

Baggrundsviden og opgaver før døgnrytmeundersøgelse

Af: *Andreas Vedel, Aalborg City Gymnasium og Kresten Cæsar Torp, Aalborghus Gymnasium*

Hvordan er vores naturlige døgnrytme?

Se videoen:

[Jessa Gamble: Our natural sleep cycle is nothing like what we do now | TED Talk](#)

Ved **kronotype** forstås en organismes naturlige tilbøjelighed til hhv. at sove og være mest opmærksom eller energisk på bestemte tidspunkter af dagen, altså organismens naturlige døgnrytme.

I denne døgnrytmeundersøgelse skal vi undersøge vores kronotyper nærmere. Om vi er overvejende morgenmennesker eller aftenmennesker.

Vi skal undersøge, om der er en sammenhæng mellem døgnrytme og hvilken genotype man har af genet *Per3*. Undersøgelser tyder på at to alleler forskellige er associerede med søvnmønstre.

Vi skal bruge undersøgelsen til at arbejde med:

- Hvordan komplekse biologiske systemer som døgnrytme reguleres vha. gen-regulering
- Hvordan man kan anvende genetiske associationsstudier til at undersøge betydningen af forskellige genetiske varianter
- ..og så skal vi afprøve nogle metoder: PCR og gelelektroforese.

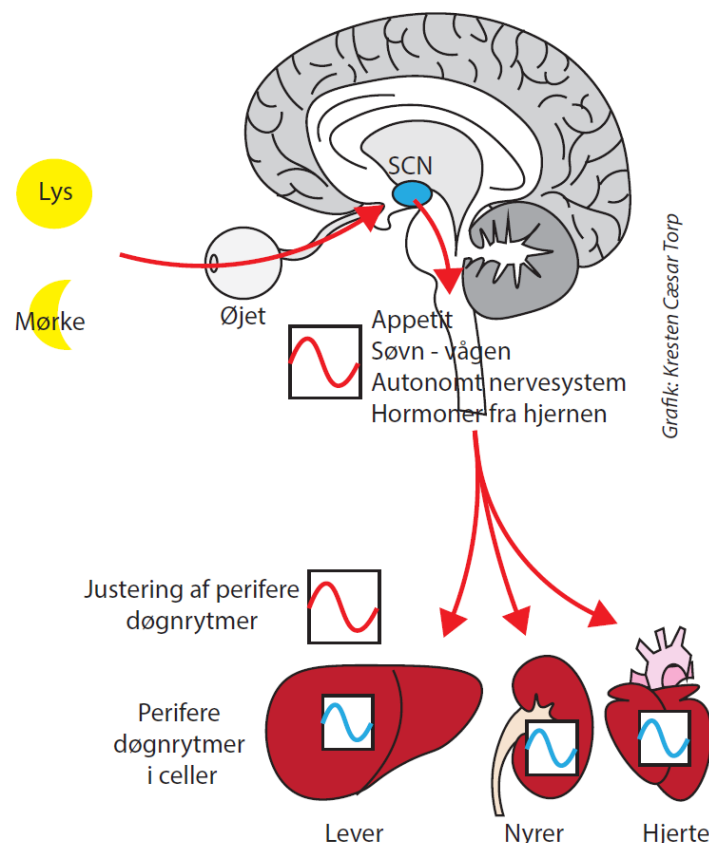
Indhold

Baggrundsviden og opgaver før døgnrytmeundersøgelse	1
Opgave A. Metoden -VNTR, PCR og gelelektroforese	9
Polymerase Chain Reaction (PCR).....	9
Gelelektroforese	10
Opgave B: Den genetiske baggrund for døgnrytme	2
Opgave C. Hvorfor sover vi?.....	5
Opgave D. Genetiske associeringsstudier og biologisk kompleksitet.....	6

Opgave B: Den genetiske baggrund for døgnrytme

Døgnrytmen hos pattedyr er styret af et hierarkisk system, vist i figur 2.

I væv og celler i kroppen er der en autonom døgnrytme, som styres autonomt (selvstændigt) af genregulering i cellen. De har betydning for adfærdsmæssige og fysiologiske rytmer i kroppen. Det overordnede biologiske ur er lokaliseret i et såkaldt SCN-område (suprachiasmatic nucleus) af hypothalamus. SCN synkroniserer de underordnede døgnrytme-gener i andre dele af organismen, i de enkelte celler og væv.

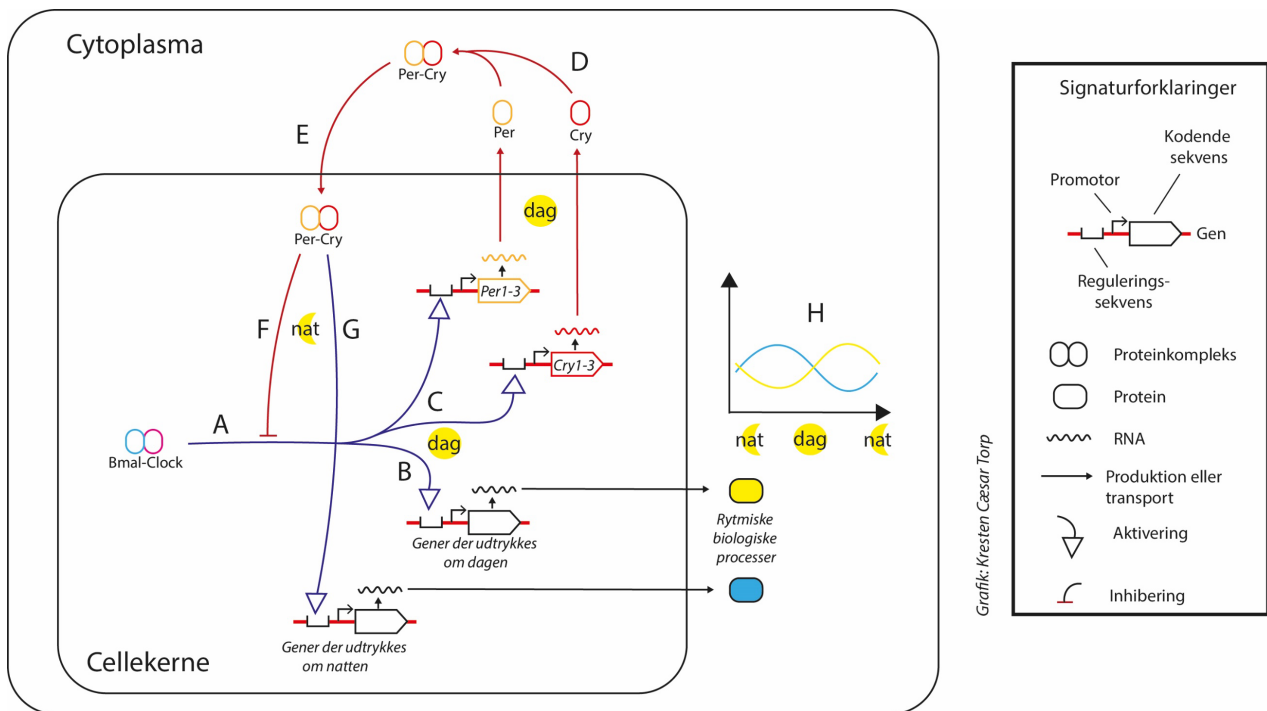


Figur 2

Forenklet illustration af det hierarkiske system i pattedyrs døgnrytme.

De underordnede døgnrytme-gener er bl.a. styret af periodegenerne *Per1*, *Per2*, *Per3*, samt generne *Cry1*, *Cry2*, *Clock* og *Bmal1*.

Figur 3 viser en forenklet udgave af genreguleringen i celler hos pattedyr. Transkriptionsfaktorerne *Clock* og *Bmal* fungerer som aktivatorer af generne *Per* og *Cry*. Reguleringen sker ved feedback med forsinkelse (delay). Forsinkelsen opstår, fordi mRNA fra generne ophobes langsomt i cytoplasma i løbet af dagen, hvor de oversættes til en inhibitor (hæmmer) der så virker om aftenen og natten.

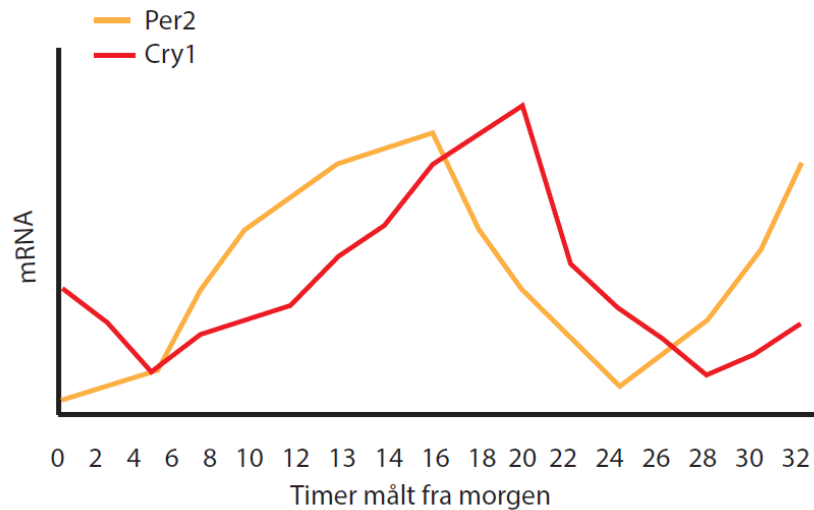


Figur 3

Forenklet oversigt over transkriptionsnetværk for døgnrytme gener i pattedyrs vævsceller

- Proteinkomplekset Bmal-Clock er en transkriptionsfaktor der er central i styring af døgnrytmen i cellerne i kroppens organer.
- Bmal-Clock aktiverer transkriptionen af en række gener, som er aktive om dagen.
- Bmal-Clock aktiverer også generne Per og Cry, som regulerer den molekulære døgnrytme. Der er flere forskellige Per og Cry-gener (Per1-3 og Cry 1-3). Pga. den regulering der beskrives i det følgende, vil de være aktive om dagen.
- mRNA fra Per- og Cry-generne dannes i løbet af dagen og diffunderer ud i cytoplasma. Her translateres de til proteinerne Per og Cry, der tilsammen danner et proteinkompleks, Per-Cry.
- I løbet af dagen ophobes proteinkomplekset Per-Cry i cytoplasma, og det diffunderer ind i kernen. Det bevirker at koncentrationen af Per-Cry i kernen stiger om aftenen og natten.
- Per-Cry er en inhibitor, som hæmmer Bmal-Clock. Det bevirker, at om aftenen og natten mindskes aktiviteten af Per og Cry-generne, og koncentrationen af Per og Cry i cytoplasma falder i løbet af natten. Det bevirker også, at Bmal-Clock ikke aktiverer alle de øvrige gener, som er aktive om dagen.
- Per-Cry fungerer samtidig som transkriptionsfaktor, der aktiverer andre gener, som udtrykkes om natten.
- Feedback-mekanismerne mellem Bmal-Clock og Per-Cry vil på den måde fungerer som et indre ur i cellen. Uret er justeret, så det gentager sin rytme hver 24. time i vores vævsceller. Det indre ur vil bevirke, at der dannes nogle proteiner om dagen og andre om natten. Denne forskel i hvilke proteiner der er aktive i cellen vil fungere som en indre døgnrytme i forhold til cellens forskellige processer og organets funktionsmåde i forhold til kroppen.

Figur 4 viser, hvordan koncentrationen af Per2 og Cry1 varierer i en celle gennem et døgn. I denne type studier starter døgnnet fra morgen (0 timer).

**Figur 4**

RNA-profil der viser transkriptionen af 2 døgnrytme proteiner i leverceller hos mus.

Data på baggrund af Joseph S. Takahashi, Nature Reviews - Genetics, Vol 18 (2017), 164-170: Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock.

Spørgsmål

- Angiv hvilke feedback-motiver kan du udpege i figur 3: positiv eller negativ feedback. Begrund dit svar.
- Skriv en forklaring på forløbet af de to kurver i figur 4. Du skal inddrage figur 3 i din besvarelse.

En væsentlig andel (5-20 %) af genekspressionen (dvs. transkriptionen fra DNA til RNA) i enhver celle eller ethvert væv har vist sig at gennemgå døgnrytmesvingninger på mRNA-niveau. Dette reguleringsniveau er kun et af flere lag i døgnreguleringen af genekspression. Næsten alle reguleringsfaser i genekspression har afsløret yderligere lag af døgnrytme kontrol. Det gælder transkription, splejsning af RNA, transport fra kernen til cytoplama og cellens omgivelser, translation og RNA-nedbrydning.

- Giv begrundede forslag til hvilke evolutionære fordele en organisme har ved at så stor en del af organismens celler udviser døgnsvingninger i genekspressionen?

Opgave C. Hvorfor sover vi?

En ting er døgnrytme, men hvorfor er det egentligt vi ”spilder” 1/3 af vores liv med at sove?
Hvorfor sover alle dyr?

Et konkret bud på hvorfor dyr skal sove, kan være, at hjernen mangler lymfekar, og at rensning af hjernen for affaldsstoffer, særligt amyloid- β -protein, derfor skal foregå på en anden måde:

[Jeff Iliff: One more reason to get a good night's sleep | TED Talk](#)

[Hjerneforsker: Derfor er søvn så vigtig \(videnskab.dk\)](#)

- Se videoen og forklar, hvad forskernes resultater går ud på.
- Diskuter, hvorfor det er væsentligt at få en god nattesøvn.

Hvordan styres vores nattesøvn. I følgende link omtales forsøg med lys og temperatur:

[Derfor er skærmlys ikke godt for din søvn \(videnskab.dk\)](#)

- Hvilke gode søvnråd ville du give på baggrund af artiklen?

Hvad sker der i kroppen under søvnen, og hvorfor er det livsnødvendigt?

[Det gør søvnen ved kroppen \(videnskab.dk\)](#)

- Opsummer, hvilke forskellige gode grunde der er til at sove.

Følgende TED-talk giver en række yderligere gode begrundelser for vigtigheden af søvn.

[Russell Foster: Why do we sleep? | TED Talk](#)

Opgave D. Genetiske associeringsstudier og biologisk kompleksitet

I nyhederne støder man af og til på nyheden om at man har identificeret et gen for en bestemt sygdom. Hvad ligger der egentligt i dette? Hvor sikker er man?

De fleste fænotyper er komplekse træk med flere genetiske og miljømæssige komponenter (dvs. ikke bestemt af et enkelt gen).

Genetiske associeringsundersøgelser er undersøgelser, hvor man tester statistisk for en sammenhæng mellem en bestemt egenskab (fx en sygdom) og bestemte genetiske varianter (genotyper).

Hvis en gruppe af individer der har egenskaben, fx sygdommen, har en højere frekvens af en bestemt allel (eller genotype) end en kontrolgruppe uden egenskaben, kan det tolkes som at der er en sammenhæng mellem at have allelen og at have egenskaben.

Ofte vil resultatet af et genetisk associationsstudie være en procentsats. En allel kan fx være associeret med en 30 % forøget risiko for at udvikle en lidelse.

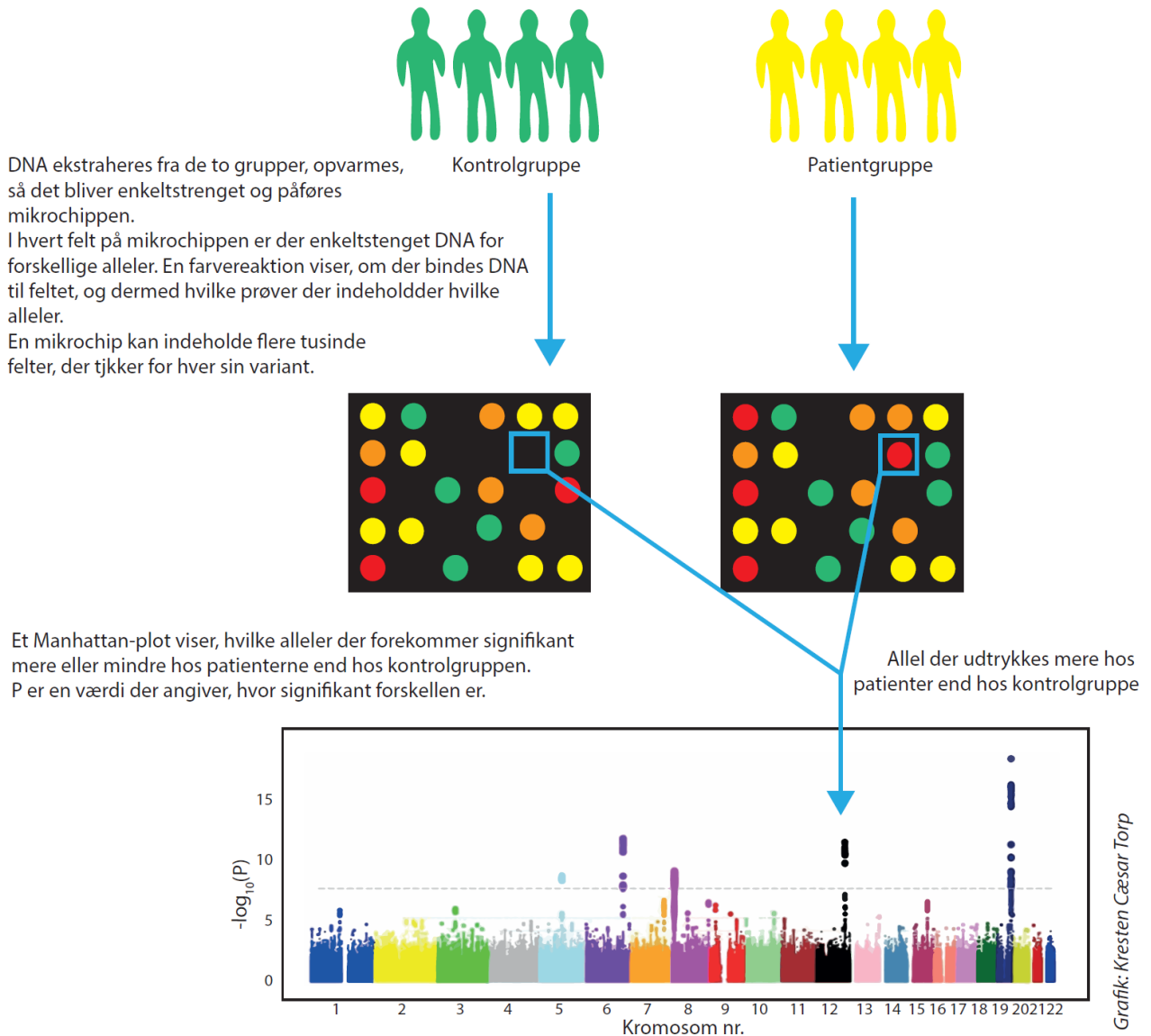
- Forklar, hvordan det forsøg vi skal lave med undersøgelse af døgnrytme, kan betragtes som et genetisk associationsstudie.
- Forklar, hvilken rolle spørgeskemaet spiller i den sammenhæng.

Genetisk associering er vanskelig at påvise utvetydigt og kræver, at der indhentes store mængder af data for at vise en evt. statistisk signifikans.

Næste skridt bliver også at undersøge hvordan sammenhængen i givet fald er.

Er det allelen, der fører til egenskaben? Det at der er en statistisk sammenhæng kan jo fx skyldes at både allelen og egenskaben afhænger af en tredje faktor, eller allelen kan, uden selv at have nogen betydning, flytte med et gen, som så er det, der forårsager egenskaben.

Styrken i associeringsundersøgelser er imidlertid, at man kan blive opmærksom på effekten af alleler, som ellers ikke har en entydig effekt. Man har også muligheden for at tjekke, hvordan et meget stort antal alleler er associerede med en egenskab på samme tid. Det gør man på DNA-mikrochips, se figur 5, hvor man typisk tjekker for flere hundrede tusinde genetiske varianter ad gangen. Dermed kan man opdage flere alleler ad gangen, som er associerede med egenskaben. Mange egenskaber er jo netop et resultat af et komplekst samspil mellem flere gener og miljømæssige faktorer.



Figur 5

Principperne i et såkaldt *Genome Wide Association Study (GWAS)*. Vha. DNA-mikrochips identificerer man genetiske varianter, som findes hyppigere hos gruppen af individer med egenskaben, sammenlignet med en kontrolgruppe. Man kan også lave tilsvarende RNA-mikrochips, som viser, hvilke gener der udtrykkes mere eller mindre hos individer med egenskaben.

Læs fx om et større associeringsstudie, som har peget på 41 alleler, som kan forbindes til depression: [Forskere identificerer 44 gener forbundet med depression \(au.dk\)](#)

- 1) Du får lavet en gentest. Ud fra gentesten kan firmaet som har lavet testen oplyse dig om at du har en allel, der er associeret med en 20 % forøget risiko for depression og en 15 % forøget risiko for hjerte-kar-sygdomme. Hvad kan du bruge disse resultater til?

Som det er tilfældet for mange hypoteser om genetiske forklaringer på komplekse biologiske fænomener, så er evidensen for en forbindelse mellem *per3*-genotyper og søvn-fænotyper ikke entydig.

Nogle undersøgelser[#] antyder at allelen *Per3*⁴ måske findes i højere frekvenser hos individer med en præference for aftenaktivitet, ”B-mennesker”, mens allelen *Per3*⁵ med 5 kopier måske forekommer hyppigere hos individer med en præference for morgenaktiviteter ”A-mennesker”. Andre undersøgelser har dog ikke kunnet vise en signifikant sammenhæng mellem dette VNTR-område og søvnrytme.

- Du får ved en fejl at vide, resultatet af forsøget og dermed din *Per3*-genotype. Det synes du i første omgang er meget sjovt. Senere støder du imidlertid på et studie, som forbinder din genotype med øget forekomst af søvnforstyrrelser og dermed lidt øget risiko for depression og hjertekarsygdomme.

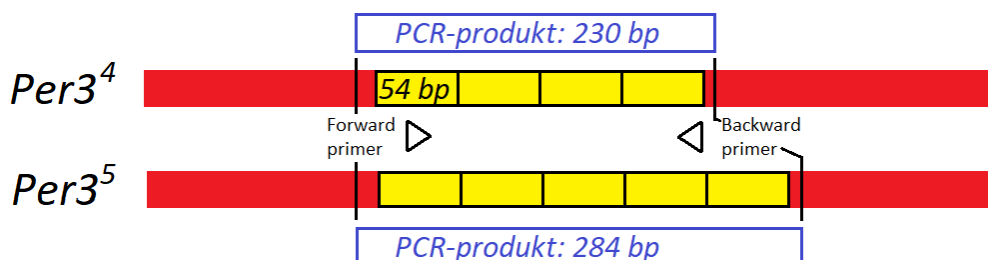
Diskuter hvordan I hver især vil reagere på den viden.

[#] En oversigt kan findes i Joseph S. Takahashi, *Nature Reviews - Genetics*, Vol 18 (2017), 164-170: *Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock*. [Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock \(nih.gov\)](https://doi.org/10.1038/nrg.2017.10)

Opgave A. Metoden -VNTR, PCR og gelelektroforese

Det kodende område af genet *Per3* indeholder et VNTR (Variabel Number of Tandem Repeats), der findes i forskellige (polymorfe) udgaver hos mennesker. Det drejer sig om en DNA-sekvens på 54 basepar, der gentages enten 4 gange i en allel (*Per3*⁴) eller 5 gange (*Per3*⁵), se figur 1.

Da de to alleler har forskellig længde, så kan forskellen mellem *Per3*⁴ og *Per3*⁵ undersøges vha. gelelektroforese. Dog skal det oprensede DNA først opformeres vha PCR. *Per3*⁴ opformeres som et 230-basepar-fragment, mens *Per3*⁵ opformeres som et 284 basepar-fragment, se figur 1.



Figur 1.

De to alleler og de resulterende PCR-produkter.

Vi har som bekendt alle 2 alleler for hvert gen. Dvs. at man som genotype kan have enten *Per3*^{4/4}, *Per3*^{4/5} eller *Per3*^{5/5}.

Vi deltager i en undersøgelse af sammenhængen mellem et større antal gymnasieelevers døgnrytme og deres genotyper i VNTR-området af *Per3*-genet. Jeres data kommer derfor til at indgå anonymiserede i en database.

Undersøgelsen omfatter flg. eksperimenter:

- En oprensning af DNA fra kindceller
- PCR af det oprensede DNA for at opformere VNTR-området i *Per3*-genet
- Gelelektroforese af det opformede DNA.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Spørgsmål:

- Repeter metoden PCR ud fra figuren i bogen.
- Hvad er formålet med at lave PCR på DNA fra celler fra mundhulen?
- Hvilken rolle spiller forward- og backward-primere i processen?
- Angiv i skemaet hvilke længder af DNA (i antal basepar, bp) der opformeres for hver af de tre genotyper. Kryds af:

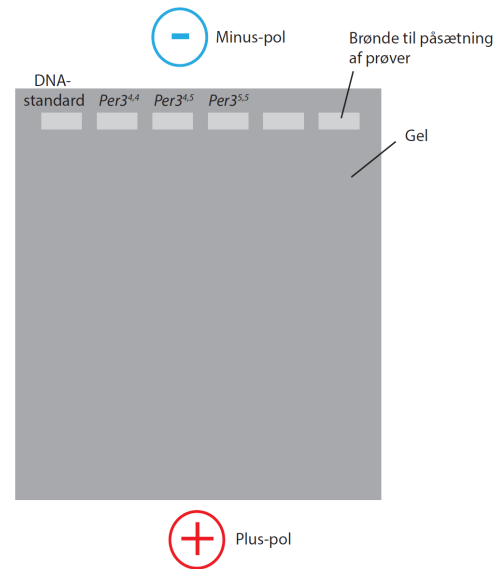
Genotype	230 bp	284 bp
<i>Per3</i> ^{4/4}		
<i>Per3</i> ^{4/5}		
<i>Per3</i> ^{5/5}		

Gelelektroforese

- Forklar princippet i gelelektroforese ud fra figuren i bogen.
- Forklar formålet med at lave gel-elektroforese på PCR-produkterne.
- Forklar, hvordan man kan bestemme længden af de DNA-strengene man sætter på gelen.
- Forklar, hvordan man kan skelne mellem de tre genotyper, når man ser resultaterne på gelen?
Inddrag figur 1.

I elektroforese-eksperimentet anvendes en såkaldt DNA-standard, der indeholder DNA-stykker på hhv 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp,op til 1000 bp.

- Marker på gelen til højre hvor du forventer båndene fra de 10 forskellige størrelser DNA i DNA-standardens vil være placeret efter elektroforesen er løbet til ende.
- Anfør på gelen de forskellige DNA-bånd man kan forvente ved gelelektroforese af genprodukterne fra *Per3*-genet for hver af de tre mulige genotyper: *Per3*^{4/4}, *Per3*^{4/5} og *Per3*^{5/5}. Placer båndene fra genprodukterne i forhold til DNA-standardens i spg. 2 og forklar hvorfor båndene er placeret netop der.



I forbindelse med undersøgelsen selv vurderer forsøgspersonernes deres søvn-fænotyper ved at besvare et spørgeskema om deres egne døgnrytme.

- 1) Hvorfor er det interessant at vide hvordan forsøgspersonerne vurderer deres egen søvnrytme?

Du er nu klar til at læse øvelsesvejledningen til døgnrytmeundersøgelsen 😊