



Datasæt og opgaver til molekylær evolution

Denne vejledning indeholder øvelser og opgaver der illustrerer, hvordan man ved hjælp af MEGA kan belyse en række interessante biologiske problemstillinger. Opgaverne i denne vejledning forudsætter at du har et grundlæggende kendskab til programmet MEGA og kan arbejde med alignments, databasesøgning med BLAST, afstandsmatricer og UPGMA-træer i MEGA. Mere information om disse grundlæggende ting i MEGA kan findes i links 3-6 på Bioteknologi 6's hjemmeside. Ny teori der vil blive gennemgået her, er hvordan man med MEGA kan lave en analyse der ved hjælp af det molekylære ur, kan datere forskellige evolutionære hændelser.

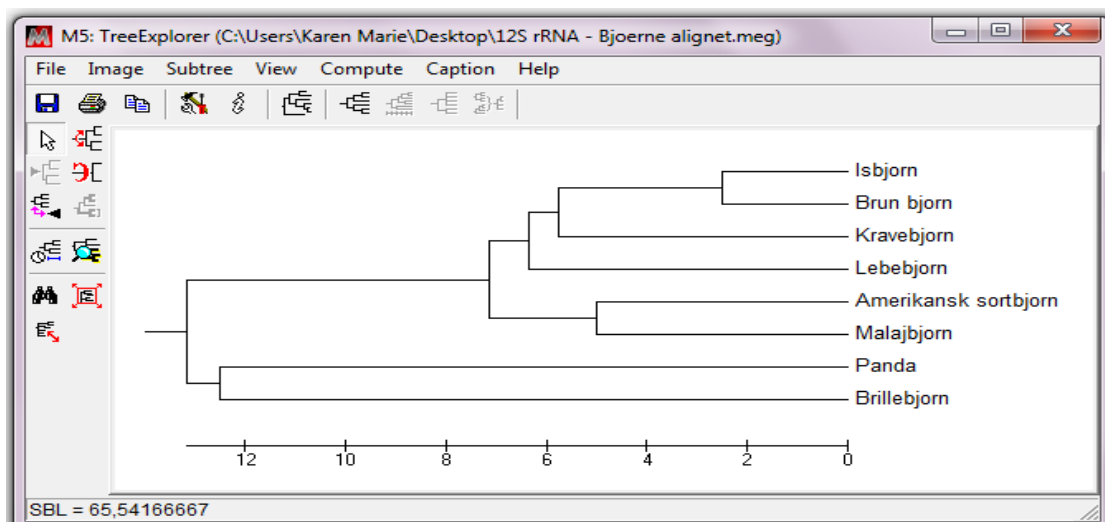
Datering ved hjælp af det molekylære ur i MEGA

Det molekylære ur er et begreb der dækker over den idé, at mutationer opstår med nogenlunde samme hastighed i forskellige arter. I studier af proteinsekvenser i 1960'erne og 1970'erne observerede man i mange tilfælde at antallet af opståede forskelle mellem to homologe sekvenser afhang lineært af, hvor længe siden de to arters udviklingslinjer gik fra hinanden. Læs mere om det molekylære ur på side 34-36 i Bioteknologi 6. Her gennemgås hvordan man ved hjælp af et datasæt og et kalibreringspunkt kan lave et UPGMA-træ i MEGA og datere evolutionære hændelser i dette fylogenetiske træ.

1. Download filen på nedenstående link og indlæs den i MEGA:

www.bioteknologibogen.dk/bioteknologi-6/data/12S-rRNA-Bjoerne.meg

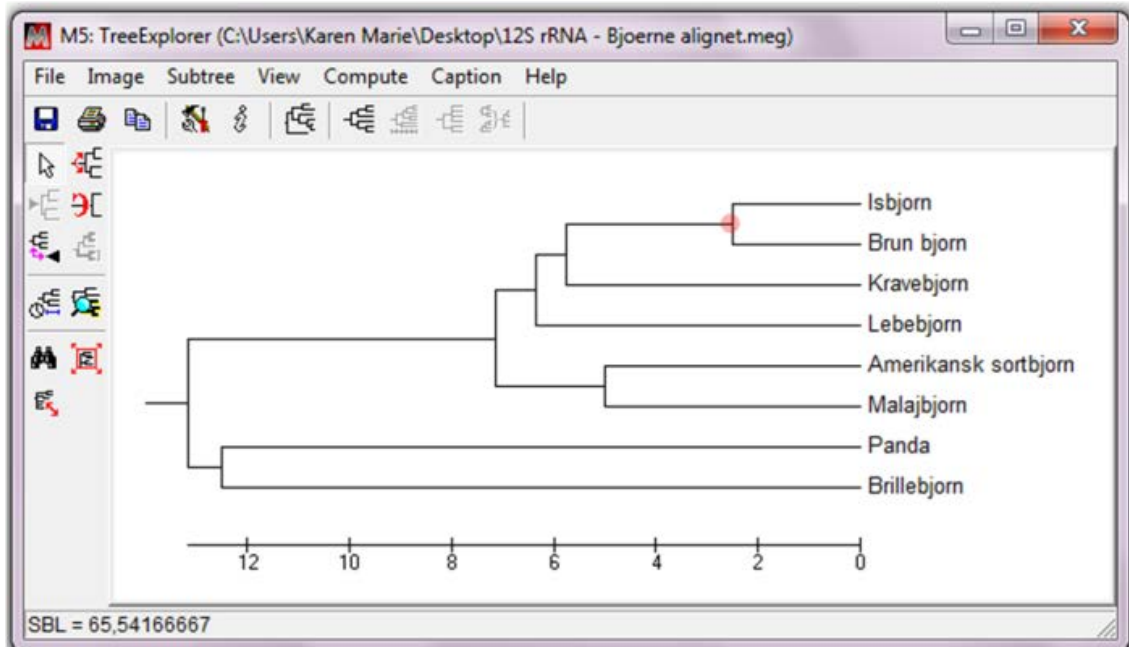
2. Brug MEGA til at lave et UPGMA-træ over den downloadede alignment. Dit skærmbillede skulle nu gerne se ud som vist herunder:



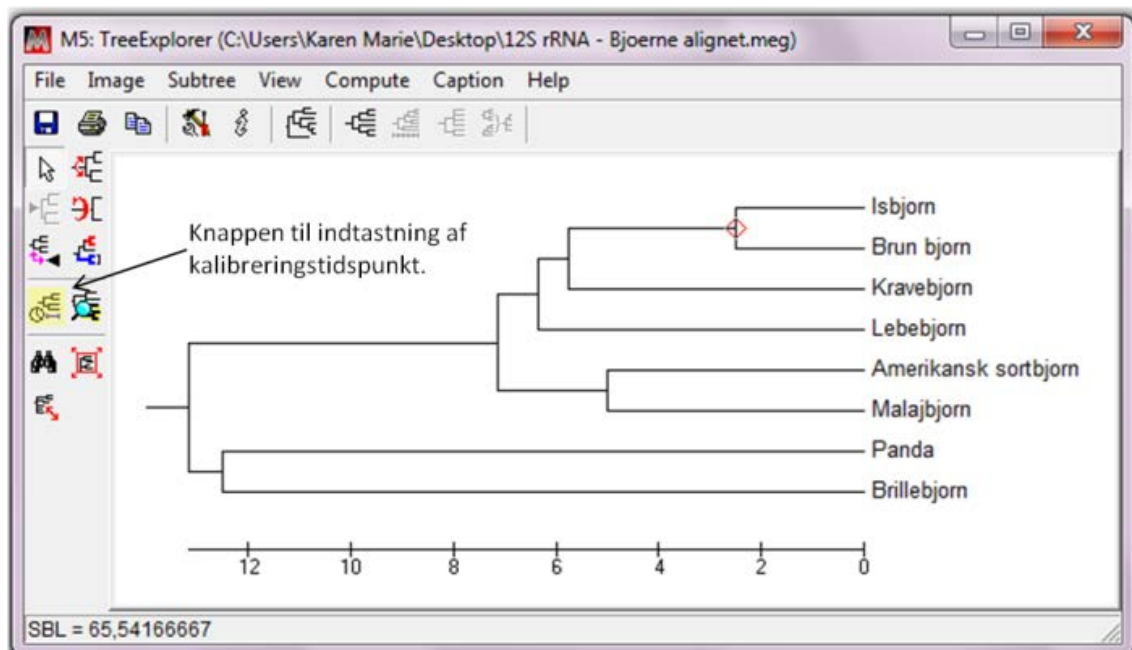
Bioteknologi 6, Tema 12 – Øvelser og opgaver

Linkadresserne fungerer pr. 1.11.2012. Forlaget tager forbehold for evt. ændringer i adresserne

- Nyere forskning tyder på at isbjørnen og den brune bjørns udviklingslinjer blev opsplittet for ca. 600.000 år siden. Tryk på den knude der indikerer denne opsplitning, markeret med rødt på det nedenstående skærmbillede.



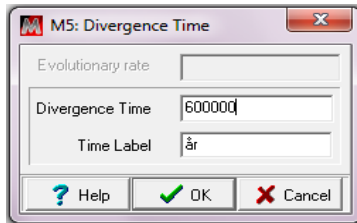
- Knuden bliver nu markeret i programmet med en lille rød firkant. Hvis ikke den røde firkant dukker op som vist på billedet herunder, er det ikke gjort rigtigt! Indsæt kalibreringstidspunktet ved at klikke på knappen der er markeret med gult og en pil på skærmbilledet herunder.



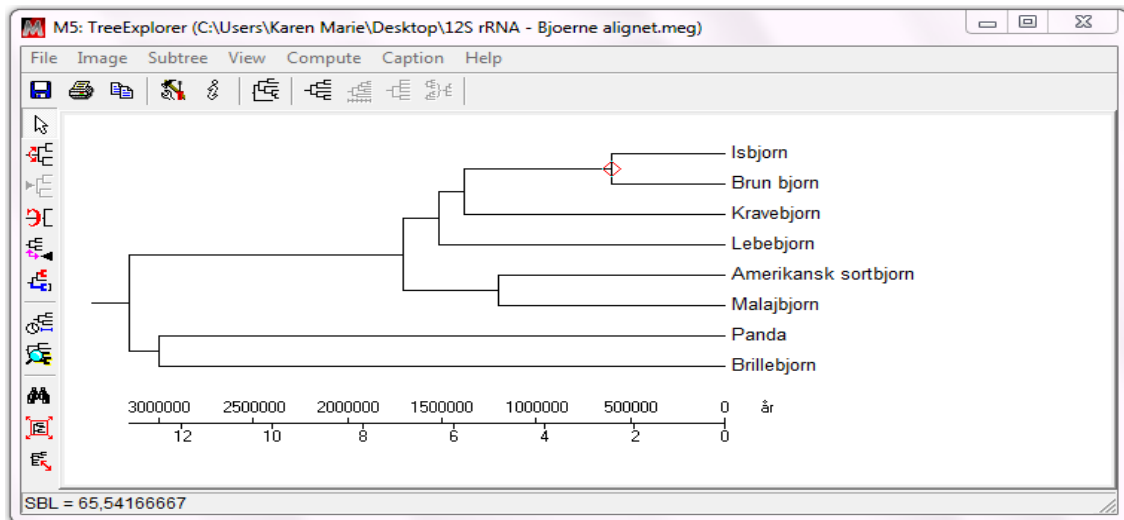
Bioteknologi 6, Tema 12 – Øvelser og opgaver

Linkadresserne fungerer pr. 1.11.2012. Forlaget tager forbehold for evt. ændringer i adresserne

- I det lille vindue indtastes '600000' under feltet 'Divergence Time' og 'år' i feltet 'Time Label'. Det skulle gerne se ud som vist herunder.



- Tryk på 'OK', og fylogien vises igen, men nu med en ny x-akse der viser antal år. Det bør se ud nogenlunde som vist herunder:



- Tidspunkter for opsplnitning af de forskellige udviklingslinjer kan aflæses. Vælg en anden knude i træet ved at klikke på den. Den præcise datering for netop dette punkt kan fås frem ved at trykke på kalibreringsknappen. Hvor lang tid siden skiltes den brune bjørn og den amerikanske sortbjørns udviklingslinjer – og hvad med pandaen og brillebjørnen?

Opgaver om molekylær evolution

Herunder er der to opgaver der begge omhandler molekylær evolution.

Opgave 1. *Knoglen fra Denisova-hulen*

På videnskab.dk kunne man d. 31. oktober 2011 i artiklen 'Gen-spor til Asiens fortid, læse følgende:

En mindst 30.000 år gammel lillefinger fundet i Rusland har i 2010 vist sig at tilhøre en ny og hidtil ukendt mennesketype. Mennesketyper har levet samtidig med vores egen på det eurasiatiske kontinent, men var her antagelig først. Det vides ikke hvornår de uddøde. Den nye mennesketype bliver kaldt denisovanere efter Denisova-hulen i Rusland, hvor lillefingeren blev fundet.

Det er lykkedes en forskergruppe fra Max Planck-instituttet i Tyskland ledet af professor Svante Pääbo, at udvinde, opformere og analysere mitokondrie-DNA fra den fundne lillefingerknogle.

1. Forklar hvordan man fra en enkelt fingerknogle kan opformere mitokondrie-DNA.

Tidligere er det lykkedes samme forskergruppe at udvinde og opformere mitokondrie-DNA fra knogler fundet i huler i Europa, som stammer fra en mennesketype kaldet neandertalerne, *Homo neanderthalensis*. Parvise sammenligninger af mitokondrie-DNA fra to moderne nulevende mennesker, en neandertalknogle fundet i Tyskland, en chimpanse og DNA udvundet fra den fundne lillefingerknogle gav følgende resultater:

	Dansker	Kineser	Neandertaler	Denisovan	Chimpanse
Dansker	0	36	186	365	1383
Kineser		0	186	373	1387
Neandertaler			0	350	1360
Denisovan				0	1389
Chimpanse					0

På følgende link kan du downloade den benyttede alignment der ligger til grund for ovenstående afstandsmatrice:

www.bioteknologibogen.dk/bioteknologi-6/data/DenisovaOpgaven.meg

2. Tegn et UPGMA-træ for de fire mennesketyper og chimpansen.
3. Diskutér hvorvidt denisovanerne bør betragtes som en selvstændig art, inddrag dit fylogenetiske træ.

Det såkaldte molekylære ur er en analysemetode der bygger på den antagelse, at antallet af ændringer der opstår i en DNA-sekvens, afhænger lineært af tiden hvilket vil sige, at jo længere tid siden to arter havde en fælles forfar, jo flere genetiske forskelle vil der være opstået imellem dem.

	År siden fælles forfar	Parvise forskelle
To tilfældige moderne mennesker	100.000	36
Moderne menneske – Neandertaler	600.000	186
Moderne menneske – Chimpanse	5.000.000	1385

Antal parvise forskelle i forhold til tid siden fælles forfar

- Afbild antal parvise forskelle som funktion af antal år siden fælles forfar ud fra ovenstående tabel.
- Estimer ved hjælp af lineær regression på ovenstående data for hvor mange år siden det moderne menneske og denisovanerne havde en fælles forfar.
- Lav en molekylær ur-analyse i MEGA og estimer hvor længe siden det moderne menneske og denisovanerne havde en fælles forfar. Brug et af de angivne dateringspunkter.
- Sammenlign dine to estimater for hvor mange år siden det moderne menneske og denisovanerne havde en fælles forfar og forklar en eventuel forskel.

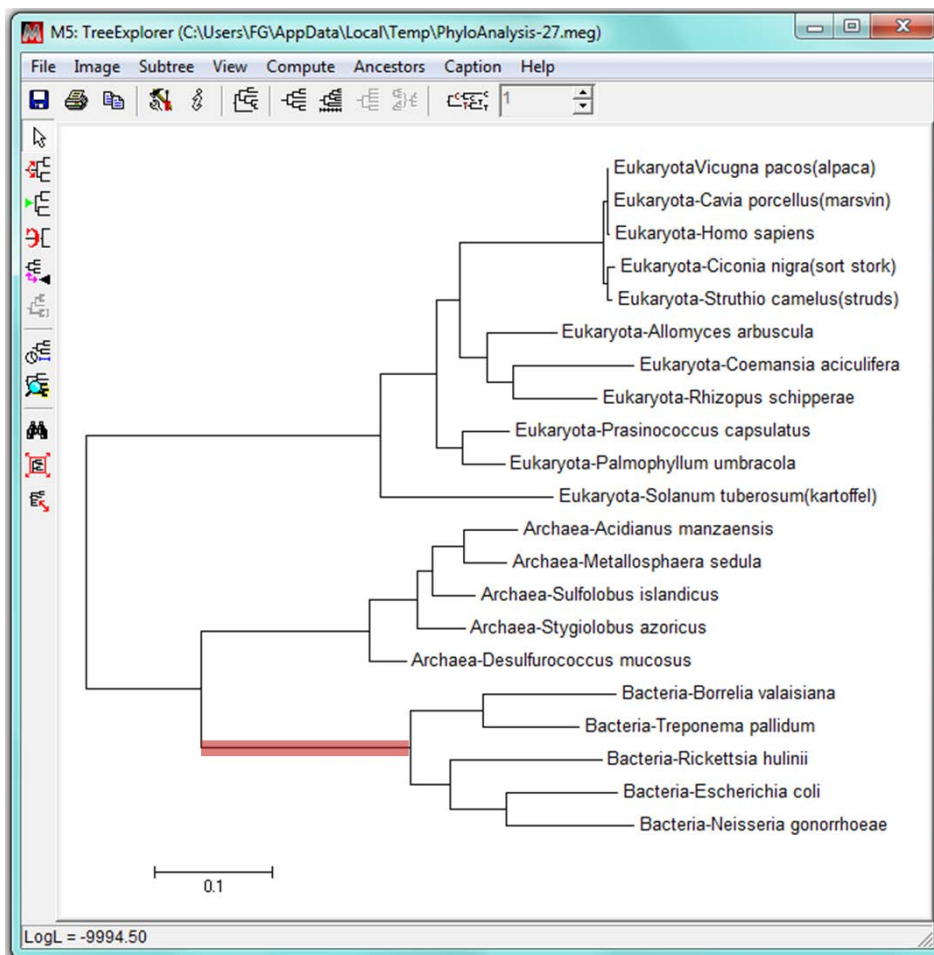
Opgave 2. Livets mangfoldighed

Denne opgave handler om at lave et fylogenetisk træ over meget diverse organismer. På følgende link kan downloades en alignment af 21 forskellige arter. Alignment er et udsnit af de 21 arters 16s rRNA gener. For mere information se Bioteknologi 6, side 36-38.

1. Download alignment fra nedenstående link og indlæs den i MEGA.

www.bioteknologibogen.dk/bioteknologi-6/data/Livets_mangfoldighed.meg

2. Lav et fylogenetisk træ ved hjælp af MEGA, men benyt ikke UPGMA-metoden! UPGMA virker bedst når de forskellige arter er relativt tæt beslægtede og har udviklet sig ca. lige hurtigt i det undersøgte sekvensområde. Dette er langt fra tilfældet her så UPGMA-metoden kan ikke lave et tilfredsstillende stamtræ for de 21 arter. Brug i stedet Maximum Likelihood metoden som er bedre egnet til denne slags data. Træet bør se ud nogenlunde som vist herunder:



3. Analyser det fundne træ, hvilke større og mindre grupperinger finder man?
4. Træet er et urodet træ da den metode der er benyttet, ikke laver en rod på træet. Man kan derfor placere en rod på træet hvor man ønsker det og se konsekvenserne. Prøv at placere roden på træet på grenen ud til bakteriegruppen. Den er markeret med rødt på figuren. Højreklik på grenen og vælg 'Place Root'. Træet passer nu rigtigt fint med videnskabens nuværende bedste bud på livets træ.

Sekvensdatabaser

Denne del af vejledningen er blot en lille linksamling til tre interessante sekvensdatabaser. Ved hjælp af nedenstående databaser kan man selv lave datasæt og besvare interessante biologiske spørgsmål.

GenBank

Link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Den største og mest benyttede sekvensdatabase på nettet. Databasen indeholder både nucleotid- og proteinsekvenser og kan tilgås direkte fra MEGAs Alignment Explorer-funktion. GenBank har mange forskellige mindre databaser som er en delmængde af den store database. En af de mest nyttige kan være Organelle Genome Resources hvor man blandt andet kan finde mitokondriesekvenser fra flere tusinde organismer. Denne mindre del af GenBank kan findes på følgende link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/OrganelleResource.cgi?taxid=2759>

SILVA

Link: <http://www.arb-silva.de/>

Samling af rRNA-gener. Ved hjælp af en hierarkisk taxonomibrowser kan man udvælge de arter man ønsker og så downloade en sekvensfil, man kan arbejde videre med i MEGA. Denne database kan være lidt svær at finde rundt i hvis ikke man kender lidt til latinske navne, men den er rigtig god til hurtigt at lave spændende datasæt med mange rRNA-sekvenser.

mtDB – Human Mitochondrial Genome Database

Link: <http://www.mtdb.igp.uu.se/>

En database der udelukkende indeholder mitokondriesekvenser fra forskellige mennesker. Denne database er rigtig god til at lave sammenlignende undersøgelser af menneskepopulationer.