

Alexanders sjukdom drabbar hjärnan (A). Proteinet GFAP (gliafibrillärt surt protein) uttrycks normalt i flera delar av hjärnan (B) i olika typer av stödjeceller, gliaceller (C). GFAP-proteiner är långsmala fiberproteiner (D). Bildmaterial från Human Protein Atlas v21.1.proteinatlas.org: [proteinstruktur för GFAP](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131095-GFAP), uttryck av [GFAP i kroppen](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131095-GFAP) och [GFAP i hjärnan](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131095-GFAP). Bild på gliaceller: Holly Fischer, [CC BY 3.0](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glial_cells_(astrocytes).png), via Wikimedia Commons.

Alexanders sjukdom

En läkare har fem vuxna patienter som alla har svårt att svälja och det går inte att förklara varför. För att utesluta att det beror på Alexanders sjukdom har läkaren skickat in DNA-prover från alla patienter för genetisk analys. Din uppgift blir att analysera sekvenserna och att dra slutsatser om det finns några problematiska mutationer.

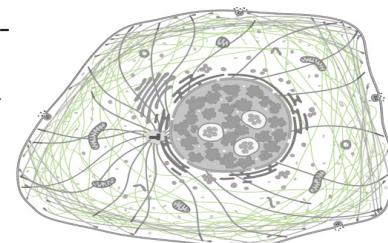
Bakgrund

Sjukdomar som orsakas av mutationer i en enda gen kallas monogena sjukdomar. De kan bero på mutationer i genens proteinkodande sekvens eller i de regulatoriska sekvenser som styr hur mycket och när genen uttrycks. Forskare har kartlagt många monogena förändringar (mutationer), men de flesta är mycket ovanliga, som den som orsakar Alexanders sjukdom.

Vanliga symptom är muskelsvaghet och svårigheter att tala och svälja. Orsaken är att stödjeceller i hjärnan som kallas astrocyter (en typ av gliaceller) fungerar sämre. De kan då inte ge nervcellerna tillräckligt med näringsämnen och skydd mot skadliga ämnen. Utan fungerande astrocyter är hjärnan mycket sårbar.

Problemen inne i astrocyterna beror på förändringar i deras cellskelett. Mer specifikt är det förändringar i ett protein i de intermediära filamenten som är problemet. Proteinets heter gliafibrillärt surt protein och förkortas GFAP (se bild överst på sidan).

Mutationer i GFAP-genens proteinkodande delar kan i vissa fall ändra proteinernas form och kemiska egenskaper. Detta kan i sin tur förändra cellskelettet och även göra att GFAP lättare klumpar ihop sig, även med andra proteiner i cellen. Ett förändrat cellskelett och ansamlingar av proteinklumpar i astrocyterna är det som orsakar sjukdomen.



En schematisk skiss av en cell där gröna streck motsvarar förekomst av proteinet GFAP i cellskelettets intermediära filament.

Från Human Protein Atlas v21.1.proteinatlas.org <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131095-GFAP/subcellular>

Uppgift

De fem vuxna patienterna har lämnat DNA-prover som skickats iväg till ett laboratorium som utfört DNA-sekvensering. Eftersom Alexanders sjukdom orsakas av mutationer som ger effekt på ett protein har man översatt DNA-sekvensen till aminosyrasekvenser. Här nedanför ser du aminosyrasekvenserna för det normala GFP-proteinet och för de fem patienterna. Varje bokstav motsvarar en aminosyra.

Din uppgift är att **identifiera eventuella mutationer** som kan tänkas påverka proteinets struktur och därmed funktion.

Till din hjälp finns ett bioinformatiskt verktyg, **ClustalOmega**, som kan användas för att jämföra sekvenser. Metoden för sekvensanalys beskrivs på nästa sida.

Som stöd för din analys finns ett antal deluppgifter. Sammanställ svar om patienternas eventuella mutationer i **tabellen på sidan 5** (eller rita en egen tabell).

Patient	Positioner för en mutation (angiv position eller "0" för ingen mutation)	Mutation (ange substitution för en mutation)	Meddel om förändring i termisk stabilitet
1			
2			
3			
4			
5			

>Normal GFAP

```
MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGLAPGRRLLPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNAGFKETRASERAEM-
MELNDRFASYIEKVRFLFLEQQNKALAAELNQLRAKEPTKLADVYQAELELRLRLDQLTANSARLEVERDNLAQDLAT-
VRQKLQDETNLRLEAENNLAAAYRQEADEATLARLDLKERKIESLEEEIRFLRKIHHEEEVRELQEQLARQQVHVVELDVAK-
PDLTAALKEIRTQYEMASSNMHEAEEWYRSKFADLTDAAARNAELLRQAKHEANDYRRQLQSLTCDLESRLGTNES-
LERQMREQEERHVREAASYQEALARLEEEGQSLKDEMARHLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLEGEENRITIPVQT-
FSNLQIRETSLDTSVSEGHLLKRNIVVKTVMRDGEVIKESKQEHKDVMM
```

>1patient

```
MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGLAPGRRLLPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNAGFKETRASERAEM-
MELNDRFASYIEKVRFLFLEQQNKALAAELNQLRAKEPTKLADVYQAELELRLRLDQLTANSARLEVERDNLAQDLAT-
VRQKLQDETNLRLEAENNLAAAYRQEADEATLARLDLKERKIESLEEEIRFLRKIHHEEEVRELQEQLARQQVHVVELDVAK-
PDLTAALKEIHTQYEMASSNMHEAEEWYRSKFADLTDAAARNAELLRQAKHEANDYRRQLQSLTCDLESRLGTNES-
LERQMREQEERHVREAASYQEALARLEEEGQSLKDEMARHLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLEGEENRITIPVQT-
FSNLQIRETSLDTSVSEGHLLKRNIVVKTVMRDGEVIKESKQEHKDVMM
```

>2patient

```
MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGLAPGRRLLPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNAGFKETRASERAEM-
MELNDRHFASYIEKVRFLFLEQQNKALAAELNQLRAKEPTKLADVYQAELELRLRLDQLTANSARLEVERDNLAQDLAT-
VRQKLQDETNLRLEAENNLAAAYRQEADEATLARLDLKERKIESLEEEIRFLRKIHHEEEVRELQEQLARQQVHVVELDVAK-
PDLTAALKEICTQYEMASSNMHEAEEWYRSKFADLTDAAARNAELLRQAKHEANDYRRQLQSLTCDLESRLGTNES-
LERQMREQEERHVREAASYQEALARLEEEGQSLKDEMARHLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLEGEENRITIPVQT-
FSNLQIRETSLDTSVSEGHLLKRNIVVKTVMRDGEVIKESKQEHKDVMM
```

>3patient

```
MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGLAPGRRLLPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNAGFKETRASERAEM-
MELNDRFASYIEKVRFLFLEQQNKALAAELNQLRAKEPTKLADVYQAELELRLRLDQLTANSARLEVERDNLAQDLAT-
VRQKLQDETNLRLEAENNLAAAYRQEADEATLARLDLKERKIESLEEEIRFLRKIHHEEEVRELQEQLARQQVHVVELDVAK-
PDLTAALKEIRTQYEMASSNMHEAEEWYRSKFADLTDAAARNAELLRQAKHEANDYRRQLQSLTCDLESRLGTNES-
LERQMREQEERHVREAASYQEALARLEEEGQSLKDEMARHLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLEGEENRITIPVQT-
FSNLQIRETSLDTSVSEGHLLKRNIVVKTVMRDGEVIKESKQEHKDVMM
```

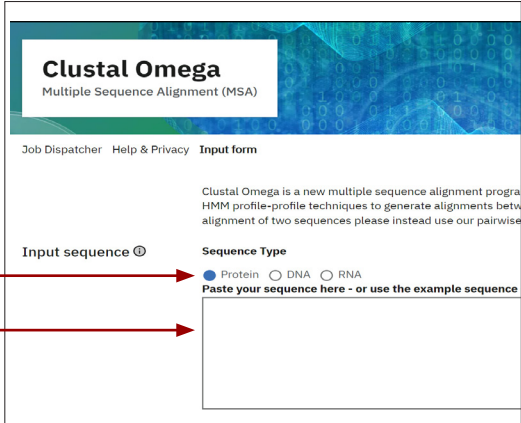
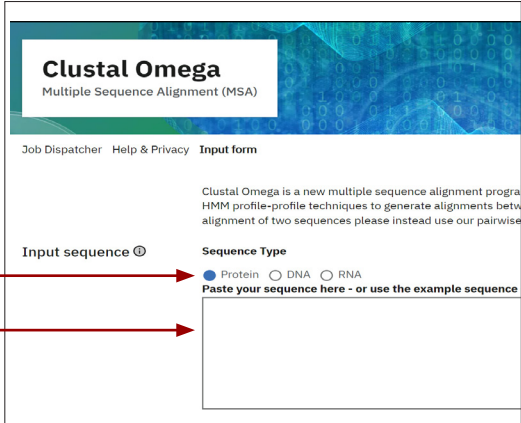
>4patient

```
MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGLAPGRRLLPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNAGFKETRASERAEM-
MELNDRFASYIEKVRFLFLEQQNKALAAELNQLRAKEPTKLADVYQAELELRLRLDQLTANSARLEVERDNLAQDLAT-
VRQKLQDETNLRLEAENNLAAAYRQEADEATLARLDLKERKIESLEEEIRFLRKIHHEEEVRELQEQLARQQVHVVELDVAK-
PDLTAALKEIRTQYEMASSNMHEAEEWYRSKFADLTDAAARNAELLRQAKHEANDYRRQLQSLTCDLESRLGTNES-
LERQMREQEERHVREAASYQEALARLEEEGQSLKDEMARHLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLEGEENRITIPVQT-
FSNLQIRETSLDTSVSEGHLLKRNIVVKTVMRDGEVIKESKQEHKDVMM
```

>5patient

```
MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGLAPGRRLLPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNAGFKETRASERAEM-
MELNDRFASYIEKVRFLFLEQQNKALAAELNQLRAKEPTKLADVYQAELELRLRLDQLTANSARLEVERDNLAQDLAT-
VRQKLQDETNLRLEAENNLAAAYRQEADEATLARLDLKERKIESLEEEIRFLRKIHHEEEVRELQEQLARQQVHVVELDVAK-
PDLTAALKEICTQYEMASSNMHEAEEWYRSKFADLTDAAARNAELLRQAKHEANDYRRQLQSLTCDLESRLGTNES-
LERQMREQEERHVREAASYQEALARLEEEGQSLKDEMARHLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLEGEENRITIPVQT-
FSNLQIRETSLDTSVSEGHLLKRNIVVKTVMRDGEVIKESKQEHKDVMM
```

Metod för sekvensanalys

1. Kopiera alla sekvenser på förra sidan (eller i filen "Aminosyrasekvenser Normal och 5 patienter").
2. För att öppna webbsidan för verktyget ClustalOmega i en ny webbflik: håll ned Ctrl-tangenten och klicka på länken: <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>
3. Kontrollera att "Protein" är markerat. 
4. Klistra in sekvenserna i den vita rutan. 
5. Scrolla ned och klicka på "Submit".
6. För att få fram resultatet, klicka på "View results".
Resultatfönstret har olika flikar placerade i ett grått fält.
Bilden nedan visar vilken information som finns öppen först i fliken "Tool Output".

Tool Output

Flik som är öppen först. Här kan man snabbt se var i sekvensen som det finns en eller flera avvikelser. Bokstäverna står för olika aminosyror. Stjärnor betyder att alla sekvenser ovanför är helt identiska för den positionen. Saknas en stjärna betyder det att där finns en avvikelse i minst en av sekvenserna man matat in. Siffran till höger (i bilden nedan står det 60) innebär att den sista bokstaven motsvarar aminosyra nummer 60 i sekvensen.

Normal	MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGLAPGRRLGPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNA	60
3patient	MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGLAPGRRLGPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNA	60
4patient	MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGLAPGRRLGPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNA	60
1patient	MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGLAPGRRLGPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNA	60
2patient	MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGLAPGRRLGPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNA	60
5patient	MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGLAPGRRLGPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNA	60

Sammanställ svar på uppgifterna 1-3 i tabellen på sidan 5.

Uppgift 1: I vilka positioner i sekvensen hos patienterna finns det mutationer?

Uppgift 2: Vilken eller vilka av patienterna bär på **en** mutation i GFAP-genen?
Vilken förändring har skett i och med mutationen?

Uppgift 3: Vilken eller vilka av patienterna bär på **två eller fler** mutationer i GFAP-genen? Vilken förändring har skett i och med dessa mutationer?

Uppgift 4: Hur många aminosyror ingår i normalt GFAP-protein?

Uppgift 5: Har någon patient ändrad längd på GFAP-proteinet?

Alignments

Klicka på denna flik (*Alignment*) för att se matchningen med stöd av färgkodning.

Startläget för COLOR SCHEME är att aminosyrorna har många olika färger (clustal2). Öppna rullmenyn med ett klick (se lång röd pil).

Välj att färgmarkera aminosyror med vissa kemiska egenskaper för att kunna svara på deluppgifter i övningen. Till exempel kan man välja de med negativ eller positiv laddning, eller de som är polära.

ClustalOmega är framtaget via The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. <https://europepmc.org/article/MED/38597606>

Uppgift 6: Är arginin (R) en positivt eller negativt laddad aminosyra? Öppna fliken "Alignment" (se bild ovan). Ställ in COLOR SCHEME så att du kan se vilka aminosyror som är negativa respektive positiva.

Uppgift 7: I tabellen nedan visas kemiska egenskaper för arginin (R) och för de aminosyror som brukar förekomma i muterade GFAP-proteiner. Vilken av C, G och H avviker mest (jämför värden) från R vad gäller

- hur hydrofil (vattenlöslig) aminosyran är?
- storlek?
- elektronegativitet?

Sammanställ svar på uppgifterna 6-7 i tabellen på sidan 5.

Tabell för aminosyrorna arginin (R), cystein (C), glycin (G) och histidin (H) och deras förkortningar. Hellbergs z-skala går från negativa värden till positiva värden (enhetslösa, baseras på en statistisk analys som väger samman många olika mått).

z1 är kopplat till hur hydrofob (lågt värde) eller hydrofil (høgt värde) aminosyran är.

z2 är kopplat till storlek och steriska ("klumpiga") hinder från sidokedjan (lågt värde för små aminosyror).

z3 är kopplat till elektronegativiten hos aminosyrans sidokedja (syre och svavel ger högre värden).

Aminosyra	3-bokstavs-kod	1-bokstavs-kod	z1 Hydrofil?	z2 Storlek?	z3 Elektro-negativitet?	Modell-struktur
Arginin	Arg	R	2.88	2.52	-3.44	
Cystein	Cys	C	0.71	-0.97	4.13	
Glycin	Gly	G	2.23	-5.36	0.30	
Histidin	His	H	2.41	1.74	1.11	

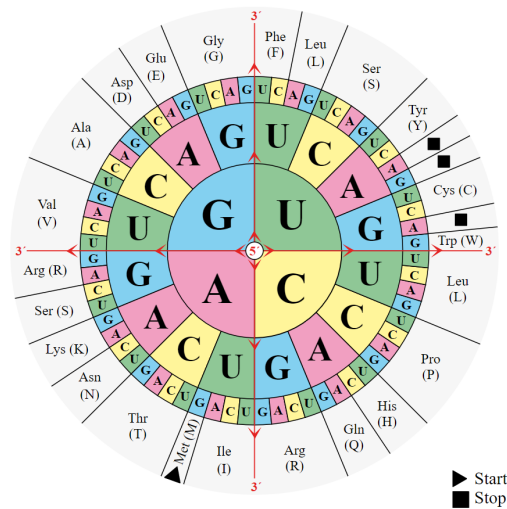
Tabell för att sammanställa information om patienternas eventuella mutationer.

Patient	Positioner för eventuella mutationer (ange position, eller "0" för ingen mutation)	Mutation (ange 1-bokstavskod för ev. muterad aminosyra)	Beskriv om mutationen ger en förändring i kemisk egenskap
1			
2			
3			
4			
5			

Uppgift 8: Om vi antar att det är särskilt allvarligt att som patient ha flera mutationer och mutationer som innebär en stor förändring i kemiska egenskaper hos proteinet GFAP, vilken patient ser ut att ha drabbats hårdast? Sammanfatta ett svar till läkaren om vad analysen av GFAP-genen för de fem patienterna säger om eventuell risk för Alexanders sjukdom.

Genetiska koden från mRNA till aminosyror.

Mouagip, Public domain, via Wikimedia Commons



Uppgift 9: Hur många nukleotider (hur långt mRNA) krävs för att koda för ett protein med den längd som GFAP-proteinet har?

Uppgift 10: Vilken eller vilka av följande förändringar (mutationer) på DNA-nivå kan ge upphov till att aminosyra R i position 79 förändras till aminosyra C hos en av patienterna?

Det kan ha skett... (välj ett eller flera alternativ)

- ... en deletion
- ... en insertion
- ... ett basutbyte i den första av de tre kvävebaserna som kodar för R
- ... ett basutbyte i den andra av de tre kvävebaserna som kodar för R
- ... ett basutbyte i den tredje av de tre kvävebaserna som kodar för R

Motivera varför du valt eller inte valt alternativen a-e.

Uppgift 11: I de flesta fallen har inte föräldrarna till den som drabbas de mutationer som orsakar Alexanders sjukdom. I regel är patienterna heterozygoter för mutationen. Välj ett av följande alternativ och motivera.

Mutationen är förmodligen dominant eftersom...

Mutationen är förmodligen recessiv eftersom...

Uppgift 12: Tycker du att man borde ge råd till patienterna att använda sig av provrörsbefruktning (IVF, invitrofertilisering) och preimplantatorisk genetisk diagnos (PGD) i de fall de vill skaffa barn? Varför/varför inte?