lab interface. On the left, there are two peptide structures. The top one is a pentapeptide with side chains: methyl, isopropyl, indolyl, p-hydroxybenzyl, and hydroxymethyl. Below it are five empty boxes for labeling. The bottom peptide is a hexapeptide with side chains: imidazolyl, prolyl, methyl, propionyl, and cysteamine. Below it are six empty boxes for labeling. On the right, a panel titled 'Aminosyrer:' lists four amino acids with their structures: Alanin - ala, Arginin - arg, Aspargin - asn, and Asparginsyre - asp. A play button is visible in the top right of the panel. At the bottom, a text box contains the instruction: 'Du skal nu oversætte strukturformlerne for de 6 peptider til deres aminosyrers 3-bogstavsforkortelser.' A small 3D model of a person is visible in the bottom right corner.

Her skal du kunne genkende hvilke aminosyrer, der indgår i hvert pentapeptid. Det kan anbefales, at man har gjort sig bekendt med, hvordan en peptidbinding ser ud. Desuden anbefales det at kigge grundigt på

aminosyrernes sidegrupper, da det ofte er denne som "afslører" hvilken aminosyrer, som indgår. Fx er tryptophan (trp) meget let genkendelig pga. dens store aromatiske sidegruppe:



Der gøres opmærksom på, at hhv. bindinger, som er stiplede eller fede, kun markerer, om bindingen går "indad" (stiplet) eller "udad" (fed). Ofte opskrives strukturer således for at angive den såkaldte stereokemi (den præcise placering af atomer i et molekyle) og for at give 2D billedet en forsimplet 3D-struktur. I øvrigt benyttes hhv. stiplede og fede bindinger som hovedregel til sidegruppen i en aminosyre!

Hvis du kigger på det første pentapeptid (se billede ovenfor) vil du se, at den første stiplede binding har en CH₃-gruppe i den ene ende. Dette vil sige, at denne CH₃-gruppe er den første aminosyrers sidegruppe. Det ses i tabellen til højre i billedet, at den aminosyre, som passer med denne sidegruppe er Alanin (ala). Du skal ikke tage dig af, at aminosyrerne i tabellen ikke indeholder stiplede og fede bindinger. Dette skyldes, at tabellen er en forsimplet udgave.

Det kan evt. anbefales, at i arbejder i grupper, som tager sig af forskellige pentapeptider, således at I ikke behøver løse alle strukturer selv.

mRNA sekvenser

1	DNA	COCGGTAATATAOCGGACCTTA	9	DNA	CTGGGCCAGCAGTAGTTGAAG	
	mRNA	<input type="text"/>		mRNA	GACCCGGUGUCAUCAACUUGC	✓
2	DNA	GGTACGTTACCGATTGGCA	10	DNA	AATTGGCCCGCGCATTATCGC	Husk:
	mRNA	<input type="text"/>		mRNA	UUAAACCCGGGCGGUAAUAAGC	✓
3	DNA	ATCATTACTATCATTACTATC	11	DNA	ATCTACCCGTCGCGTCGGCAA	A parrer med U
	mRNA	<input type="text"/>		mRNA	UAGAUGGCCAGCGCAGCCGUU	G parrer med C
4	DNA	AAGTTTATTTGGCTGTCCATCC	12	DNA	ATTGCAAGACACTATGACGT	C parrer med G
	mRNA	UUCAAATUAAAOCGACGGUAGG		mRNA	UAACGUUCUCGUGAUACUGCA	T parrer med A
5	DNA	TCACTGACACCTGACCTAAG	13	DNA	CGGCAGTGGCAGGATGATC	
	mRNA	AGUGACUGUGGACUGGAIUC		mRNA	GCCGUACCGGUCCUAUCUCAG	✓
6	DNA	TCGTAATACCATGCCGAAACGGT	14	DNA	GGCCATTGCTGACTACGTAT	✓
	mRNA	AGCAUUUUGGUACGGCUUGCCA		mRNA	CCGGUAAAGCACAUCGAUGCAUA	✓
7	DNA	CACTGAATCTTACCATAGCT	15	DNA	TTAGTGCATGACGTGACTGGAT	✓
	mRNA	GUGACUUAGA AUGGUATCGA		mRNA	AAUCACGUACUGCACUGACCCUA	✓
8	DNA	COGAAATTGGCCAGCGTTCAGC	16	DNA	CACGGTGTTTTTAAACGAAACCG	✓
	mRNA	GCCUUUAAACCGGUCGCAAGUGC		mRNA	GUGCCACAAAAUUUGCUUGGC	✓

Oversæt nu de angivne DNA-sekvenser til komplementær mRNA.

I denne del af øvelsen skal du skrive mRNA sekvensen under DNA sekvensen. Det er værd at huske, at A parrer med U, G parrer med C, C parrer med G og T parrer med A.

Udvælgelse af mRNA sekvenser

1 mRNA GGGCCAUUAUUGCCUGGAU

2 mRNA CCUAUGCAAUGGCUAACGCGU

3 mRNA UAGUAAUGAUAGUAAUGUAG

4 mRNA UUCAAAUAAACCGACAGGUAGG

5 mRNA AGUGACUGUGGACUGGAUUC

6 mRNA AGCAUUAUGGUACGGCUUGCCA

7 mRNA GUGACUUAGAAUGGUAUCGA

8 mRNA GCCUUUAACGCGUCGCAAGUCG

9 mRNA GACCCGUCGUCAUCAACUUGC

10 mRNA UUAACCCGGCGCGUAAUAGCG

11 mRNA UAGAUGGCGAGCGAGCCGUU

12 mRNA UAACGUUCUCGUGAUACUGCA

13 mRNA GCCGUCACGCGUCCUACUCAG

14 mRNA CCGGUAAGCACAUCAUGCAUA

15 mRNA AAUCACGUACUGCACUGACCCUA

16 mRNA GUGCCACAAAUUUGCUUGGC

Den genetiske kode

		Anden position							
		U		C		A		G	
Første position	kode	Amino		kode	Amino		kode	Amino	
		U	UUU		phe	UCU			UAU
U	UUC		UCC		UAC		UGC		
	UUA		UCA	ser	UAA	STOP	UGA	STOP	
	UUG	leu	UCG		UAG	STOP	UGG	trp	
C	CUU		CCU		CAU	his	CGU		
	CUC		CCC		CAC		CGC		
	CUA	leu	CCA	pro	CAA		CGA	arg	
	CUG		CCG		CAG	gin	CGG		
A	AUU		ACU		AAU	asn	AGU	ser	
	AUC	ile	ACC		AAC		AGC		
	AUA		ACA	thr	AAA		AGA		
	AUG	met	ACG		AAG	lys	AGG	arg	
G	GUU		GCU		GAU	asp	GGU		
	GUC		GCC		GAC		GGC		
	GUA	val	GCA	ala	GAA		GGA	gly	
	GUG		GCG		GAG	glu	GGG		

De 6 pentapeptider

1: ala-leu-trp-tyr-gly
 2: his-pro-ala-his-cys
 3: met-asp-ser-gin-ile
 4: phe-lys-asn-thr-val
 5: phe-asn-tyr-cys-trp
 6: asp-gly-gin-arg-ser

Vælg nu de 9 sekvenser, som du vil have på din mikrochip. 6 af sekvenserne koder for de tidligere signalpeptider. Du kan bruge den genetiske kode til at oversætte mRNA-sekvenserne til aminosyrerækker. Husk at en mRNA-sekvens skal aflæses fra 5'-enden mod 3'-enden, samt at aflæsningen ikke behøver starte fra det første bogstav.

Her skal du ud fra den genetiske kode udvælge de sekvenser, som koder for de 6 pentapeptider. Du skal huske, at sekvensen ikke behøver starte fra det første bogstav, og at sekvensen godt kan være skrevet bagfra. Fx kan følgende mRNA-sekvens på 10 nukleotider blive læst på 6 forskellige måder:

AAUUCGUACA:

3 forfra:

1 måde: AAU-UCG-UAC (sidste A koder ikke for noget) = ans-ser-tyr

2 måde: AUU-CGU-ACA (første A koder ikke for noget) = ile-arg-thr

3 måde: UUC-GUA (første to A'er og sidste A koder ikke for noget) = phe-val

3 bagfra:

4 måde: CAU-GCU-UAA (sidste A koder ikke for noget) = his-ala-stop

5 måde: ACA-UGC-UUA (første A koder ikke for noget) = thr-cys-leu

6 måde: AUG-CUU (første to A'er og sidste A koder ikke for noget) = met-leu

Det er nødvendigt at teste alle de 18 sekvenser for at være helt sikker. Det kan stærkt anbefales at i som elever opdeler dette arbejde mellem jer, da det kan være ret tidskrævende.

Hint:

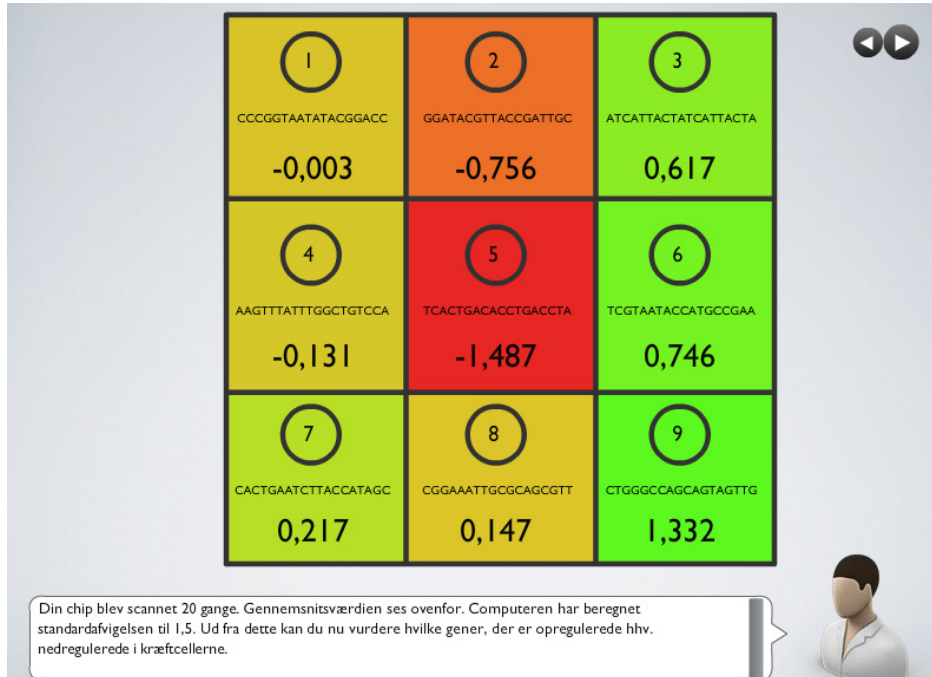
Sekvens nr. 16 kan aflæses **bagfra** fra det **8. nukleotid**. Herved vil det opdages, at denne sekvens koder for protein nr. 4

3'-GUGCCACAAAAUUUGCUUGGC-5'

← læserejning

Val- thr-asn-lys- phe (protein 4 læst bagfra)

Analyse



I analysen skal det afgøres, om et gen er opreguleret eller nedreguleret i kræftcellen med 95 % sikkerhed. Dette gøres ved at udføre en simpel t-test for et gennemsnit på måleværdien. Nulhypotesen er, at der ikke er nogen forskel på kræftcellen og den raske celle. Det kan være en hjælp at følge nedenstående trin:

1. Gør dig klart hvilken værdi nulhypotesen har (H_0)
2. Hvad er gennemsnitsværdien (X)?
3. Hvad er standardafvigelsen (S)?
4. Hvor mange gange (N) er forsøget blevet kørt?
5. Beregn t-værdien vha. Ligning 3.1 i *Statistik i biologien*
6. Hvilken t_{α} -værdi fra t-tabellen skal der sammenlignes med (hvad er v og hvad er α)?
7. Konklusion: Kan der siges noget med 95% sikkerhed? Hvis ja, hvad kan der så siges?

Diskussion

I diskussionen bør I komme ind på følgende punkter:

- Hvilke af de testede gener er opregulerede/nedregulerede i kræftceller
- Hvilke gener kan være onkogener, og hvilke kan være tumor-suppressor gener
- Hvor tager Tue Fast og Ove R. Setendel's model fejl, og hvor har den sandsynligvis ret

Den ekstra gode diskussion

En rigtig god diskussion kunne også komme ind på eksempler på relevante onkogener og tumor suppressorgener, som er beskrevet i projektets litteraturafsnit. Fx kunne det diskuteres, om ændringer i disse geners udtryk ville kunne ses i et DNA mikroarray eksperiment (dette er nemlig ikke altid tilfældet). Hvad ville der fx ske, hvis det stykke DNA, som kodede for et gen kun blev ændret meget lidt (men et essentielt sted), således at mRNA'ets cDNA stadig ville kunne binde sig til chippen, men at det protein, som mRNA'et ville blive transkriberet til ville være ufunktionelt?

Desuden er det også tænkeligt, at nogle gener i en kræftcelle vil blive muteret, uden at dette egentligt har noget med kræftudviklingen at gøre. Dette skyldes, at kræftceller ofte ophober mange mutationer, hvorfor det fx kunne tænkes, at en celle, som normalt producerede et fordøjelsesenzym, ville miste denne funktion, når den blev til en kræftcelle – uden at fordøjelsesenzymet i sig selv har noget med kræft at gøre.