

Anne Fischer¹⁾ och Dean Madden²⁾

¹⁾ Formerly of the Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig

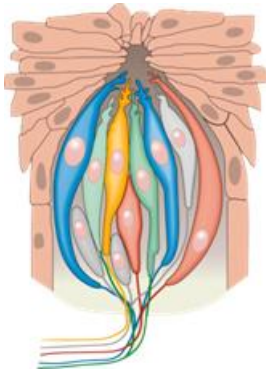
²⁾ NCBE Univ. Reading

DNA till Darwin - Guide för lärare

En fråga om smak

Introduktion

I denna övning finns två fallstudier där eleverna undersöker smakreceptorers evolution i några djur. I den första övningen används proteinsekvensdata för att bilda ett fylogenetiskt träd med hjälp av receptorer för söt, umami och besk smak från sex olika djurarter. I den andra, mer avancerade övningen studeras evolutionen av bitter-smakreceptorer genom genduplikation av DNA sekvensdata. Det ovanliga fallet med jättepandans genom introduceras också.



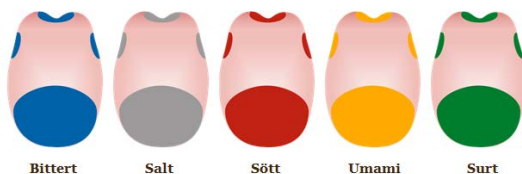
Strukturen av en enkel smaklök. Efter Chandrashekar, J. et al (2006).

En känsla för smak

Säg mig vad du äter så säger jag vem du är

Jean Anthelme Brillat-Savarin, The Physiology of taste, 1825

Under många år trodde man att det endast var fyra huvudsmaker som människan kunde känna: sött, surt, salt och beskt. Sedan år 2000 är det vida accepterat att det finns en femte smak, umami, en smak som man kan associera till aromatisk mat som kött. Mononatriumglutamat och sojasås har smaker karakteristiska för umami. Alla andra smaker tror man kommer från stimulering av dessa fem receptorer, på ett liknande sätt som en liten skala av olika ljusreceptorer i ögat ger känslighet för hela det synliga spektrumet.



Distribution av smakreceptorer på människans tunga. Efter Chandrashekar, J. et al (2006).

Korrespondens
E-post:

De fem smakerna indikerar salt, enkla kolhydrater (sött), sura smaker, associerade med mogen frukt och när det är mycket surt, nästan ruttet (surt), giftiga ämnen (beskt) och proteiner (umami). Fördelen av att djur kan upptäcka dessa ämnen är uppenbar.

I motsats till vad som skrivs i vissa läroböcker, finns receptorerna för de fem huvudsmakerna distribuerade över hela tungan (också över gommen och svalget) och är inte bara lokaliserade till vissa områden. Detta beror på att varje smaklök troligtvis består av en bunt med 50-150 receptorceller som är känsliga för var och en de olika huvudsmakerna.

Allt eftersom de fysiologiska och molekylära mekanismerna för smak har blivit bättre förstådda, har man diskuterat existensen av andra receptorer som svarar mot specifika ämnen (som mentol, stärkelse och fett), särskilt hos andra djur än människan.

Receptorer för besk smak

Receptorer för besk smak spelar en viktig roll för att man skall undvika att äta toxiska och giftiga ämnen (sådana som växtalkaloider). Dessa receptorer tror man har den enklaste strukturen. De består av T₂R proteiner som är förankrade i cellmembranen i smakreceptorcellerna. Proteinerna kodas av TAS₂R gener.

Mammalier lever i många olika omgivningar och är därför anpassade till olika dieter och har utvecklat passande sensoriska receptorer. Hos det mänskliga genomet har 25 receptorgener för besk smak identifierats; i musgenomet finns 33 gener.

Genduplikation, nya gener och pseudogener

Var och en av den stora mängden av receptorer för besk smak är kodad av en något annorlunda gen, som har uppstått genom genduplikation och därefter en mutation. Detta är en av de vägar som nya gener uppstår på. Duplikationsprocessen är inte lätt att förklara. Den kan uppstå på flera sätt och det är fortfarande oklart exakt hur detta sker.

Initialt är de två genkopiorna identiska och delar samma funktion. Allteftersom mutationerna ackumuleras på genkopian kan detta leda till uppträdandet av en ny gen med en ny funktion. Men vanligtvis kommer mutationer att fördärva en av kopiornas funktioner. Denna process leder till uppträdandet av en pseudogen, en inaktiv version av genen. Hos människan har tio pseudogen receptorer för besk smak identifierats; hos musen, endast tre. Pseudogener är användbara vid evolutionära studier, eftersom de bildar "fossilavtryck" i genomet.

Vilket öde som den nya kopian av genen än tar, så utvecklas den snabbare. Detta är ett resultat av det minskade selektiva trycket som verkar på genen och som reflekteras i ett större antal mutationer som ackumuleras i den duplicerade genen.

I den andra övningen i denna fallstudie skall eleverna jämföra två receptorer för besk smak från sju primater (inklusive människan) och försöka bestämma vilken av

dem som är kopian (dvs. den med störst antal mutationer).

Receptorer för söt smak

De flesta djur söker gärna frukt som föda, sådant som för människan smakar sött. Denna mat är en viktig kolhydratkälla och värdet av att känna igen denna mat, liksom att man känner igen beskt smakande giftiga ämnen, är uppenbar.

Smakreceptorerna för söt smak kan "luras", eftersom de reagerar på artificiella sötningsmedel som aspartam och acesulfam-K, vilka inte är kolhydrat. Detta gäller dock inte för alla djur.

Receptorerna som reagerar på söta smaker består av två delar. Proteinet T_1R_3 är bundet till ett annat liknande protein, som kallas T_1R_2 . T_1R_3 kodas av en gen som heter TAS_1R_3 och T_1R_2 kodas av TAS_1R_2 .

Man har funnit att varianter (polymorfism) av genen TAS_1R_3 leder till olika smaker av sött. Detta kan vara en orsak till att olika personer har olika födopreferenser.

Vissa djur, som katter och kycklingar kan inte känna söt smak. Hos katter beror detta på, att genen som kodar för T_1R_2 , har ackumulerat mutationer och blivit en icke fungerande pseudogen. Hos kycklingar saknas genen.

Receptorer för umami-smak

Aminosyror och små peptider, som visar på proteiner i vår föda, upptäcks också genom tvådelade receptorer. Här är emellertid T_1R_3 proteinet bundet till ett T_1R_1 protein (kodat av TAS_1R_1) i stället för ett T_1R_2 . Detta är basen för umamismak eller för något välsmakande.

Jättepandor

Hos jättepandor har genen som kodar för T_1R_1 fått två mutationer, en två baspars insertion (´GG´) och en fyra baspars deletion (´GTGT´). Dessa mutationer gör att genen blir icke-funktionell och liksom TAS_1R_2 genen hos katter har den blivit en pseudogen. Konsekvensen av detta är att pandor i motsats till andra björnar, inte kan känna köttsmak.

I första övningen, skall eleverna använda proteinsekvens data för att bilda ett fylogenetiskt träd för receptorer för söt, umami- och beskt smak från åtta djurarter. När det gör detta, kan de fundera över i vilken ordning, som de olika generna utvecklades och smakupplevelser hos olika arter.

Intressant läsning

The making of the fittest. DNA and the ultimate record of evolution by Sean B. Carroll (2009) Quercus Books (Paperback) ISBN: 9781847247247. En populär beskrivning av några molekylära bevis för evolutionen.

Reading the story in DNA: A beginner's guide to molecular evolution by Lindell Bromham (2008) Oxford University Press (Paperback) ISBN: 978 0199290918.

En fängslande bok om molekylär evolution, som inte kräver matematiska specialkunskaper, men tar med läsaren från de första principerna. Även om den är skriven för studenter innehåller denna utomordentliga bok tillräckligt med detaljer även för doktorander, trots att delar vänder sig lika mycket till 16-19-åringar.

Artikeln som den första aktiviteten i denna studie baserar sig på (Shi och Zhang, 2006) presenteras också som en fallstudie i denna bok.

Vetenskapliga skrifter

Alla dessa dokument utom Chandrashekar et al kan hämtas gratis från nätet.

Fischer, A. et al (2005) Evolution of bitter taste receptors in humans and apes. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (3) 432-436. doi: 10.1093/molbev/msio27. Den andra aktiviteten i denna laboration grundar sig på denna artikel.

Li, X. et al (2005) Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLoS Genetics*, 1, 27-35. doi: 10.1371/journal.pgen.0010003. Varför inte katter kan känna söt smak.

Shi, P. and Zhang, J. (2006) Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2) 292-300. doi: 101093/molbev/msjo28. Den första aktiviteten i denna laboration baserar sig på denna artikel.

Chandrashekar, J. et al (2006) The receptors and cells for mammalian taste *Nature*, 444, 288-294. doi: 10.1038/nature05401. En allmän review artikel (kan erhållas mot betalning).

Breelin, P. and Spector, S. (2008) Mammalian taste perception. *Current Biology*, 18 (4) R140-R155. doi: 10.1016/j.cub.2007.12.017. Beskriver hur mammalier uppfattar smak.

Ruiquiang, L. et al (2010) The sequence and *de novo* assembly of the giant panda genome. *Nature*, 463, 311-317. Doi: 10.1038/nature08696. Varför jättepandor inte kan känna köttsmak.

Vad behövs

DNA mjukvara

Mjukvaran *Geneious* behövs. Den kan laddas fritt ner från: www.geneious.com. Mjukvaran finns för Windows, Macintosh och Linux system. Endast den fria basversionen av mjukvaran behövs för dessa aktiviteter.

DNA sekvens data

För den första aktiviteten behöver eleverna *Geneious* dokumentet som innehåller de 18 aminosyressekvenser som finns för T1R1, T1R2 och T1R3 smak receptorer: T1Rproteins.geneious

För den andra övningen behöver eleverna *Geneious* dokumentet som innehåller 14 färdig alignade DNA sekvenser för receptorer för besk smak: Bittertastereceptors.geneious.

Elevernas arbetsblad

Eleverna behöver kopior av arbetsbladen 5-9 för den första aktiviteten.

Den andra övningen beskrivs på arbetsbladen 11-21.

Sidan 10 beskriver jättepandans okänslighet för köttsmaker och kan användas till att främja diskussioner om evolution eller som en utvidgad aktivitet eller hemarbete.

Presentation

Det kan vara till hjälp för lärare att använda *QuickTime* animationen och *PowerPoint* eller *Keynote* presentationerna när man introducerar denna övning. *QuickTime* kan laddas ned gratis från Apples webbsida: www.apple.com/quicktime.

Undervisningens mål

Övningen förstärker elevernas förståelse för proteiner och DNA struktur samt för mutationer. Den introducerar alignment-principen. Flera evolutionära begrepp introduceras.

Kunskap som är nödvändig att ha innan man börjar övningen

Innan man börjar någon av övningarna är det fördelaktigt om eleverna har utfört "Simulera evolutionen" och/ eller "Att bygga ett fylogenetiskt träd" som finns beskrivna i *Bioscience Explained* nr 6:2.

Eleverna behöver förstå strukturen av DNA och proteiner. De måste ha undervisats i principen för sekvens alignment. Kunskap om cellmembranens struktur är också värdefull.

Svar på arbetsbladens frågor

Sid 4

- a. Sött indikerar vanligen snabbt tillgängliga kolhydrater.

Något surt visar t ex att frukt är mogen och när det är mycket surt, att maten är dålig (fast viss sur, jäst mat är mer närande eller lättare att smälta).

Beskt indikerar närvaron av toxiner och att en viss substans inte bör ätas.

Salt visar natriumjoner (eller andra joner) som är viktiga för överlevnad.

Umami visar närvaro av protein.

b. Se nedanstående tabell:

SMAK	INVOLVERADE GENER	KODADE PROTEINER
Umami	<i>TAS1R1 + TAS1R3</i>	T1R1 + T1R3
Sött	<i>TAS1R2 + TAS1R3</i>	T1R2 + T1R3
Beskt	<i>TAS2R</i>	T2R

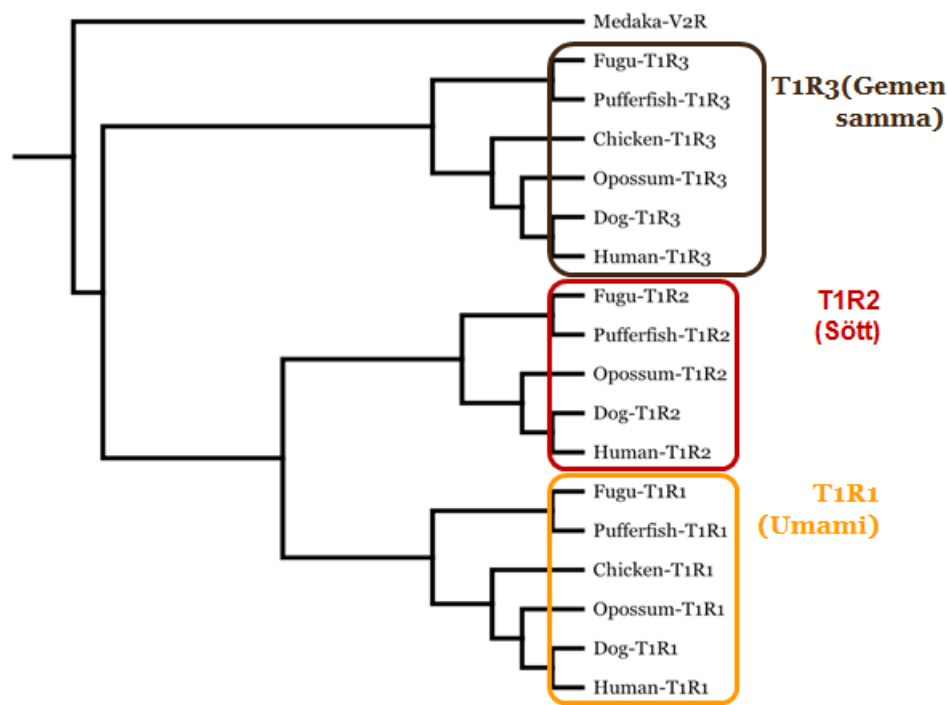
Sid 9

- c. De tre grupperna innehåller proteinerna T1R3, T1R1 och T1R2 (se nedan).
- d. Den gemensamma förfadern bör vara ytterst till vänster på trädet.
- e. T1R1 och T1R2 är närmare släkt med varandra än de är till T1R3, eftersom de delar en yngre gemensam förfader än den som de delar med T1R3.
- f. T1R3 tycks ha utvecklats först, följt av T1R1 och T1R2.
- g. Förmågan att känna söta smaker utvecklades förmodligen först, eftersom längden på den grenen är störst (eleverna bör försäkra sig om att "Transform: proportional" har valts i tree formatting panel).
- h. Se tabellen nedan:

ORGANISM	T1R1	T1R2	T1R3
Pufferfish	V	V	V
Fugu	V	V	V
Hund	V	V	V
Människa	V	V	V
Opossum	V	V	V
Kyckling	V	X	V

Från tabellen framgår att kycklingar troligtvis inte kan känna smak av socker, eftersom de saknar det nödvändiga T1R2 proteinet.

- i. Data i tabellen kan vara missledande om sekvenserna och generna för några arter inte finns med.



Phylogenetic tree of T1R taste receptors

Sid 14

- a. Ja, sekvenserna liknar varandra mycket.
- b. Det finns 945 baser i T2R16 och 951 baser i ps1.
- c. Eftersom det är fyra olika baser i DNA, är sannolikheten att en av baserna är samma är 1 på 4 (0,25). Sannolikheten att två efter varandra följande baser är samma är $0,25 \times 0,25 \dots$ tre efter varandra följande är $0,25 \times 0,25 \times 0,25 \dots$ etc. Att omvandla siffran du fått fram till "en på x", dela helt enkelt 1 med t.ex. $1 : 0,25 = 4$; 1 chans på 4. Sannolikheten för att 10 efter varandra följande nukleotidbaser skall vara identiska i två sekvenser är 1 på 1.048.576. Sannolikheten för att 20 efter varandra följande nukleotidbaser skall vara identiska i två sekvenser är 1 på 1.099.511.627.776. Sannolikheten för att alla DNA sekvenserna hos de sju primaterna skall vara lika för bara 10 baser är mycket liten. Detta visar starkt på att de sju primaterna har ett gemensamt ursprung. (Denna beräkning förklarar också varför PCR kan plocka ut och mångfaldiga en specifik del av DNA från ett helt genom, genom att använda primers som vanligen är endast 20 baser i längd).

Sid 15

- d. DNA sekvenserna ser olika ut, men det finns tillräckliga likheter som gör att de kan vara besläktade med varandra.
- e. Verktygen som eleverna har träffat på i Geneious är trädritarfunktionen (som klumpar ihop liknande gener)

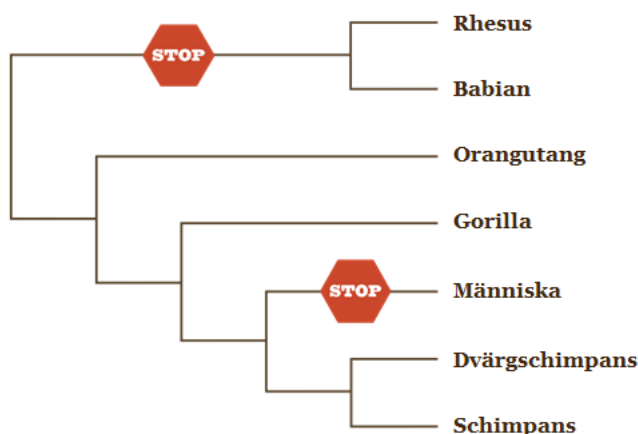
och möjligheten att jämföra par (och även grupper) av DNA sekvenser, som visas i Statistics panel.

Sid 17

- f. Sekvenserna som motsvarar varje gen är ihopklumpade.
- g. Detta innebär att de två receptorerna fanns hos förfärderna till alla dessa primatarter och att duplikationen skedde innan arterna divergerade.
- h. DNA sekvenserna hos de två genuppsättningarna skiljer sig åt och de bildar därför olika fylogenetiska träd.

Sid 19

Titta på positionerna av "Stop" mutationer på trädet nedan:



Två "Stop" mutationer skall bli synliga i proteinsekvens data. Det är inte möjligt att exakt bestämma var på trädgrenarna som mutationerna har skett, men eftersom en "Stop" mutation delas mellan rhesusapa och babian och inte finns hos någon annan art, så måste den ha skett på grenen till dessa två arter.

Mutationen på grenen till människan är unik för människan och måste därför ha skett efter att människan divergerat från schimpansen och dvärgschimpansen.

"Stop" mutationer finns i slutet av proteinet hos rhesusapan och babianen, så det är oklart om proteinets funktioner är helt stoppat. Proteinets funktioner är helt stoppat, men det kan fortfarande fungera.

Sid 20 och 21

Antal baser

Genpar	Receptor T2R16		Receptor ps1	
	Delade	Olika	Delade	Olika
Människa-Schimpans	941	4	935	16
Människa-Dvärgschimpans	941	4	937	14
Människa-Gorilla	934	11	938	13
Människa-Orangutang	927	18	918	33
Människa-Rhesus	900	45	900	51
Människa-Babian	900	45	897	54

Procent baser

Genpar	Receptor T2R16		Receptor ps1	
	% gemensamma	% olika	% gemensamma	% olika
Människa-Schimpans	99.6	0.4	98.3	1.7
Människa-Dvärgschimpans	99.6	0.4	98.5	1.5
Människa-Gorilla	98.8	1.2	98.6	1.5
Människa-Orangutang	98.1	1.9	96.5	3.5
Människa-Rhesus	95.2	4.8	94.6	5.4
Människa-Babian	95.2	4.8	94.3	5.7

I dessa tabeller är endast de mutationer som sker mellan människor och andra primater listade. Det finns ett stabilt mönster som visar att antalet mutationer som sker på ps1 alltid är större än de som sker på T2R16. Detta kan förklaras med minskad spänning.

- i. ps1 har ackumulerat störst antal mutationer.
- j. ps1 tycks därför vara under minst selektionstryck.
- k. Det beror helt och hållet på vad du är ute efter, men T2R16 är stabilast och är troligen därför en bättre indi-

kator på evolutionära släktskap under många förhållanden. Eftersom *ps1* är under mindre selektionstryck (det kan vara en pseudogen som ligger "sovande" i genomet), kan den vara mindre användbar.