

▮ Eksamensinformasjon

Eksamen i ERN4300
19. desember kl. 09:00 – 11:00.

Hver oppgave teller like mye

Oppgavesettet består av 6 oppgaver.

Gjennomsnittlig tidsbruk per oppgave er 20 minutter.

1 Kunnskapsoppsummering

Oppgave 1 (Svar kort, 1-3 setninger per deloppgave) (Totalt 6 poeng)

- A. Beskriv kort innholdet i «Kvalitetssystemet for medisinsk og helsefaglig forskning» ved UiO. (2p)
- B. Medisinske journaler har laget retningslinjer for rapportering av forskningsresultater. Beskriv hvor man finner disse retningslinjene, og noen hovedpunkter i retningslinjene. (1,5p)
- C. Beskriv hovedinnholdet i Vancouverkonvensjonen. (1,5p)
- D. Hva er Helseforskningsloven? (1p)

Skriv ditt svar her

A

- UiO har et eget regelverk som alle ansatte/studenter må følge
- Sikre at forskning planlegges, gjennomføres, rapporteres og avsluttes slik at etiske, medisinske, helsefaglige, vitenskapelige og personvernmessige forhold ivaretas
- Sikre at forskningen holder en faglig forsvarlig standard
- Inneholder en rekke nyttige verktøy for å ivareta helseforskningsloven og interne retningslinjer.

(0,5p hver, maks 2p)

B

- EQUATOR network (website): internasjonalt initiativ for å forbedre kvalitet i medisinsk og helsefaglig forskningslitteratur - fremme transparent og nøyaktig rapportering
- En rekke standardiserte retningslinjer for planlegging, gjennomføring og rapportering av studier innenfor ulike disipliner.
- Alle RCT'er bør følge CONSORT kravene

(0,5p hver, maks 1,5p)

C

- Beskriver krav til manuskripter som innsendes til medisinske journaler. Definerer også krav til forfatterskap, medforfatteransvar, etiske hensyn ved publisering, redaktøransvar og innhold i manuskripter (1,5p)

D

- Helseforskningsloven regulerer medisinsk og helsefaglig forskning på mennesker, humant biologisk materiale og helseopplysninger i Norge (1p)

Maks poeng: 6

2 Kunnskapsoppsummering

Oppgave 2 (Svar kort, 2-5 setninger per deloppgave) (Totalt 6 poeng)

- A. Hva er hensikten med en «wash-out» periode mellom to intervensjoner i et klinisk forsøk? (1p)
- B. Hvilket forsøksdesign regnes normalt som en «gullstandard» i kliniske forsøk hvor man skal undersøke om en behandling virker? Forklar hovedprinsippene ved dette forsøksdesignet. (2p)
- C. Hvilke forsøkstyper benyttes normalt i systematiske kunnskapsoppsummeringer om kostholdets betydning for forebygging av livsstilssykdommer? (3p)

Skriv ditt svar her

A

- Skal redusere carry-over effekter fra forrige intervensjonsperiode. (1p)

B

- Randomisert kontrollert studie (RCT)
- Randomisering til to eller flere grupper
- Inkluderer kontrollgruppe
- Placebo hvis mulig
- Dobbel blinding hvis mulig

(0,5p hver maks 2p)

C

Man gjør en helhetlig kunnskapsoppsummering hvor alle tre følgende studietyper normalt inngår:

- Epidemiologiske studier, spesielt prospektive studier
- Mekanistiske forsøk (celle og dyreforskning)
- Kliniske forsøk, spesielt, relativt korte RCT med biomarkører som endepunkt, eller med risikopersoner med harde endepunkt

RCT

(1p hver maks 3p)

Maks poeng: 6

3 Metoder - dyr

Oppgave 3: Musemodeller (Svar kort, 2-5 setninger per deloppgave) (Totalt 6 poeng)

- Beskriv fenotypen til ob/ob og db/db mus og hvilken tilstand de er egnet til å studere (1p)
- Hvilken medikamentell behandling kan kompensere for "loss of function" i henholdsvis ob og db genene (individer med ob/ob eller db/db)? (1p)
- Foreslå en annen egnet modell som erstatning for disse to «loss of function» modellene? (1p)
- Foreslå to musemodeller som er egnet til å studere aterosklerose, hvorav den ene er en "loss of function" modell mens den andre er en "gain of function" modell. (1p)
- Hvilken "loss of function" modell er best egnet til å studere utvikling av aterosklerose hos mennesker? Begrunn svaret. (2p)

Skriv ditt svar her

- Ob/ob mus has en mutasjon i leptin genet (ob), db/db mus har en mutasjon i leptinreseptor genet (0,5p). Mangel på leptin-signalling gjør at begge modellene mangler metthets-signal og vil overspise. Modellene er dermed gode modeller for overvekt/overspising (0,5 p).*
- Mutasjon i leptin genet (ob) kan behandles med injeksjon av hormonet leptin. Med korrekt dose vil musen få normal fenotype. Mutasjon i leptin reseptor (db) kan i realiteten ikke behandles (1p).*
- Ulike modeller som genererer overvekt vil kunne erstatte modellene over. Det forventes at studenten trekker frem energirik diett med høyt fettinnhold (ofte 60E% fra fett, for det meste mettet fett) (1 poeng). Det finnes andre genetisk modeller som medfører overvekt (ble ikke undervist) (1p)*
- «Loss of function» Ldlr^{-/-} og ApoE^{-/-}. Enkelte studenter kan tenkes å nevne kombinasjon av ApoE^{-/-} og Ldlr^{-/-}, eller overuttrykk av ApoE3-Leiden i en ApoE^{-/-} bakgrunn. (0,5p)
«Gain of function» overuttrykk av mutert Pcsk9 (0,5p)*
- Ldlr^{-/-} mus mimikere bedre utvikling av aterosklerose hos mennesker. Delesjon av ApoE og Ldlr gir opphopning av ulike lipoproteiner i sirkulasjonen. Hos mennesker skyldes aterosklerose (overordnet) forhøyede nivåer av LDL og opphopning av LDL i karveggen. Mutasjon i Ldlr^{-/-} fører til redusert opptak av LDL, og mimikerer dermed bedre sykdomsforløpet hos mennesker. ApoE finnes på VLDL og IDL partikler, men ikke på LDL partikkelen. I ApoE^{-/-} mus hoper VLDL og IDL seg opp i sirkulasjonen. Selv om dette fremmer utvikling av aterosklerose er de molekylære trinnene involvert ulike. (2p)*

Maks poeng: 6

4 Metoder - Lab

Oppgave 4 (Totalt 6 poeng)

En av metodene som ble brukt under de praktiske laboratorieforsøkene, var en enzytbundet immunosorbentanalyse (ELISA) for å detektere blant annet plasma cytokin nivåer for eksempel IL-4.

A. Beskriv hvordan du skal gjøre et ELISA-eksperiment for å finne ut konsentrasjonen av IL-4 i en plasmaprøve. (5p)

B. Etter å ha målt dine fortynnede plasmaprøver, og etter korreksjon for fortynningsfaktoren, var konsentrasjonen av IL-4 i prøver som ble fortynnet 25x lavere sammenlignet med prøvene som ble fortynnet 100x. Hvis du antar at du pipetterte nøyaktig, hva er den mest sannsynlige forklaringen på disse forskjellene? (1p)

Skriv ditt svar her

A

96-brønners plater er forhåndsbelagt med et antistoff som gjenkjenner IL-4. Analysen krever et fangeantistoff og et deteksjonsantistoff som gjenkjenner målproteinet eller cytokinet. To antistoffer gjenkjenner det same proteinet, MEN binder seg til forskjellige deler av det proteinet.

Plasmaprøver og standardkurve med kjent mengde IL-4 legges til platen og inkuberes – fangeantistoff binder IL-4

Platene vaskes og et sekundære antistoff, deteksjonsantistoffet, tilsettes og binder seg til IL4 og inkuberes. Det er mulig at en streptavidin-koblet HRP også legges til reaksjonen ELLER at deteksjonsantistoffet er fusjonert til HRP –eller et annet enzym. Dette er avgjørende for å oppdage proteinet.

Etter vasking tilsettes en substratløsning (vanligvis tetrametylbenzidin (TMB) – kun forkortelsen er tillat)) og inkuberes. Reaksjonen stoppes ved tilsetning av syre (H₂SO₄ (svovelsyre)) som får fargen til å endre seg fra blå til gul.

Absorbansen måles ved nm 450 for gul farge (kan korrigere for 570 nm)

Konsentrasjonen av mengden IL-4 i plasmaet kan bestemmes fra standardkurven ved å finne x ved å bruke $y=ax+b$

(1 p hver) maks 5 pt total

B.

Prøver som ble fortynnet 25x ble ikke fortynnet nok. Mengden IL4 var for høy og målt utenfor det lineære området til standardlinjen/kurven, noe som resulterte i en underestimert IL6-konsentrasjon i prøven. (1p)

Maks poeng: 6

5 Metoder -Lab

Oppgave 5 (Totalt 6 poeng).

Analyser av blodplasma eller perifere mononukleære blodceller (PBMC) brukes til å overvåke betennelse i mange kliniske studier. Nukleær faktor kappa B (NFkB), transkripsjonsfaktorer, p50 og p65, fungerer for å regulere betennelse i immunceller. Aktivering av p50/p65 heterodimerkompleks resulterer i økning i RNA-ekspresjonsnivåer av mange gener, inkludert Cxcl10. Disse endringene i RNA-nivåer kan vises ved kvantitativ sanntids-PCR (qPCR).

A Hva er de mest tallrike celletypene isolert i et PBMC-preparat? (1p)

B Forklar en eksperimentell prosedyre som du vil bruke for å isolere rensset RNA fra et frossent PBMC-preparat. (3p)

C Cxcl10 mRNA er transkribert fra et gen som er sammensatt av 6 eksoner. Beskriv hvordan du vil designe et qPCR-primerpar for å amplifisere Cxcl10 mRNA med TaqMan-basert PCR. (2p)

Skriv ditt svar her

A

Lymfocytter og monocytter (1 pt), kan også nevnes CD4+ og CD8+ T-celler, B-celler, NK-celler, monocytter og tidvis granulocytter (0,5 pt) (maks 1 pt total)

B

Tilsett RNA-lyseringsbuffer til cellepelletten og et likt volum 70 % etanol – Bland godt

Overfør til RNA-spinnkolonne og sentrifuger 1 min full hastighet

Vask med lav stringens buffer og sentrifuger 1 min full hastighet

Inkuber med DNase I i 10-15 minutter

Vask med høy stringens buffer og Sentrifuger/sentrifuger 1 min full hastighet

Vask med lav stringens buffer og Sentrifuger/sentrifuger 2 min full hastighet

Eluer/separerer rensset RNA fra kolonnen inn i et friskt rør

(0,5p maks 3p)

C

Primere bør designes over en «exon-exon boundary». En av primerne skal være i ett ekson (forward primer) og den andre (revers primer) skal være i neste ekson (dvs. forward primer i ekson 1 og revers primer i ekson 2). Dette er nødvendig for å redusere mulig kontaminering fra genomisk DNA under RNA-isoleringen. (1 p). TaqMan proben bør være utformet mot en sekvens i amplikonet og ideelt sett ved grensen mellom eksonene. Det er tilstrekkelig at studenten nevner at proben må gjenkjenne en sekvens i amplikonet som genereres fra primerne (0, 5p). Amplikonet skal være omtrent 70–300 bp (en verdi i det området) (0,5 p)

Maks poeng: 6

6 CRISPR

Oppgave 6 (Totalt 6 poeng)

Proteinet nukleær faktor kappa B (NFkB) transkripsjonsfaktorer, p50 er en viktig regulator av inflammasjon. Som en del av ditt masterprosjekt har du blitt spurt om å lage en human macrofage cellelinje hvor p50 genet slettes ved bruk av genredigeringsverktøyet Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic repeats, CRISPR-Cas9.

A. Hva er genredigering og gi en eksemple på andre metoder enn CRISPR Cas9 som kan brukes til genredigering? (2p)

B. Hva er ulempene med CRISPR Cas9-systemet? (1,5p)

C. Forklar hvordan du vil designe og utføre et CRISPR-Cas9-eksperiment for å generere en human makrofagcellelinje som ikke uttrykker p50. (3p)

Skriv ditt svar her

A

Målrettet endring av DNA-sekvensen "in situ"

Binder til spesifikke gensekvenser og kutter eller redigerer i DNA (0,5 p)

Nukleaser eller baseendrende (0,5 p)

Målrettet mutagenese (0,5 p) kunne navne også rettelse av "genfeil" eller

Insertjon av gener

Meganuclease, Zinc finger nuclease (ZFN), TALENs (0,5 pt hver maks 0,5 p)

(Maks 2p total)

B

Cas9 aktivitet, Leveringsmetoder, Forekomst av HDR, Effekter utenfor målet, sgRNA-design

(0,5p hver) maks 1,5p

C

Transfekte CRISPR sgRNA and Cas9 either as plamids, renset RNA og/eller protein. gRNA eller sgRNA består av 17-20 nukleotider og et 5-NGG-3 protospacer adapter motiv (PAM) (1p).

CRISPR-Cas9 binder seg til stedet av interesse basert på gRNA og forårsaker et brudd i dobbeltråd DNA nær PAM-stedet (0,5p).

På grunn av feiltilbøyelige ikke-homologe endesammenføyninger (NHEJ – forkortelsen er greit) kan det forekomme innsettinger eller slettinger i DNA-sekvensen (1p).

Disse kan føre til rammeskift (endret proteinsekvens) som fører til et for tidlig stoppkodon (0,5p).

Maks poeng: 6