

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

Hver oppgave teller like mye

Oppgavesettet består av 6 oppgaver.

Gjennomsnittlig tidsbruk per oppgave er 20 minutter.

1 Svar kort, 1-4 setninger per deloppgave

1. Hva er hensikten med en «run-in» periode i et klinisk forsøk?
2. Hvilket forsøksdesign regnes som en «gullstandard» i kliniske forsøk hvor man skal undersøke om en behandling virker? Forklar hovedprinsippene ved dette forsøksdesignet.
3. Hvilke forsøksstyper benytter man i systematiske kunnskapsoppsummeringer om kostholdets betydning for forebygging av livsstilssykdommer?

Skriv ditt svar her

A-

- - *Skal redusere variasjon mellom forsøksdeltagere ved baseline. (1 poeng)*

B-

- - *Randomisert kontrollert studie (RCT)*
 - *Randomisering til to eller flere grupper*
 - *Kontrollgruppe*
 - *Placebo hvis mulig*
 - *Blinding hvis mulig*

(0.5 hver max 2 poeng)

C-

- - *Mekanistiske forsøk (celle og dyreforskning)*
 - *Epidemiologiske studier, spesielt prospektive*
 - *Kliniske forsøk, spesielt*
 1. *relativt korte RCT med biomarkører som endepunkt, eller*
 2. *RCT med høyrisikopersoner med harde endepunk*

(3 poeng)

Maks poeng: 6

- 2 Medisinske journaler har laget retningslinjer for rapportering av forskningsresultater. Beskriv hvor man finner disse retningslinjene, og noen hovedpunkter i retningslinjene.

Skriv ditt svar her

- EQUATOR network (websiteside): internasjonalt initiativ for å forbedre kvalitet i medisinsk og helsefaglig forskningslitteratur - fremme transparent og nøyaktig rapportering (2poeng)
- En rekke standardiserte retningslinjer for planlegging, gjennomføring og rapportering av studier innenfor ulike disipliner. (2poeng)
- Alle RCT'er bør følge CONSORT kravene (2poeng)

Maks poeng: 6

3 Beskriv kravene til føring av laboratoriejournal ved UiO. Beskriv også hvorfor laboratoriejournal er viktig, og hva den brukes til?

Skriv ditt svar her

Krav

- Obligatorisk ”hardcopy” journal
- Fullstendig og konsis – gjerne kort - henvisning til elektronisk medier (URL, databasefiler, etc). Biologisk materiale må merkes/dateres , være identifiserbart/ entydig. Metode, utstyr, materiale beskrives entydig, nøyaktig. Evt.henvis til SOP (Standard Operating Procedure). Hvis ikke, fullstendig metodebeskrivelse inkluderes. Beskriv alle avvik fra skriftlig prosedyre.
- Permanent blekk, ikke blyant. Gjerne flere farger
- Fjern aldri sider. Sett strek over og før på initialer og dato. Korreksjoner beskrives, henvises
- UiOs eiendom - må innleveres etter bruk, oppbevares i minst ti år
- Personlig - føres av én person

1 poeng hver, maks 4 poeng)

Hvorfor og hva den kan brukes til

- Føres slik at andre kan gjenta forsøkene
- Dokumentere for publisering
- Grunnlag for patenter

1 poeng hver, maks 2 poeng

Total 6 poeng

Maks poeng: 6

- 4 Proteinet arylhydrokarbon reseptor (AHR) er en transkripsjonsfaktor og er en viktig regulator av inflammasjon. Som en del av ditt masterprosjekt har du blitt spurt om å lage en human macrofage cellelinje hvor AHR genet slettes ved bruk av genredigeringsverktøyet Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic repeats (CRISPR)/Cas9.

A. Forklar kort hva CRISPR/Cas9-systemet består av.

B. Forklar hvordan CRISPR/Cas9-kan brukes til å sette inn eller korrigere et punkt mutasjon i et gen.

Skriv ditt svar her

A. CRISPR-Cas9 originates from bacteria where it functions to protect the bacteria from foreign DNA, but recognizing foreign DNA from a previous infection and cleaving or cutting it. Cas9 is an RNA-dependent nuclease that cleaves DNA. Where it cleaves DNA depends on the sequence of the guideRNA (gRNA). (1 poeng)
The gRNA or sgRNA consists of 17-20 nucleotides and a 5-NGG-3 protospacer adaptor motif (PAM). CRISPR-Cas9 binds to the site of interest based on the gRNA and causes a double strand DNA break near the PAM site. (2 poeng)

B. Due to error prone non-homologous end joining (NHEJ – abbreviation is fine) insertions or deletions in DNA sequence might occur. These can lead to frame shifts (altered protein sequence) leading to a premature stop codon (2 poeng). When two gRNAs are used, the sequence in between them is removed and the DNA ligated back together. This method is used to remove large stretches of DNA and also to create genetically modified mouse or other animal models. Mutations need to be verified by sequencing to confirm mutation. (1 poeng)

Maks poeng: 6

- 5 En av metodene som ble brukt under de praktiske laboratorieforsøkene, var en «sandwich»-enzymbundet immunosorbentanalyse (ELISA) for å detektere blant annet plasma cytokin nivåer.

A. Forklar kort prinsippet bak en sandwich-ELISA.

B. Beskriv hvordan et sandwich-ELISA-eksperiment gjøres for å finne ut konsentrasjonen av IL-6 i en plasmaprøve.

Skriv ditt svar her

A. Sensurveiledning:

- the assay requires a capture antibody and a detection antibody that recognize the target protein or in this cytokine.
- The protein is sandwiched between the two antibodies, hence its name
- A secondary antibody or streptavidin-biotin linked to horseradish peroxidase (HRP), or similar detection enzyme is needed to detect the signal

(3 poeng)

B. Sensurveiledning:

- the capture antibody is coated on to 96 well plates or the equivalent, and washed
- the plasma sample and standard curve of known amount of IL-6 are added and incubated – capture antibody binds IL-6
- plates are washed and the detection antibody the recognize IL-6 is added and incubated.
- After washing, streptavidin-linked HRP is added to the plate and incubated
- After washing a substrate solution (Tetramethylbenzidine TMB) is added and incubated. The reaction is stopped by addition of H₂SO₄ (sulfuric acid) changing the color from blue to yellow. The absorbance is determined at nm 450. The concentration of IL-6 can be determined from the standard curve.
- Solve for unknown concentration after plotting the data preferably log-log solve by linear regression.

(0.5 poeng hver, 3 poeng)

Maks poeng: 6

- 6 Proteinet lever X reseptor (LXR) er en transkripsjonsfaktor som binder seg til spesifikke DNA-sekvenser som heterodimer med retinoid X reseptor (RXR). Kolesterolmetabolitter, spesielt oksykolesterol A, i plankton og andre marin organismer er vist å være ligand for LXR og aktiverer proteinet. Du fremsetter en hypotese om at LXR regulerer genuttrykket av SREBP1 gen.

Beskriv i detalj hvordan du eksperimentelt ville gått frem for å undersøke om LXR under påvirkning av oksykolesterol A regulerer SREBP1-promotoren i reporter genanalyse i en HEK293-cellelinje som uttrykker RXR men ikke LXR. Beskriv de forventede resultatene.

Skriv ditt svar her

- One needs to first create the different plasmids that are required for the experiment. They will need to create a plasmid for the expression of LXR, and the SREBP1 reporter gene plasmid that consists of the SREBP1 promoter region cloned upstream of the luciferase reporter gene. (2 poeng)
- One does not need to make a plasmid expressing RXR, since RXR is expressed in these cells. They should mention that the plasmids are created using PCR and molecular cloning, and that they need to be transfected into HEK293 cells. (2 poeng)
- Cells should be transfected with (1) reporter gene alone, (2) reporter gene and LXR alone. After transfection the cells will need to be treated with oksykolesterol A or solvent (i.e. DMSO) – the amount of time does not need to be specified. (2 poeng)
- Increased SREBP1 reported gene activity as measured by luciferase is measured by determining reporter gene activity or luciferase activity. Expected results, little to no or little reporter gene activity for condition (1), but a significant increase in reporter gene activity (luciferase activity) should be observed in condition (2); however, only in the presence of oksykolesterol A. (2 poeng)

6 poeng (maks)

Maks poeng: 6