

Undersøgelse af hyppigheden af allelen *CCR5- δ 32*

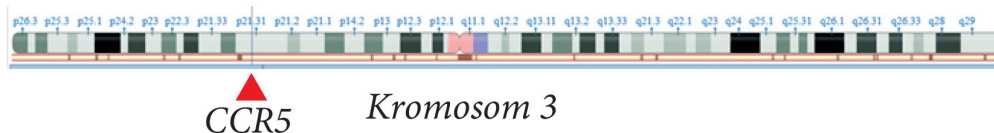
Af: *Kresten Cæsar Torp, Aalborghus Gymnasium*

Indhold

Undersøgelse af hyppigheden af allelen <i>CCR5-δ32</i>	1
Genet <i>CCR5</i> og mutationen <i>CCR5-δ32</i>	1
Opgave:	1
Mutationen, immunforsvaret, HIV og AIDS.....	1
Opgave:	2
<i>CCR5-δ32</i> -allelen, HIV og AIDS	2
<i>CCR5-δ32</i> -allelens udbredelse og evolutionære historie	3
Opgaver:.....	4
Opgave:	4
PCR og gelelektroforese	4

Genet *CCR5* og mutationen *CCR5- δ 32*

Allelen *CCR5- δ 32* er fremkommet som en deletion på 32 basepar (δ 32) i *CCR5-genet*, som befinder sig på den korte arm af kromosom 3, se figur 1.



Figur 1. Placeringen af genet for *CCR5* på kromosom 3.

Opgave:

1. Forklar hvad en deletion er.

Mutationen, immunforsvaret, HIV og AIDS

Genet *CCR5* koder for en membranbunden protein-co-receptor, *CCR5*, som er knyttet til receptoren *CD4* i bestemte hvide blodceller i immunforsvaret, kaldet T-hjælpeceller. T-hjælpeceller spiller en central rolle i at koordinere det specifikke immunforsvar, når det skal lave et målrettet forsvar mod en infektion.

Læs om immunforsvaret, T-hjælpecellernes rolle og *CD4*-receptoren i din fysiologibog.

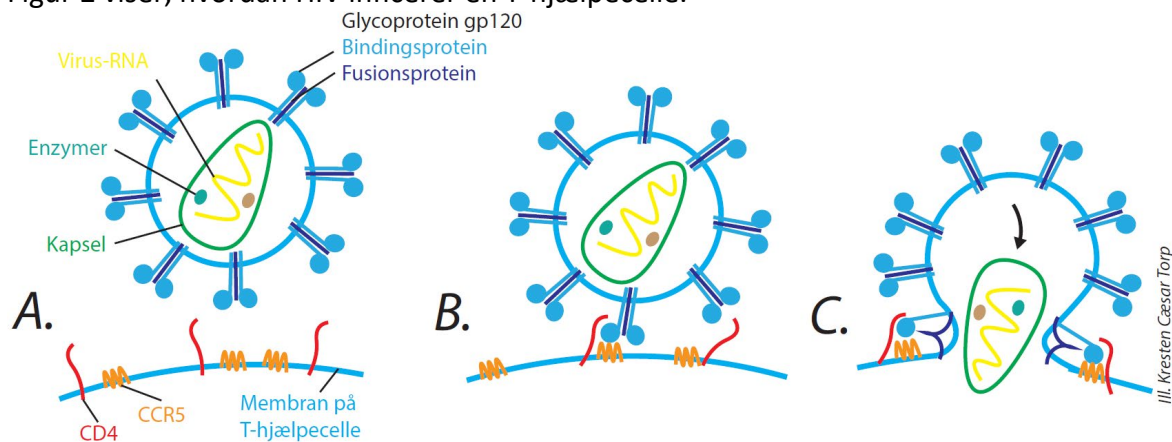
HIV-virus inficerer T-hjælpeceller. Det kan føre til AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome. AIDS i udbrud er karakteriseret ved at det specifikke immunforsvar ikke kan koordineres. Symptomerne er at kroppen ikke kan bekæmpe infektioner som lungebetændelse, svamp og sårinfektioner. Sygdommen er dødelig, hvis ikke den behandles.

Opgave:

1. Find en god oversigtsfigur i din fysiologibog. Forklar forløbet af en immunreaktion i det specifikke immunforsvar ud fra figuren.
2. Opsummer, hvilke roller T-hjælpecellerne spiller i reaktionen.
3. Forklar hvad der sker, med immunforsvaret, hvis HIV-virus inficerer T-hjælpeceller, så antigener i form af HIV-proteiner bliver udstillet på overfladen af netop T-hjælpeceller. Inddrag figuren fra før.
4. Forklar hvorfor dette fører til, at koordineringen af det specifikke immunforsvar svigter, når den smittede for AIDS i udbrud.
5. En traditionel vaccine indeholder uskadeliggjorte virus-partikler eller virus-overfladeproteiner. Forklar hvordan man kan gøre en person immun overfor en sygdom ved at vaccinere med uskadeliggjorte viruspartikler.

CCR5- δ 32-allelen, HIV og AIDS

Figur 2 viser, hvordan HIV inficerer en T-hjælpecelle.



Figur 2. HIV-virus infektion af T-hjælpeceller. A. Opbygning af HIV-virus og placering af receptor og coreceptor i værtscellens membran. B. CD4 og CCR5 bindes til bindingsproteinet på virus. C. Det medfører en reaktion, hvor bindingsproteinerne åbnes, og fusionsproteinet bindes i T-hjælpecellens membran. Det foretager et vrid, hvorved virus- og hjælpecellemembran tvinges sammen, så de fusionerer. Virus' kapsel og arvemateriale kan nu overføres til værtscellen.

Når virus inficerer en celle gør de det ved at viruspartiklens overfladeproteiner bindes til molekyler på cellens overflade, receptorer. Når HIV-virus inficerer T-hjælpeceller, anvender de molekylerne CD4+CCR5 som receptor.

Deletionen CCR5- δ 32 medfører, at medføre, at HIV ikke kan bindes til den ændrede receptor. En person kan være homozygot for normalallelen CCR5 (svarende til: AA), heterozygot (svarende til: Aa) eller homozygot for mutantallelen CCR5- δ 32 (svarende til: aa). For at være modstandsdygtig mod HIV skal man være homozygot for mutantallelen, så der er altså tale om en recessiv allel. Man er ikke garanteret resistens mod HIV, selvom man er homozygot. Visse stammer af HIV kan pga. mutationer benytte en anden coreceptor end CCR5. Mutationen beskytter dog mod de hyppigste.

Opgave:

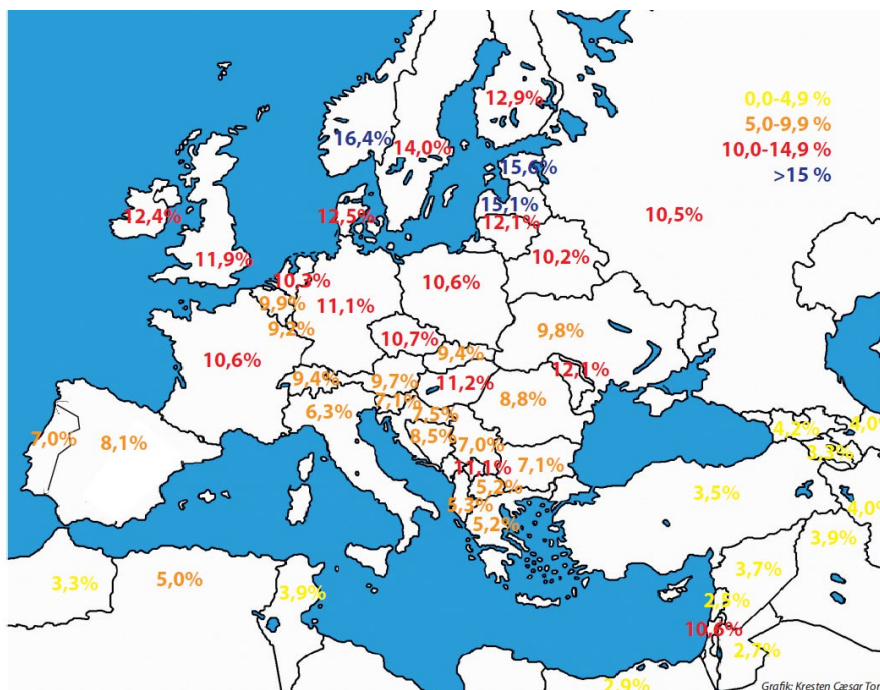
6. Forklar hvordan HIV-virus inficerer en celle, inddrag figur 2.
7. Forklar, hvordan en RNA-virus som HIV (retrovirus) replikerer sig i cellen. Find en god figur i din fysiologibog der forklarer dette, alternativt fra nettet.

8. Giv en mulig forklaring på, hvorfor en mutation kan føre til at HIV ikke længere kan bindes til coreceptoren CCR5, så cellen ikke kan inficeres med HIV. Inddrag din viden om proteiner og proteinsyntese.
9. Forklar, hvorfor man skal være homozygot for deletionen, for at være beskyttet, og hvorfor allelen derfor nedarves recessiv.
10. Forklar, hvordan en RNA-virus som HIV ved mutationer kan udvikle evnen til at benytte en anden coreceptor end CCR5.

CCR5- δ 32-allelens udbredelse og evolutionære historie

Allelen CCR5- δ 32 er særligt udbredt i Nordeuropa, som figur 2 viser, mens den er relativt sjælden i resten af Verden. Det tyder på at der på et tidspunkt i historien er blevet selekteret for allelen i Nordeuropa. Selektionen kan være sket ved at en anden virus på et tidspunkt i historien har benyttet samme receptor for at inficere T-hjælpeceller. Bedste bud er koppe-virus, som har været særligt udbredt i Nordvesteuropa.

Den store forskel til Sydeuropa og resten af Verden tyder til gengæld på at der er sket en selektion imod allelen her.



Figur 2. Frekvens af mutantallelen i lande i og omkring Europa. Frekvensen er beregnet i procent af alle allelerne i befolkningen, hvor hver person har to alleler¹.

Allelfrekvenser for forskellige befolkningsgrupper kan fx findes i artiklen, som der er linket til i fodnoten til figur 2.

¹ Kilde: Solloch, Ute V.; Kathrin Lang; Vinzenz Lange; Irina Böhme; Alexander H. Schmidt; Jürgen Sauter: *Frequencies of gene variant CCR5- Δ 32 in 87 countries based on next-generation sequencing of 1.3 million individuals sampled from 3 national DKMS donor centers*, Human Immunology, Volume 78, Issues 11–12, 2017, p. 710-717, ISSN 0198-8859, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.10.001>. I artiklen er der bl.a. allel- og genotypfrekvenser fra 87 lande. Suppleret med data fra: Libert, F & Cochaux, P & Beckman, G & Samson, Michel & Aksenova, M & Cao, A & Czeizel, Andrew & Claustres, M & De la Rúa, Conchi & Ferrari, Maurizio & Ferrec, C & Glover, G & Grinde, Björn & Güran, Şefik & Kucinskas, Vaidutis & Lavinha, João & Mercier, B & Ogur, Gonul & Peltonen, L & Vassart, Gilbert. (1998): *The delta CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe*. Human molecular genetics. 7. 399-406. 10.1093/hmg/7.3.399.

Opgaver:

11. Forklar, hvordan selektion kan føre til at frekvensen af en bestemt allel i en population ændrer sig over tid.
12. Giv en mulig forklaring på hvorfor det kan have været en fordel ikke at have mutantallelen i andre egne af Verden.

Hardy-Weinberg-ligevægt vil sige, at frekvensen af en allel ikke ændrer sig fra generation til generation.

En population kan forventes at være i Hardy-Weinberg-ligevægt, hvis:

- den er så stor, at tilfældigheder ikke spiller en rolle
- den ikke kan underinddeles i underpopulationer i forhold til den allel man undersøger
- der ikke sker migration
- der ikke kommer nye mutationer
- der ikke sker selektion.

I en tilsvarende undersøgelse i Prag blandt 200 studerende gav 174 prøver resultater. Heraf fra 116 homozygote for normalallelen, 55 var heterozygote og 3 var homozygote for mutantallelen².

Opgave:

13. Gennemgå hver af forudsætningerne ovenfor og diskuter, om den population I undersøger på gymnasiet, kan antages at være i Hardy-Weinberg-ligevægt.
14. Beregn allelfrekvenserne for normalallelen og mutantallelen i den undersøgte gruppe studerende fra Prag. Du kan gøre det ved at tælle sammen.
15. Beregn de forventede genotypfrekvenser for de tre genotyper, hvis populationen antages af være i Hardy-Weinberg-ligevægt. Du kan gøre det ud fra de beregnede allelfrekvenser.
16. Vurder om populationen fra Prag kan antages at være i Hardy-Weinberg-ligevægt.

PCR og gelelektroforese

De to alleler *CCR5* og *CCR5 δ 32* adskiller sig fra hinanden ved ikke at være lige lange. Derfor kan man adskille dem ved at oprense DNA fra celler fra personen, og lave PCR og gelelektroforese.

Ved PCR-processen i denne undersøgelse opformeres et stykke af allelen som kan indeholde deletionen på de 32 basepar. PCR-produktet, dvs. den DNA-sekvens der opformeres, afgrænses af de to primere der anvendes. Afstanden mellem bindingsstederne for de to primere er 189 basepar for normalallelen (*CCR5*, *allel A*) og 157 basepar for mutantallelen (*CCR5- δ 32*, *allel a*).

Primerne har følgende DNA-sekvens:

Forward-primer: 5' CAAAAGAAGGTCTTCATTACACC 3' (basepar 630-653 på *CCR5*-genet)

Reverse-primer: 5' CCTGTGCCTCTTCTTCATTTTCG 3' (basepar 795-818 på *CCR5*-genet)

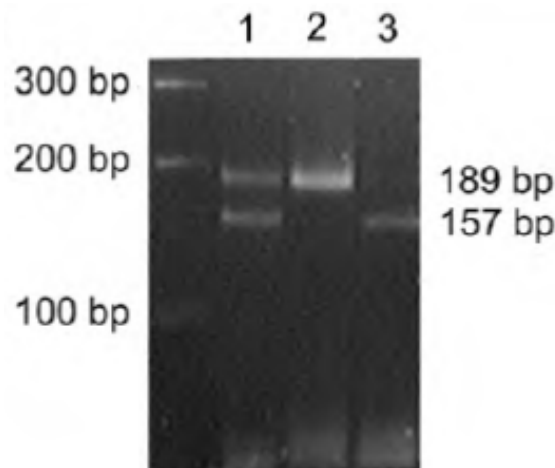
² Alteisek, Lukáš; Jan Černý og Vanda Janštová: *A Simplified Technique for Evaluating Human CCR5 Genetic Polymorphism*, The American Biology Teacher, Vol. 75, No. 9, pages 704–707. Link: <https://abt.ucpress.edu/content/75/9/704>

Opgave:

- Forklar princippet i PCR ud fra figuren i din bog.
- Forklar, hvorfor man både anvender en forward- og en reverse-primer, for at opformere et bestemt stykke DNA.
- Forklar princippet i gelelektroforese, og hvordan det kan adskille DNA-stykker af forskellig længde ud fra en figur i din bog.
- Man kan være homozygot for normalallelen (AA), heterozygot (Aa) eller homozygot for mutationen (aa). Hvilke bånd vil du forvente i gelen for de tre genotyper (kryds af):

Genotype	Bånd i gelen ved:	
	189 bp	157 bp
Homozygot for normalallelen (AA)		
Heterozygot (Aa)		
Homozygot for mutantallelen (aa)		

Figur 3 viser et eksempel på hvordan et resultat fra undersøgelsen ser ud.



Figur 3. Eksempler på resultater. Bane 1: DNA-størrelsesmarkør. Bane 2-3: Prøver fra forskellige personer.

Opgave:

17. Hvor mange bånd vil der vise sig hos en person med genotypen AA , med genotypen Aa og med genotypen aa ?
18. Hvad er funktionen af størrelsesmarkøren i bane 1 (kaldes også "lineal" eller "ladder", fordi den ligner en stige)
19. Analyser resultaterne i figur 3. Hvilke af personerne 1,2, og 3 har genotyperne AA , Aa og aa ?