

Lærervejledning øvelse om Cystisk Fibrose og Bioinformatik

Generelt om øvelsen.

Øvelsen Cystisk fibrose og Bioinformatik er en øvelse, hvor bioinformatik er integreret ind i den daglige undervisning, og den er tænkt til at understøtte et forløb om DNA og Proteinsyntese for Biotek A elever. Elevforudsætningerne er viden om DNA og proteinsyntese, Proteiners 3D struktur og Mendels 1. gens nedarving.

Øvelsen er delt op i 4 aktiviteter, som man kan undervise som et sammenhængende forløb.

Aktivitet 1 er et matrix gruppearbejde om komplikationerne ved cystisk fibrose. Varigheden af aktiviteten er ca. 30 min. Aktiviteten bruger ikke bioinformatik.

Aktivitet 2 er en gennemgang af proteinsyntesen af et normalt CFTR gen. Eleverne ser her på DNA sekvensen, mRNA sekvensen, aminosyresekvensen og det færdigt foldede protein. Eleverne bruger bioinformatik til at analysere sig frem til, hvor mange exons, den kodende del af CFTR genet danner og udregner, hvor lidt af CFTR genet, der faktisk er kodende. Varigheden af aktiviteten er ca 1 ½ time.

Aktivitet 3 består af 2 dele. Først ser eleverne på hvordan CFTR kanalproteinet kan åbnes og lukkes vha. ATP og cAMP, og hvordan at der først dannes en færdig kanal af alfa-helixer når proteinet aktiveres, dvs åbnes. Eleverne skal nu sætte sig ind i de 6 mutationsklasser, man inddeler CFTR gens mutationer i, og forstå forskellen på, hvordan de påvirker funktionen af det færdige protein og dermed strømmen af chlorid ioner over cellemembranen. Til slut er der en analyse af 3 forskellige DNA mutationer, og deres effekt på det færdige protein. De 3 mutationer er en punktmutation, en deletion uden frame shift og en punktmutation med dannelse af for tidligt stopcodon (nonsense mutation). Eleverne sammenligner både DNA'et, aminosyrerækkefølgen og endelig det ikke muterede og det muterede protein, for at få en forståelse af, hvor store ændringer der er sket.

Varigheden af øvelsen er ca. 1 ½ time

Til aktivitet 3 er der lavet en ekstra øvelse om en splice mutation. Øvelsen er tænkt som en mulighed for at lave differentieret undervisning, hvor de hurtige eller ekstra interesserede elever kan gå i dybden med noget stof, der er lidt sværere. Splice mutation medfører et frame shift, hvilket også giver et for tidligt stopcodon.

Aktivitet 4 fokuserer på nedarvningen af cystisk fibrose alleler. Med mere end 2000 forskellige mutationer beskrevet i CFTR genet, er det langt fra givet at en person med cystisk fibrose er homozygot for en mutationstype. Alt efter mutationstype, vil effekten være forskellig i forhold til CFTR proteinets fejl. Ud fra dette skal eleverne finde ud af, hvilken medicinering, et barn med cystisk fibrose skal have baseret på forældrenes mutationer. Varigheden af aktivitet 4 er ca. 1 time. Den sidste del af øvelsen er at eleverne går ind og læser en personlig historie om det at leve med cystisk fibrose, og denne del er inkluderet i tidsrammen. Udelades denne vil man kunne lave aktiviteten på ca. 45 min.



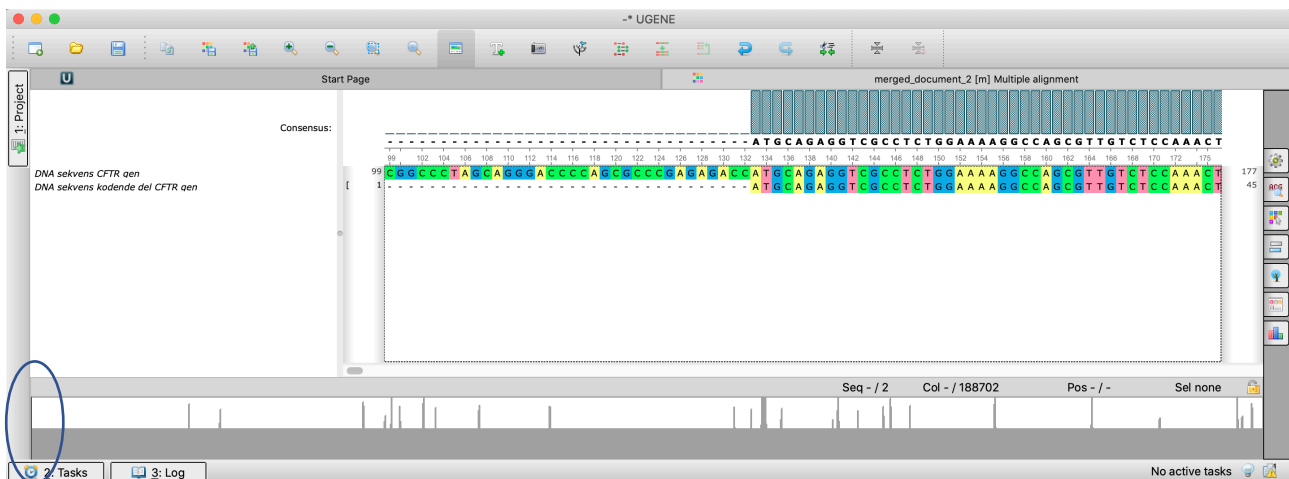
Det er dog også muligt at bruge aktivitet 2 til at træne proteinsyntesen med eleverne uden at bruge de andre aktiviteter. Aktivitet 3 - om mutationer - er koblet til aktivitet 2, så eleverne bruger det de har lært i aktivitet 2 til under aktivitet 3.

Øvelsen er en par opgave. Det skyldes, at det er smart, at den første elev har øvelsen åben på en computer, og Bioinformatik programmet kører på den anden elevs computer.

Programmet Ugene kører på de fleste computere uden problemer, men der kan være problemer med at downloade programmet, da det ligger på en server i Rusland. Få derfor eleverne til at installere programmet i god tid før øvelsen, og snak evt. med IT support om hjælp, hvis elever ikke kan få det installeret. 3D vieweren i Ugene er et såkaldt plugin, og nogle elever kan opleve problemer med at åbne det. Det kan være en fordel at lave par, så man er sikker på at Ugene kører på minimum 1 computer uden problemer. Tjek for 3D viewer er at uploade en protein.pdb fil og se om det åbner op med en 3D model.

Svarark til Aktivitet 2.

1. 188.702 bp
2. A: 30,8% C: 17,4% G:18,5% T:33,4%
3. Man kunne sagtens tælle det op selv og beregne det, men det ville tage frygtelig lang tid.
4. Transskription og translation.
5. Der er Uracil i stedet for Thymin.
6. Der er fire overordnet dele i et færdigt mRNA. 1. En 5' UTR region, 2. den kodende del, en 3. en 3' UTR region og 4. en Poly A hale. 5' UTR regionen indeholder promotor og Ribosom Binding Sitet, som sørger for at ribosomet placeres korrekt i forhold til læserammen. Den kodende del koder for aminosyrerækkefølgen i det færdige protein. 3'UTR regionen er bindingssted for regulerende miRNA (bør eleverne ikke vide på dette niveau). Poly A halen styrer, hvor mange kopier af proteinet der laves i ribosomerne.
7. Cap strukturen beskytter mRNA'et fra nedbrydning samt bruges ved transport af mRNA fra kernen ud i cytoplasma.
8. Der laves 4 kopier af CFTR protein. Der er 108 bp i poly A halen. Efter en translation er der 93 tilbage, derefter 78, derefter 63 og til slut 48. Så vil mRNA'et nedbrydes.
9. Exons er de kodende dele af genet, introns er de ikke kodende dele af genet. Derfor vil det være exons, der er tilbage efter RNA splicing i den kodende del af genet.
10. CFTR genet har 27 exons i alt (der er et exon helt i begyndelsen af genet, der nemt overses ved oversigten for neden, se indsat screengrab).



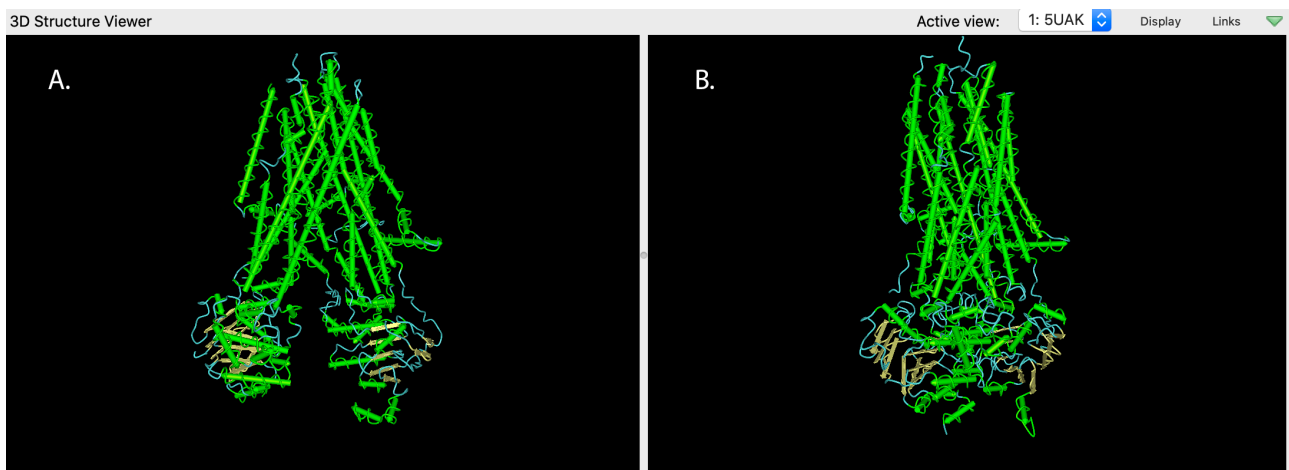
11. 4443 basepar
12. Udregningen er $(4443\text{bp}/188.702\text{bp}) \cdot 100 = 2,35\%$
13. Det er en fordel, fordi at man så kan lave flere slags proteiner ud fra det samme gen, ved at inkluderer eller udelade forskellige exons.
14. M Met (methionin), Q Gln (glutamin), R Arg (arginin) S Ser (serin) P Pro (prolin)
15. Methionin
16. 1480 Aminosyrer
17. Den tertiære struktur af proteinet er V formet.

Fejl. Der er en fejl i angivelsen af proteinets aminosyrekæde, hvor der kun indgår 1139 aminosyrer og ikke 1480, som der burde. Kvikke elever vil spotte det, og jeg har ikke kunnet identificere hvorfor fejlen opstår i Ugene, men proteinet afbildes korrekt i 3D modellen.

18. Der indgår alfa-helixer og beta-sheets. De er afbildet som cylindre og som flade bånd på figuren.
19. Identifikationen af exons i genet ville have været svær, men ikke umulig. 3D proteinstrukturen ville ikke kunne laves manuelt.
20. Forhåbentligt, hvor lidt af genet, der egentlig er kodende.

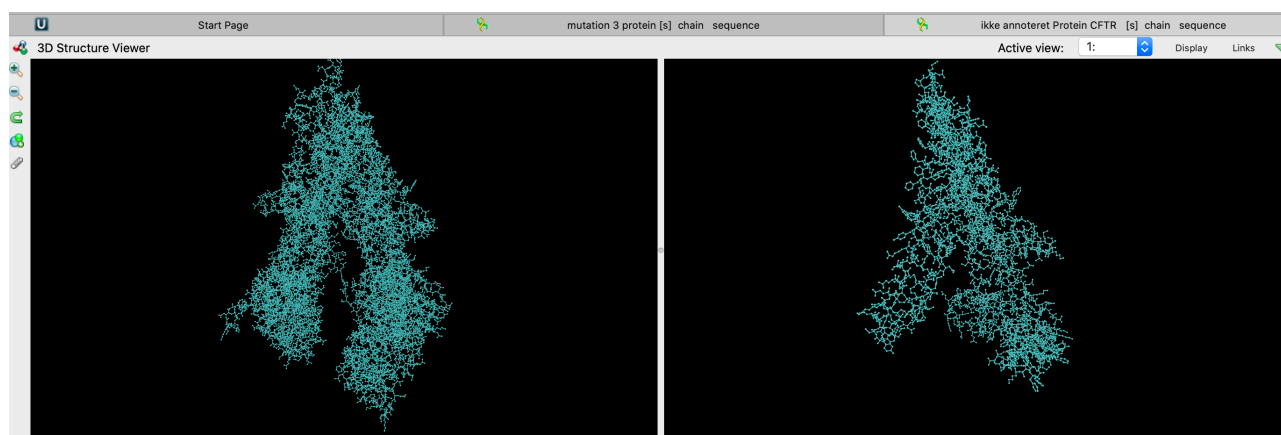
Svarark aktivitet 3.

1. Den slim der dannes i luftvejene og i bugspyttet skal hverken være for tynd eller for tyk. Dette reguleres ved at udskille chlorid ioner, der er med til at justere det osmotiske sug af vand ud i slimet. Ved at kunne åbne og lukke for udstrømningen af Cl^- ioner, kan det reguleres præcist.
2. Proteinet går fra at være V-formet til at være mere rør-formet, se screengrab nedenfor.



3. Det er fordi at alle alfa helixerne først danner røret, der går igennem cellemembranen når der er tilsat ATP og cAMP, som vist på figur B ovenfor.
4. Det er fordi at der for mutationsklasse I+II slet ikke dannes noget protein og for klasse III 's vedkommende at der slet ikke er nogen funktionel åbning i proteinet. Dvs for alle tre mutationsklasser vil det ikke være muligt for chlorid ioner at komme ud fra cellerne og ud i slimet.
5. Mutation 1: Der er sket en deletion af TCT i position 1520-1522. Mutation 2: Der er sket en punktmutation fra C til T i position 1000. Mutation 3: der er sket en punktmutation fra G til T i position 1624.
6. Mutation 1: Der er sket en deletion af aminosyren phenylalanin (F) i position 508. Mutation 2: Der er sket en ændring af aminosyre på position 334 fra arginin (R) til tryptofan (W). Mutation 3: Der er sket en ændring fra aminosyreen glycine til et stopcodon i position 542.

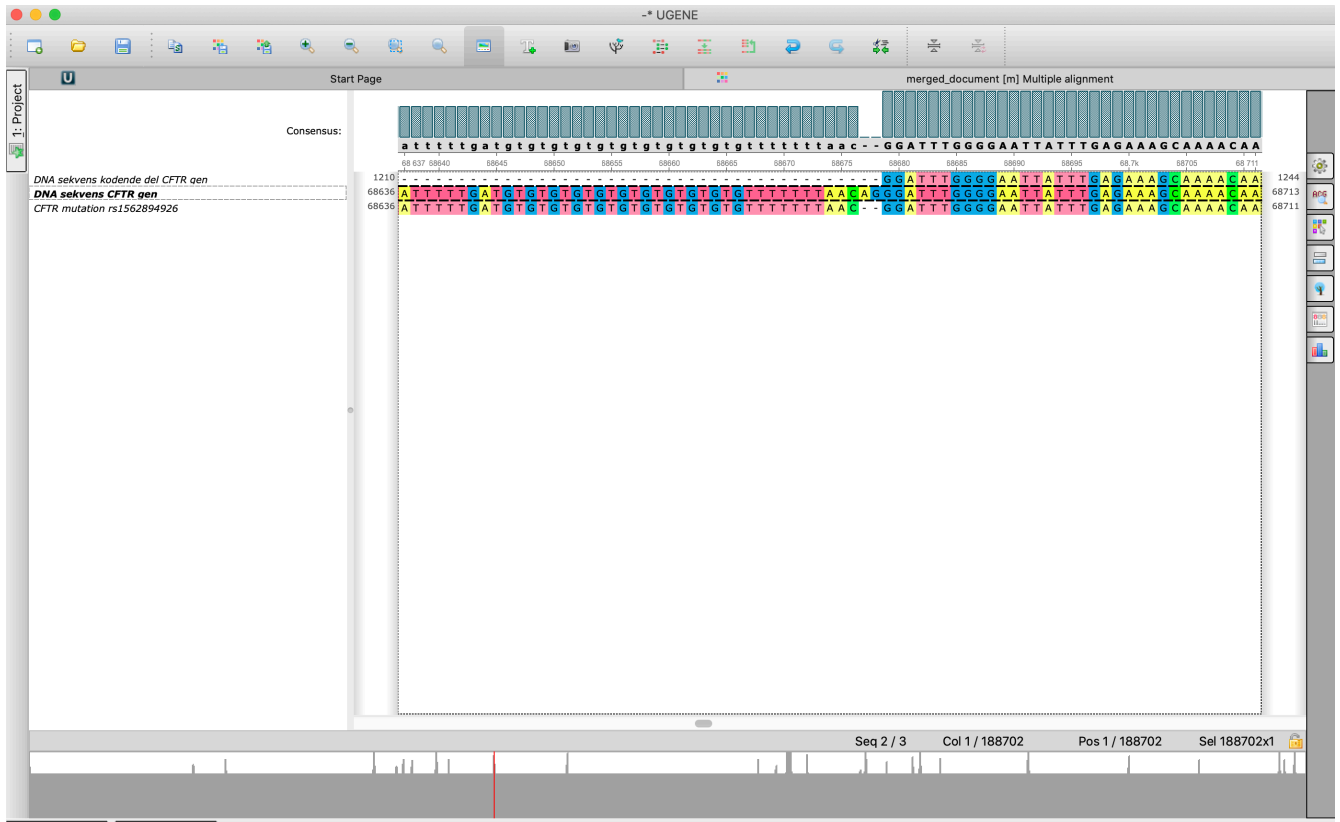
7. Mutation 1: Ja, den ligger i NBD1 området, der er med til at regulere om ionkanalen er åben eller ej.
8. Det er ikke stor forskel i 3D strukturen for mutation 1 og 2, da der for mutation 1 kun er forsvundet en aminosyre i kæden og for mutation 2 kun er sket en udskiftning af en aminosyre, dvs at der er det samme antal aminosyrer i proteinet. Der er stor forskel for mutation 3, hvor der kun er et fragment af det færdige protein, der bliver dannet, se screencrab nedenfor for sammenligning.



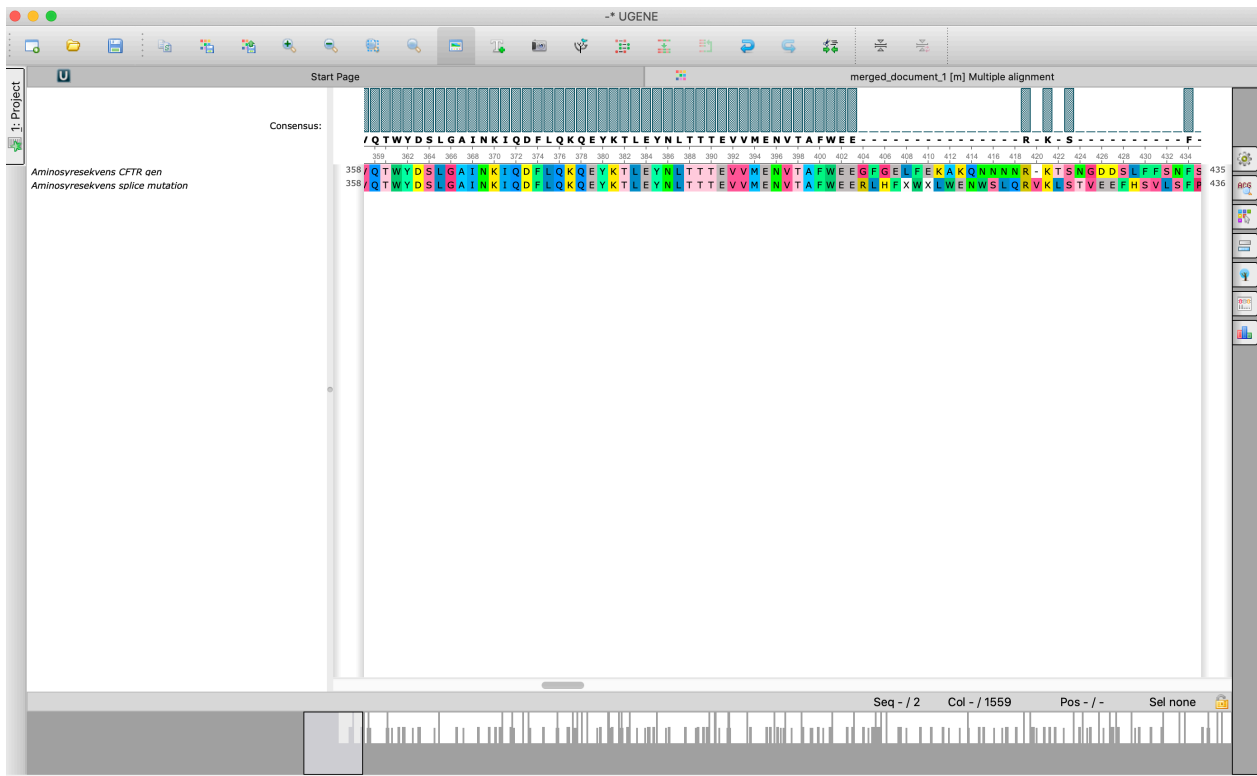
9. Mutation 1 er en deletion, og giver ikke frameshift, da der forsvinder tre basepar, hvilket svarer til et codon, og derved en aminosyre. Mutation 2 er en punktmutation og giver ikke frameshift. Mutation 3 er en punktmutation, og giver ikke frameshift, men det er en nonsense mutation, der medfører et for tidligt stop.
10. Mutation 3 (G542X). Der mangler en meget stor del af proteinet, og det dannede protein nedbrydes med det samme efter proteinsyntesen. Det passer med beskrivelsen af mutationsklasse 1. Mutation 1 (delta p508) er den hyppigst forekommende årsag til Cystisk Fibrose, da den medfører en forkert foldning af CFTR proteinet i det endoplasmatiske retikulum (mutationsklasse II), og den derfor ikke transporteres op til cellemembranen. Mutation 2 (R334W) giver en nedsat gennemstrømningshastighed af chloridioner igennem kanalproteinet, og tilhører mutationsklasse 4.

Svarark til splice mutations øvelsen - differentieret undervisning

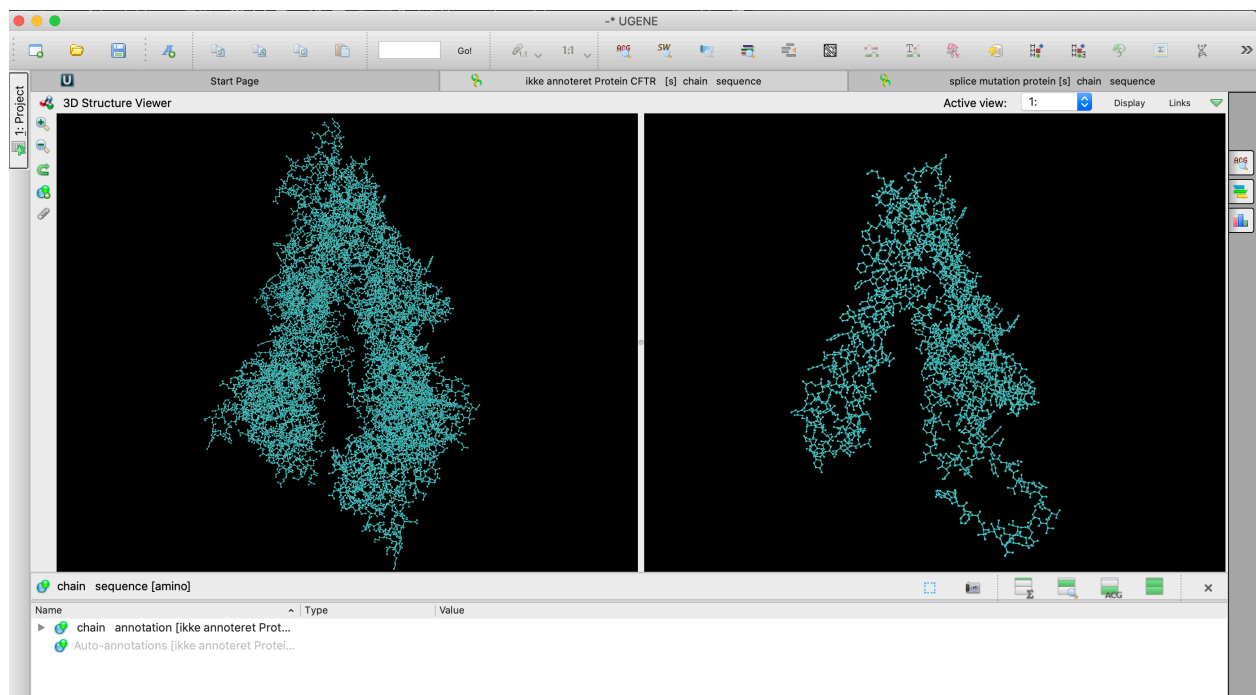
1. Der er sket en deletion af baserne AG ved position 68677-68678. Der er lige før exon nummer 10, se screengrab nedenfor.



2. Det er en mutation i et acceptorsite (sidder for enden af et intron)
3. De to proteiner har den samme aminosyrerækkefølge frem til position 403. Derefter er der 4 forskellige aminosyre og så kommer der et stopcodon i splice mutationen. Der er altså sket en frame shift mutation, der medfører et for tidligt stopcodon, se screenrab på næste side.



4. Ja, splice mutationen medfører at det kun er en lille del af CFTR proteinet, der dannes. Det vil ikke være funktionelt, og bliver derfor nedbrudt (Mutationsklasse I) Se screengrab nedenfor for at se forskellen på de to proteiner.





Svarark aktivitet 4.

1. At genet sidder på et autosomt (ikke køns) kromosom, og at man skal have to nonfunktionelle alleler, for at få cystisk fibrose.
2. Det er klassisk Mendelsk 1'gens nedarvning, dvs 25% sandsynlighed for at få sygdommen.
3. Fordi, at hvis man har en rask allel, vil der dannes funktionelt protein, og det er ofte nok til ikke af blive syg, eller kun syg med milde symptomer.
4. Barnet vil have en allel, der giver et nonfunktionelt CFTR protein (delta p508 er mutationsklasse II) og en allel, der giver et CFTR protein med nedsat funktion (Arg334Trp er mutationsklasse IV). Derfor vil barnet have cystisk fibrose i middelsvær grad, da der dog kommer lidt chlorid ioner over i slimen, men ikke meget.
5. Her skal eleverne bruge deres viden fra aktivitet 1 - og når det er i middelsvær grad, skal de prøve at forklare symptomerne ud fra det.
6. En kombinationsbehandling med begge medikamenter. Ivacaftor® vil åbne op for ionkanalerne ved mutationsklasse 4 mutationen og derved øge gennemstrømningen, og klasse 2 mutationen som delta p508 kan behandles med Lumacaftor®. Dog skal der tages højde for evt. bivirkninger.
7. Nej, for når der mangler en stor del af proteinet, kan det ikke laves ved at folde det anderledes.