

Bananfluer og nedarvning

Teori: Bananflue-genetik

Bananfluens livscyklus

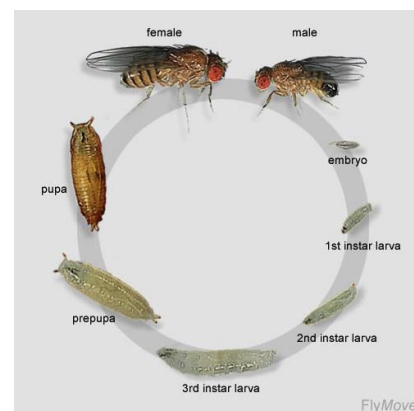
Bananfluen, *Drosophila melanogaster*, har været brugt til at studere genetik i mere end 100 år. Denne diploide organisme har fuldstændig forvandling og gennemgår ægstadiet, tre larvestadier og puppestadiet, inden de voksne fluer klækker. Hele livscyklus tager ca. 10 dage ved 25°C (Figur 1).

Kønsbestemmelse og fænotype

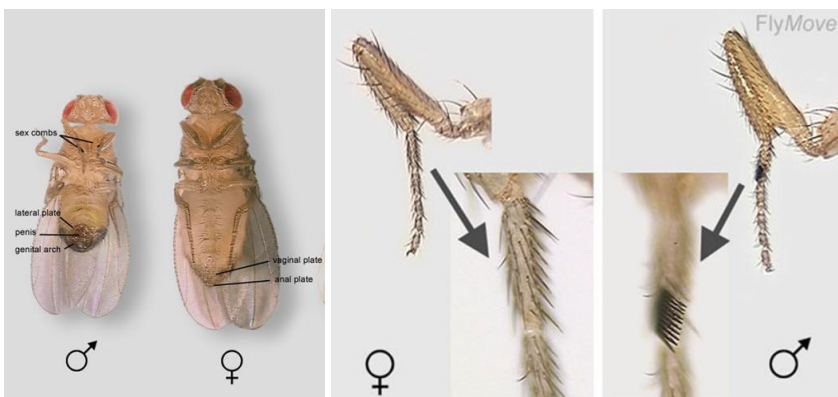
Kønnet bestemmes genetisk via kønskromosomer. Hunner har to X-kromosomer og hanner har et X-kromosom og et mindre Y-kromosom.

Morfologisk (mht. udseende) kendes hannerne på deres mindre størrelse, kønskammene på forreste benpar samt mørkere og mere afrundet bagende. På nedenstående billeder ses eksempler på vildtype hanner og hunner (Figur 2).

Der kendes en lang række mutationer som fx "ebony" (mørk kropsfarve; figur 3), der ændrer fluernes fænotyper, og som kan gøre det sværere at genkende kønnene. Disse genetisk nedarvede egenskaber har haft stor betydning for forståelsen af genetisk nedarvning. De har således været vigtige for at eftervise Mendels teorier samt beskrive kønsbundne, nedarvede egenskaber og kobling af gener på kromosomer.



Figur 1. Bananfluens livscyklus



Figur 2. Til venstre han og hun. Til højre, forreste benpar med hannens kønsskam til højre. Bemærk at antenner, vinger og ben kan have andre stillinger end de viste.



Figur 3. Til venstre hun og han med mutationen 'ebony' (mørk kropsfarve). Den mørke krop gør det sværere at bestemme kønnet. Til højre en helt nyklækket bananflue. Den blege – endnu ikke størknede – kutikula (ydre skelet) og forlængede bagkrops form kan også vanskeliggøre kønsbestemmelsen.

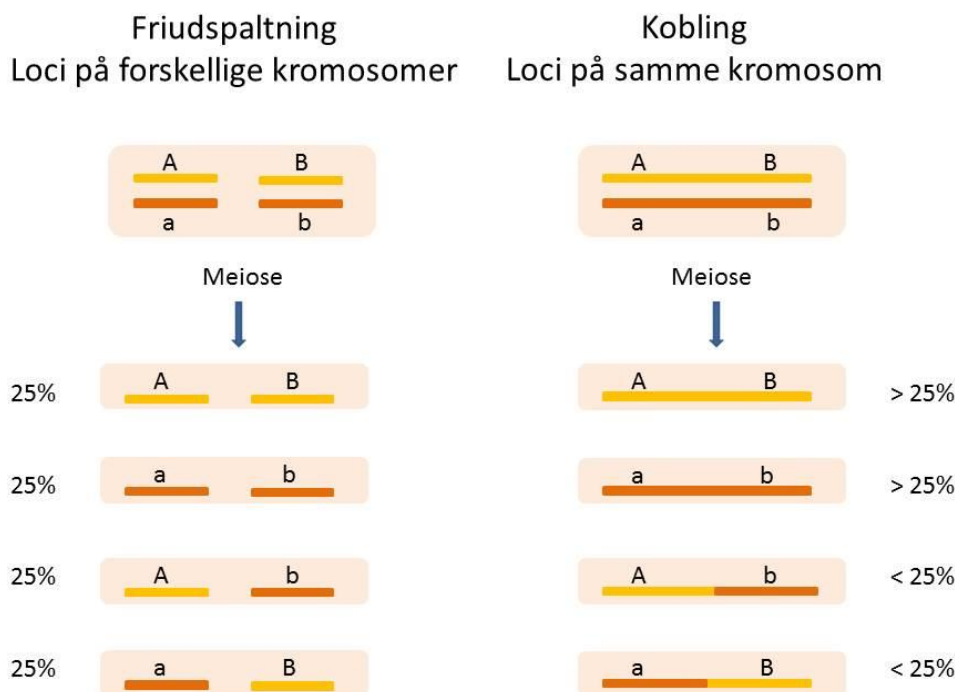
Nedarvning og koblede gener

Det enkelte gen har normalt en bestemt placering på et kromosom – genets locus (flertal loci). Ifølge **Mendels første lov** nedarves allele gener således, at de adskilles ligeligt i meiosen. Ifølge **Mendels anden lov** vil gener for forskellige egenskaber nedarves uafhængigt af hinanden i meiosen.

Forskellige fænotyper (som fx "ebony") skyldes mutationer, hvoraf nogle kan være koblede på kromosomerne. Koblede mutationer er mutationer, der sidder på samme kromosom og dermed oftest vil nedarves sammen, når kønscellerne dannes i meiosen. Findes koblede mutationer, nedarves de derfor ikke uafhængigt (modsat Mendels anden lov). Kun i de tilfælde, hvor der sker overkrydsning mellem de pågældende loci (gener) i meiosen, vil koblingen opbrydes.

Sandsynligheden for sådan en overkrydsning falder med afstanden mellem loci (gener) på kromosomerne: jo tættere loci (generne) er på hinanden, jo stærkere er koblingen, og jo større er sandsynligheden for at de koblede alleler (gen-varianter) nedarves sammen.

Koblingens styrke (og afstanden mellem loci) er defineret som andelen af alle afkom, hvor der observeres overkrydsning – dvs. rekombinanter/totalt antal afkom – og angives som rekombinationsfrekvens (RF) eller procent. Ved 50% overkrydsningsfrekvens er der fri og uafhængig udspaltning mellem loci (Mendels 2. lov) og derfor ingen kobling (se Figur 3). Er overkrydsningsfrekvensen lavere end 50% er der kobling mellem generne.



Figur 3. Figuren viser hvordan kobling påvirker frekvensen af meioseprodukter i forhold til fri udspaltning.

Bedøvelse af bananfluer: kulde og CO₂

Temperaturer på omkring 5 °C får fluerne til at gå i kulde-koma. Fluerne kan derfor bedøves med is. I laboratorier bruger vi dog CO₂, som er noget nemmere at arbejde med. Kortvarig bedøvelse med CO₂ har kun begrænset indvirkning på fluernes fysiologi og er derfor velegnet til brug i forskningseksperimenter.

Beregning af afstande mellem koblede loci

Når loci er placeret i nærheden af hinanden på samme kromosom, udviser de kobling. Afstanden mellem loci angives som rekombinationsfrekvensen i % (og kaldes også for *map units*, hvor 1 *map unit* er defineret som 1% rekombination). Afstande kan således variere fra 0 (fuldstændig kobling) til 50 *map units* (fri udspaltning/rekombination). Afstande i *map units* er relative og ikke eksakte fysiske afstande.

For en to-gens analysekrydsning, med dominans i de to loci, findes 4 mulige fænotyper, som inkluderer 2 parentale klasser (ingen overkrydsning) og 2 overkrydsnings klasser (med enkelt overkrydsning, single crossover, SCO). Parentalerne er den klasse med det største antal (Figur 3) og overkrydsninger er den klasse med færrest antal, fordi de er koblede. I nedenstående findes to loci (gener) kaldet A og B. Hvert locus har to mulige allele varianter (henholdsvis A/a og B/b).

Følgende krydsning mellem en dobbelt heterozygot (med allelerne A og B koblet på et kromosom, og allelerne a og b koblet på det andet kromosom) og en dobbelt recessiv homozygot foretages:

$$\begin{array}{ccc} A-B & & a-b \\ \text{---} & X & \text{---} \\ a-b & & a-b \end{array}$$

Afkommet fordeler sig i følgende mulige afkomsklasser, der alle er bestemt af meiose-produkterne fra den dobbelt heterozygote forælder (dobbelt recessive homozygote forælder giver altid 'a – b'). Derfor kan vi for nemheds skyld nøjes man at angive allelerne, der kommer fra den heterozygote forælder:

Parentalerne:	A—B
(ingen overkrydsning)	a—b
Rekombinanter	A—b
Enkelt overkrydsning	a—B

Afstandene mellem to loci (gener) beregnes som:

$$\text{Afstand mellem to gener (map units)} = \frac{\text{antal rekombinanter}}{\text{totalt antal}} * 100\%$$

Er afstanden 50% er der fri udspaltning og dermed ingen kobling. Jo tættere afstanden er på 0%, jo færre overkrydsninger, stærkere er koblingen mellem de to gener og jo større sandsynlighed er der for, at de to gener nedarves sammen.

Formålet med øvelserne:

- At teste Mendels 1. og 2. lov
- At teste effekten af koblede gener

Øvelse 1: To-gens udspaltning – test at Mendels 1. og 2. lov:

For at teste Mendels 1. og 2. lov laver vi et forsøg, hvor vi skal bruge en vildtype (normal) bananfluestamme (kaldet ”+”) og en stamme, der er rent homozygot for to forskellige fænotypiske mutationer (kaldet ”e” og ”vg”).

Opgave 1: Find information om mutationerne her (<http://cgslab.com/phenotypes/>) og indfør som eksemplificeret for 'ebony' herunder. Kromosom-nummeret findes ud for "location". Hvis der her står "3", sidder genet på kromosom 3. Efter kromosomnummeret står positionen – fx "70,7" for ebony, som fortæller, hvor genet sidder på kromosomet (for placering på kromosomet se evt. dette link: https://docs.google.com/document/d/1fGcI9_R8TeTtdhVrAnRR_v8ntYovX1ns-zumMGpqTlg/mobilebasic?viewopt=127). Kromosomnummer 1 er X-kromosomet. Alle mutationer, der angives med lille bogstav er recessive (fx ebony). Dominante skrives med stort bogstav (fx Bar).

ebony (e) (recessiv allele), sort kropsfarve, autosomt – kromosom 3, position 70,7.

vestigial (vg)

Til hver af de efterfølgende har vi sat krydsninger op med 5 jomfruhunner og 5 hanner, mindst 2-3 dage gamle i hvert glas. Efter 2-3 dage, når der er tilstrækkeligt afkom fjernes forælderfluerne. Efter 5 dage kan filterpapir strimler med fordel tilsættes (større overflade til pupperne). 9-10 dage (25 °C) efter de første æg er lagt, begynder de første voksne fluer at klække (Figur 1). Ved 25 °C er fluerne ca. jomfruer i 8 timer. Hvis jomfruer skal samles, fjernes alle klækkede fluer og nyklækkede (jomfrufluer) kan samles i op til 8 timer herefter.

Parentalkrydsningen (1. generations forælderfluer) består af jomfruhunner fra dobbeltmutant stammen, mens hannerne kommer fra vildtypestammen:

Parental krydsning: e/e, vg/vg **hunner** x +e/e+, vg+/vg+ (vildtype) **hanner**

Opgave 2: Hvilke genotyper og fænotyper forventes i F1 afkommet? Lav et Punnet square (krydsningsskema).

Det er smart at bruge jomfru-hunner fra den recessive mutant-stamme, da disse hunner vil producere dobbelt-mutant afkom, hvis de ikke var jomfruer ved indsamling og derfor allerede var blevet parret af en han fra dobbeltmutantstammen. For at tjekke for fejl i P-krydsningen kan F1 derfor nemt tjekkes i forhold til denne forventning.

Afkom fra parentalgenerationen kaldes for F1 generationen. Fluerne i denne generation er heterozygoter i begge de involverede loci (gener). Der sættes nu en krydsning op mellem F1 hanner og jomfruhunner (e/e, vg/vg) fra dobbeltmutant stammen.

F1 krydsning: dobbeltmutant **hunner** (e/e, vg/vg) x F1 **hanner**

Opgave 3: Angiv genotyper og fænotyper for fluerne i denne krydsning. Lav en Punnet square (krydsningsskema) for ovenstående krydsning.

Resultater fra øvelse 1:

- Alt afkom optælles og fænotyper noteres:
- Det forventede antal fluer kan findes ud fra svaret i opgave 3.
- Udfyld tabellen:

Fænotype	Antal fluer observeret	Antal fluer forventet

Øvelse 2: Koblede gener (kortlægning af 2 X-bundne loci)

Til dette eksperiment har vi brugt en vildtype (+) og en dobbelt X-bunden mutant stamme ("w", "m").

Opgave 1: Find information om mutationerne her (<http://cgslab.com/phenotypes/>) og indfør som eksemplificeret for 'ebony' i øvelse 1. Husk at kromosom 1 er X-kromosomet.

white (w)

miniature (m)

Vi har sat følgende krydsning op (med 5 jomfru-hunner og 5 hanner, mindst 2-3 dage gamle pr. glas).

Parental krydsning: w/w, m/m **hunner** x w⁺/Y, m⁺/Y (vildtype) **hanner**

Opgave 2: Hvilke genotyper og fænotyper forventes i F1 afkommet? Lav et Punnet square.

For at tjekke for fejl i P-krydsningen kan F1 nemt tjekkes i forhold til denne forventning. Der er smart at bruge jomfru-hunner fra den recessive mutantstamme, da disse hunner vil producere mutant hun-afkom, hvis de allerede er parret med en han fra mutantstammen (og derfor ikke er jomfruer).

F1 afkommet fra parentalkrydsningen får lov at parre sig indbyrdes og grundlægge næste (F2) generation.

F1 krydsning: **hunner** x **hanner**

Opgave 3: Notér de forventede genotyper af denne F1 krydsning. Lav en Punnet square (krydsningsskema).

Resultater fra øvelse 2:

- Alt afkom optælles og fænotyper noteres i tabellen nedenfor
- Det forventede antal fluer kan findes ud fra svaret i opgave 3.
- Udfyld tabellen:

Fænotyper	Antal han/hun observeret	Antal han/hun forventet

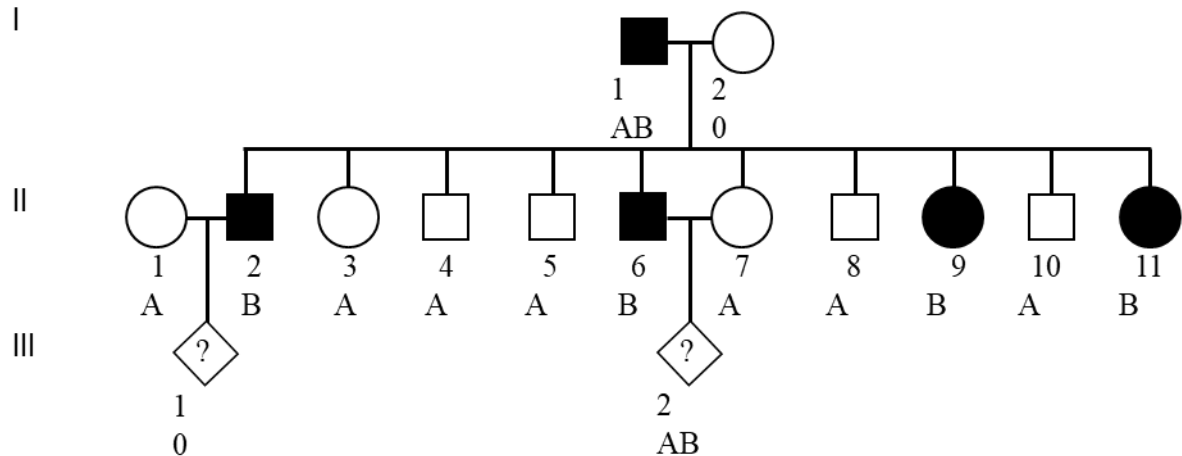
Diskussionsspørgsmål

- Mendels 1. og 2. lov: Øvelse 1
 - Tag udgangspunkt i resultaterne fra øvelse 1 (hvor ebony og vestigial blev undersøgt) og lav en Chi²-test på data.
 - Hvad viser resultatet af Chi²-testen – er forventede og observerede værdier signifikant forskellige/ens?
 - Forklar, om dette forsøg bekræfter Mendels 1. og 2. lov. Begrund hvorfor/hvorfor ikke.
 - Tyder resultaterne på, at mutationerne, ebony og/eller vestigial, påvirker overlevelsen?
- Mendels 1. og 2. lov: Øvelse 2:
 - Tag udgangspunkt i resultaterne fra øvelse 2 (hvor white og miniature blev undersøgt) og lav en Chi²-test på data.
 - Hvad viser resultatet af Chi²-testen – er forventede og observerede værdier signifikant forskellige/ens?
 - Forklar, om dette forsøg bekræfter Mendels 1. og 2. lov. Begrund hvorfor/hvorfor ikke.
- Udregning af afstanden mellem loci (gener):
 - Hvor stor var afstanden mellem de to loci for ebony og vestigial (øvelse 1)? Vis din udregning. Hvad fortæller denne afstand i forhold til, om generne er koblede eller ej?
 - Hvor stor var afstanden mellem de to loci for white og miniature (øvelse 2)? Vis din udregning. Hvad fortæller denne afstand i forhold til, om generne er koblede eller ej?
 - Hvad kan du konkludere ud fra disse beregninger?
- Læs artiklen: <https://ing.dk/artikel/hvorfor-laves-en-stor-del-af-medicinsk-forskning-pa-bananfluer-123923>
 - Af hvilke grunde benyttes bananfluer i forskningsprojekter?
 - Citat fra artiklen: ”for en stor del af de kendte sygdomsgener hos mennesket findes et homologt gen i bananfluer”.

- i. Hvad betyder det, at gener er homologe?
- ii. Hvilken relevans har dette for forskning?

5. Sygdomme og koblede gener

En række personer i en familie er ramt af samme autosomt dominant arveligt betingede sygdom. I nedenstående stamtræ er raske individer hvide, mens syge individer er sorte. Individ III-1 og III-2 er hypotetiske og deres fænotype (og genotype) samt køn er derfor ukendt.



Individerne i stamtræet blev også undersøgt for ABO blodtypesystemet. Blodtypen er angivet i stamtræet under hver person. Sygdomsgenet og blodtype genet er tæt koblet (ingen rekombination) på samme kromosom.

- a. Angiv genotyperne – for både AB0-systemet og sygdomsgenet - for individerne: I-1 og I-2 samt II-6 og II-7 samt mulige genotyper for III-2.
- b. Hvad er sandsynligheden for, at individerne III-1 og III-2 arver sygdommen, hvis der ses bort fra blodtypeoplysningerne.
- c. Givet blodtypeoplysningerne, hvad er nu sandsynligheden for, at individerne III-1 og III-2 arver sygdommen?
- d. For de ekstra hurtige – hvad er sandsynligheden for at individerne III-1 og III-2 arver sygdommen, hvis der er en afstand på 10 map units/centi Morgan mellem loci (altså 10% chance for rekombination)?