



Alexanders sjukdom

Lärarhandledning

Denna bioinformatikövning handlar om att bedöma ifall fem patienter har några mutationer som orsakar förändringar i proteinet GFAP. Aminosyrasekvenser jämförs med hjälp av verktyget Clustal Omega.

Till övningen finns ett bildspel (PPT) som kan användas för att introducera uppgiften. Den innehåller samma bilder som finns i elevinstruktionens bakgrundsbeskrivning till orsakerna bakom Alexanders sjukdom. Elevinstruktionens beskrivning av den övergripande uppgiften följs av en normal aminosyrasekvens motsvarande sekvenser för fem olika vuxna patienter. Sedan följer ett antal deluppgifter så att eleverna steg för steg kan ta sig an analys och tolkningar av resultat. En tabell för att sammanställa resultat finns på sidan 5 i elevinstruktionen. Förslag på svar på deluppgifter ges sist i denna lärarhandledning.

Syfte

Syftet med övningen är att visa på hur mutationer som påverkar enstaka aminosyror kan identifieras genom att jämföra sekvensdata från patienter med en referenssekvens (normal), som ger ett fungerande protein.

Övningen ska även ge ökad förståelse för att effekten ett skifte från en aminosyra till en annan har beror på aminosyroras kemiska egenskaper så som laddning och storlek.

Om övningen

Övningen togs ursprungligen fram av Erik Bongcam-Rudloff som numera är professor i bioinformatik vid Sveriges lantbruksuniversitet, SLU. Bioresurs har utvecklat övningen, bland annat med stöd av lärare som deltagit i fortbildning och kommenterat den. Flera deluppgifter har lagts in med syfte att ge stöd för eleverna att stegvis ta sig an den övergripande uppgiften. Information om aminosyroras kemiska egenskaper har inkluderats i den nuvarande övningens utformning. Dessutom har uppgifter som knyter an till ärflighet och preimplantatorisk genetisk analys (PGD) lagts till.

Användningsområde

Övningen är tänkt för elever på gymnasiet. Den har prövats och utvecklats efter återkoppling från lärare som deltagit i fortbildning om bioinformatik för skolan.

Ett förslag är att använda övningen i samband med att man arbetar med hjärnan och nervsystemet. Den kan även integreras i genetikundervisningen som exempel på en monogen sjukdom.

Flera lärare som prövat övningen menar också att den fungerar bra som intressant inslag i kemiundervisningen när man arbetar med proteiners struktur och funktion.

Förkunskaper

Innan man gör övningen är det viktigt att eleverna har viss koll på begrepp som gen, DNA, transkription, translation, aminosyrasekvens, mutation och protein. Eftersom sjukdomen orsakas av problem på cell- och organnivå är det en fördel att eleverna har viss koll på att det finns olika celltyper och att cellernas form och funktion påverkas av strukturen på deras cellskelett.

Eleverna behöver ha viss vana vid att arbeta i webbläsare med flera flikar öppna (kunna växla mellan olika flikar) och kunna följa instruktioner. Det är också bra att de känner till några snabbkommandon för att kopiera (Ctrl+C) och klistra in (Ctrl+V). Ytterligare en bra datorkunskap är att man kan öppna nya webbflikar genom att hålla ned Ctrl-tangenten innan man klickar på en länkadress. Det är vanligt att man öppnar pdf-filer, så som elevinstruktionen, i webbläsare. Om man bara klickar direkt på en länk till ett bioinformatiskt verktyg så lämnar man instruktionen.

Tidsåtgång

Hela övningen med alla deluppgifter (1-12) tar ungefär en timme att göra för en med viss datorvana som följer instruktionerna utan att fastna alltför länge på någon deluppgift. Ett moment som man kan fastna på är uppgifterna 6-7 som handlar om aminosyrornas kemiska egenskaper. I svarsförslagen till dessa uppgifter finns kommentarer som kan användas för att förklara för eleverna.

Uppgifterna 1-8 löser den övergripande uppgiften, det vill säga man kan sammanfatta ett svar till läkaren om vilka patienter som har misstänkta mutationer. Uppgifterna 9-12 ger möjlighet till fördjupad analys där man tittar på DNA-nivån, får fundera över mutationer, genetik och ärftlighet samt ett etiskt dilemma med koppling till PGD (preimplantatorisk genetisk diagnos).

Utöver själva genomförandet behövs en kortare genomgång med introduktion (se tillhörande bildspel) och tid för att gå igenom uppgifterna.

Didaktiska råd

För att introducera uppgiften kan det vara bra att prata om de bilder som visas på den första sidan i elevinstruktionen. Samma bilder finns i bildspelet (PPT) som hör till materialet. Modifiera så att det passar din undervisning. Bilderna visar olika så kallade *organisationsnivåer*. På makronivå visas hjärnan, astrocyter motsvarar mikronivå medan proteinet GFAP exemplifierar submikronivå. Förmågan att koppla ihop fenomen på olika rumsskalor är något som kräver träning.

Utöver själva uppgiften kan det vara bra att berätta något om vad bioinformatik handlar om. Man kan ta upp att det finns databaser där forskare lämnar in de resultat de får när de gör DNA-analyser. De sekvenser vi använder i uppgiften är hämtade från en sådan öppet tillgänglig databas. Man kan berätta om att sekvensdata ofta innehåller så många positioner av kvävebaser eller aminosyror att det skulle vara mycket tidskrävande att vi manuellt skulle sitta och leta efter skillnader. För att hantera stora datamängder av sekvensdata har man utvecklat olika bioinformatiska verktyg som bygger på programmering. En som arbetar med bioinformatik kan vara både programmerare i grunden, eller kanske en biolog som fördjupat sina kunskaper i programmering eller datavetenskap. Ofta behövs flera kompetenser när nya verktyg utvecklas och man arbetar i team.

Man kan berätta om vad som händer vid en sekvensjämförelse (se bild 7-8 i PPT). Programmet Clustal Omega bygger på en algoritm som skapar en matchning mellan olika sekvenser. Ofta bygger algoritmer för sekvensjämförelser på någon form av "kostnadsschema" där avvikelser ger minuspoäng, och likheter ger pluspoäng. Resultatet som man får fram är en matching som gett så hög poäng som möjligt. I just den här övningen med Alexanders sjukdom har alla sekvenserna exakt samma längd. Skillnaderna vi ser är enbart enstaka aminosyror som förändrats. I andra fall när man jämför sekvenser som kanske har olika längder så gör programmen att det skapas öppningar så att sekvenser kan förskjutas i förhållande till varandra.

Eftersom det kan vara en stor variation i hur elever tar sig an uppgiften (på grund av skillnader i förkunskaper och förmågor) kan det vara bra att planera för hur du ska kunna följa upp arbetet i klassen som helhet. Det kan finnas en fördel med att dela upp arbetet så att målet för ett lektionspass är att göra de inledande deluppgifterna, medan övriga uppgifter görs klart nästföljande lektion.

Att låta eleverna arbeta två och två ger flera fördelar. En elev kan ha instruktionen med deluppgifterna framför sig, medan den andra eleven på sin skärm kan få fram resultatet i Clustal Omega. Då kan de tillsammans arbeta med uppgifter och tolkningar av resultaten.

För elever som har svårt att arbeta vid datorn med flera flikar öppna, kan ett alternativ vara att skriva ut resultatet man får fram via Clustal Omega. Då kan en utskrift av resultatet göra det enklare att tolka och göra uppgifterna.

Forskning om bioinformatikundervisning i skolan har visat att det ibland är elevernas största problem att förstå den biologiska kontexten. De kanske kan klicka igenom en instruktion och få fram resultat utan större problem, men att tolka och förstå det man får fram är det mer utmanande. Som lärare kan det vara viktigt att planera för hur man ska stötta eleverna i detta. Ett sätt är att använda guidande frågor av typen "Varför gjorde vi den här analysen?", "Vad var det för fråga vi hade?".

Hoppas att du prövar den här uppgiften med dina elever och att du vill dela med dig av din återkoppling till oss på Bioresurs. Maila reflektioner till info@bioresurs.uu.se.

Svarsförslag till deluppgifter

I elevinstruktionen står att man ska sammanställa svaren på uppgifterna 1-3 och 6-7 i tabellen (som finns på sidan 5 i elevinstruktionen). Här ges svaren till respektive uppgift, men de har även förts in i tabellen (se nästa sida).

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

De flesta aminosyrorna i sekvenserna för patienterna är identiska med den normala vilket visas med stjärnor underst (*). Position 79 och 239 saknar stjärnor. Om man slarvar när man kopierar sekvensen kan det fattas någon aminosyra (för patient 5) på slutet, men det är då en felinmatning och inte en mutation (vilket man ser när man går tillbaka och tittar på sekvensdatat).

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

Observera att patienterna hamnat i en ordning som motsvarar hur lika eller olika de är den översta sekvensen. De ligger alltså i en annan ordning än så som de matades in i programmet. Patient nummer 1 har ingen mutation i position 79, men däremot i position 239, en mutation alltså. Aminosyran R (arginin) som förändrats till H. Patient 3 och 4 har inga mutationer i någon av positionerna.

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?

Patient 2 och 5 har vardera två mutationer (i både position 79 och 239). Aminosyran R (arginin) har förändrats till H och C för patient 2 i positionerna 79 och 239. För patient 5 har R muterats till C i både position 79 och 239.

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

Det här ser man på siffran längst ned till höger på resultatsidan, 432 aminosyror.

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

Nej (om man kopierat hela sekvenserna, se kommentar till uppgift 1).

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.

När man ändrar i COLOR SCHEME till "positive" så färgas alla positiva aminosyror, inklusive R (arginin) blått. Så svaret är att arginin är en positivt laddad aminosyra.

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? Aminosyran C avviker mest.
- storlek? Aminosyran G avviker mest.
- elektronegativitet? Aminosyran C avviker mest.

Kommentarer: Tabellen med olika värden för aminosyrornas kemiska egenskaper visar graden av vattenlöslighet i kolumnen z1. Arginin har värde 2.88. Den aminosyra som avviker mest från det värdet är C (cystein) som har det lägsta värdet av de tre. Storlek i kolumnen z2 ger arginin värdet 2.52 medan G (glycin) har det lägsta värdet (negativt) av de tre. Även C har ett negativt värde. Elektronegativitet i kolumn z3 visar att arginin har värde -3.44 och C (cystein) har det högsta värdet av de tre.

Tabell för att sammanställa information om patienternas eventuella mutationer.

Patient	Positioner för ev. mutationer (ange position, eller "0" för ingen mutation)	Mutation (ange 1-bokstavskod för ev. muterad aminosyra)	Beskriv ev. förändring i kemisk egenskap
1	239	H	Främst en annan elektronegativitet än arginin
2	79 och 239	H i position 79 C i position 239	H skiljer sig framförallt i elektronegativitet C skiljer sig mycket i elektronegativitet, även i storlek och vattenlöslighet jämfört med arginin
3	Ingen mutation		
4	Ingen mutation		
5	79 och 239	C i position 79 C i position 239	C skiljer sig mycket i elektronegativitet, även i storlek och vattenlöslighet jämfört med arginin

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.

Om vi antar att ju fler kemiska olikheter som mutationen ger, desto större effekt så borde patient 5 ha det mest annorlunda proteinet jämfört med det normala, eftersom aminosyra C skiljer sig så mycket från aminosyra R (arginin).

Patient 3 och 4 saknar mutationer som påverkat aminosyrasekvensen vilket tyder på att de inte har Alexanders sjukdom. Patient 1 har en mutation som gett en aminosyra med något annorlunda egenskaper medan patient 2 och 5 båda har två mutationer. Troligen har patient 5 störst effekt på proteinets struktur då båda mutationerna inneburit ett skifte till en kemiskt mycket annorlunda aminosyra.

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

Med 432 aminosyror kan man förvänta sig $432 \times 3 = 1296$ bp DNA-sekvens som kodar för dessa med tripletter av kodon. Men om man tänker att det även ingår ett stoppkodon, så borde sekvensen vara 1299 bp lång. Ett stoppkodon har den effekten att när ribosomen kommer till det kodonet så avslutas translationen.

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)

- d. ... en deletion
- e. ... en insertion
- f. ... ett basutbyte i den första av de tre kvävebaserna som kodar för R**
- g. ... ett basutbyte i den andra av de tre kvävebaserna som kodar för R
- h. ... ett basutbyte i den tredje av de tre kvävebaserna som kodar för R

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

Alternativ a och b skulle ge ett skifte i läsramen och orsaka en stor skillnad i translaptionen och därmed ge en mycket annorlunda sekvens av aminosyror efter position 79. Det ser vi inte hos patienterna, därför är de osannolika.

Alternativ c stämmer. Aminosyran R kodas av följande tripletter: AGG, AGA, CGG, CGA, CGC, CGU. Vi vet inte vilket kodon som ligger bakom, vi får anta att alla dessa sex varianter skulle vara möjliga. För att förändra något av kodonen till ett kodon för aminosyran cystein (C) måste vi se vilka kodon som gäller där: UGG, UGA, UGC, UGU. En skillnad här är alltså att R kodas av A eller C i första positionen, medan C kodas av U i första positionen. Alltså måste den första positionen i tripletten av baser ändras för att mutera från aminosyra R till C.

Alternativ d och e ger inte ett skifte från R till C (se förklaring till alternativ c).

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...

... att patienterna ofta är heterozygota innebär det att det räcker med en muterad sekvens för att det ska bildas proteiner med en avvikande struktur vilket ger upphov till sjukdomen. Att personen har en allel som är normal hjälper inte, då det inte kan ta bort de proteiner som bildas med en avvikande struktur.

Uppgift 12: Tycker du att alla patienter ska få rådet att använda sig av provrörsbefruktning (IVF, in vitro fertilisering) och preimplantatorisk genetisk diagnos (PGD) i de fall de vill skaffa barn? Varför/varför inte?

För patient 3 och 4 som saknar mutationer behövs det inte utifrån den här analysen av specifikt Alexanders sjukdom. De övriga patienterna skulle kunna ges råd om den typen av diagnostiskt verktyg eftersom det är 50% risk att den allel som innehåller mutationerna förs över till deras barn. I och med att sjukdomen är dominant så kommer barn som ärver den muterade allelen också med stor sannolikhet få sjukdomen.

Kommentar: I Sverige har två sjukhus tillstånd att bedriva högspecialiserad vård med genetiska diagnostik på embryoceller (Salgrenska Universitetssjukhuset i Göteborg och Karolinska Universitetssjukhuset i Stockholm). De ger genetisk vägledning och tar beslut om det är möjligt att genomföra PGD utifrån gällande lagar och den kunskap som finns. I de fall det är möjligt planerar och genomför de sedan PGD-behandlingen. Vi på Bioresurs har i dagsläget ingen information om hur vanligt det är att Alexanders sjukdom ingår i PGD-behandlingar.