

Expressed genes and natural selection

Functional gene products and
their importance in ecological
studies

Genetic markers

- **Coding DNA (genes)**
- transcribed sequences
- genetic code
- phenotype
- natural selection
- **Non-coding DNA**
- not functional (not known function)
- neutral to natural selection
- majority of DNA in eukaryotes
- pseudogenes
- repetitive DNA

Expressed DNA segments - genes

- strict nucleotide structure (see Molecular biology)
- exons and introns, START and STOP codons etc.
- transcription + translation → phenotype
- oligogenes - qualitative traits (f.e. homeotic genes, Wnt ligands)

Why genes in molecular ecology?

- functional importance - genetically determined variation
- gene products are not visible by standard ecological methods, but play a significant role in ecology, evolution and behaviour of animals
- it is necessary to use molecular methods to identify their variation
- expressed genes are selected by natural selection
- increasing importance in zoological and ecological studies (vs. neutral variation - mtDNA, microsatellites etc.)

Metody studia funkční variability

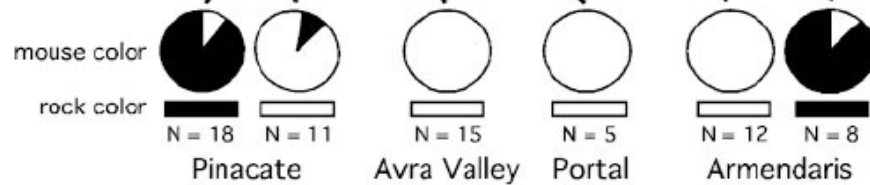
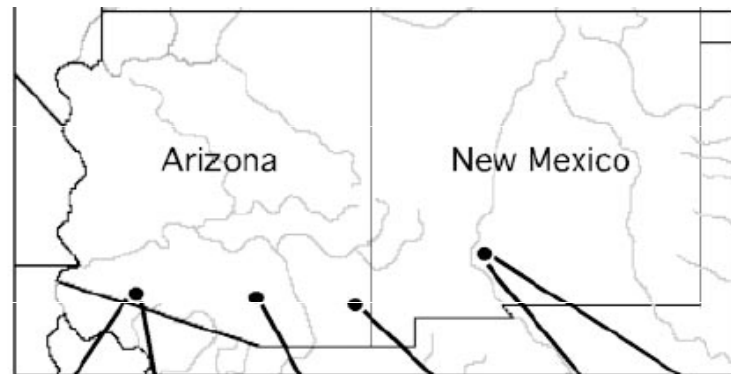
- Sledování kandidátních genů

- Genomické přístupy
(mnoho genů najednou)

pytlouš

Chaetodipus intermedius

Hoekstra, Nachman et al.

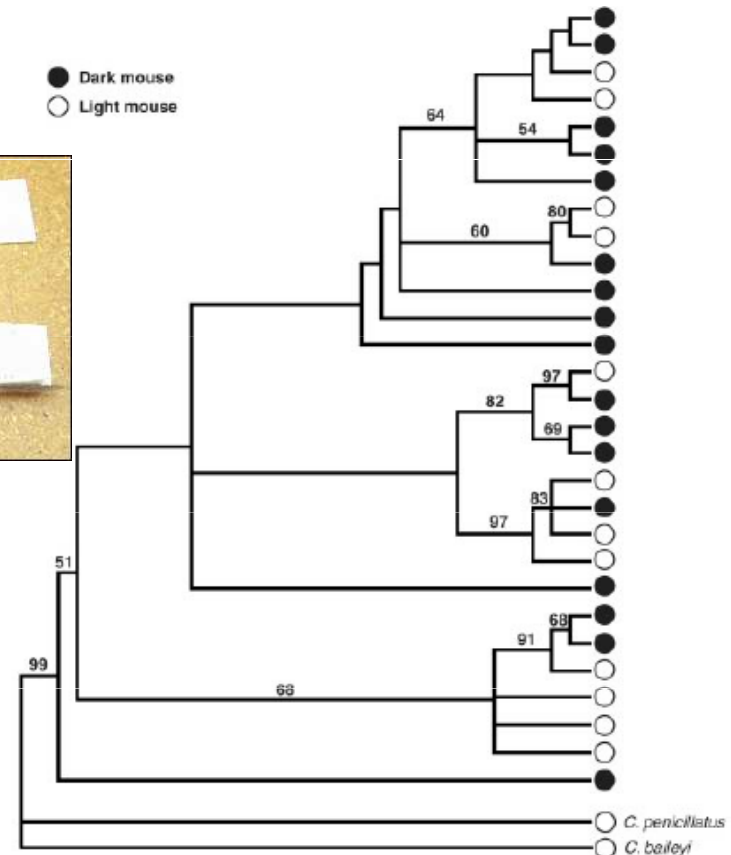
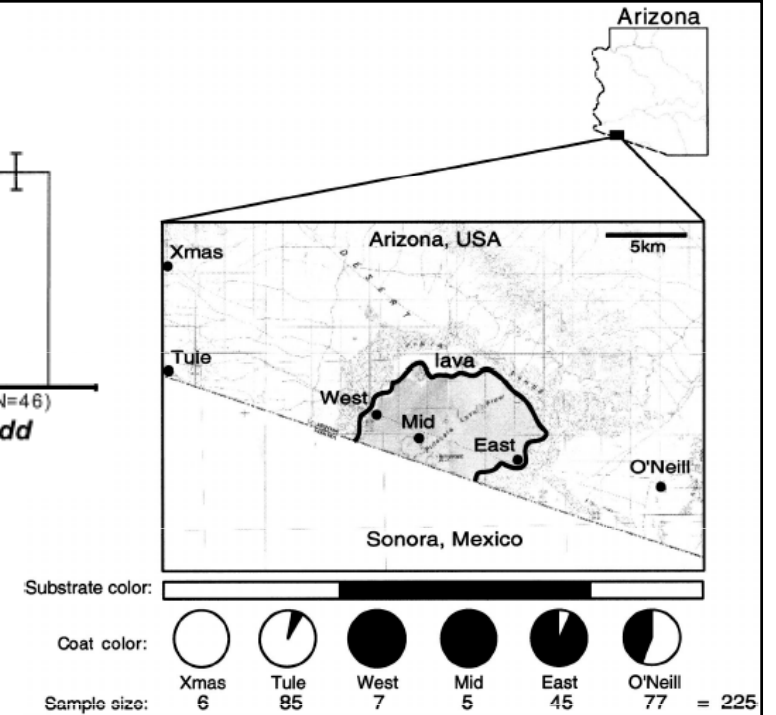
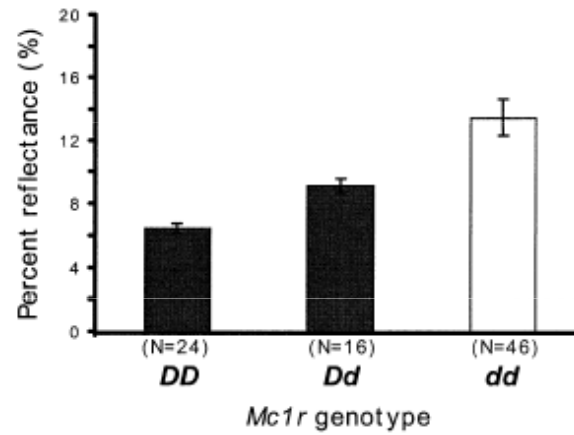


- Tmavé a světlé zbarvení
- Odpovídá barvě prostředí (tmavé zbarvení na lávě)



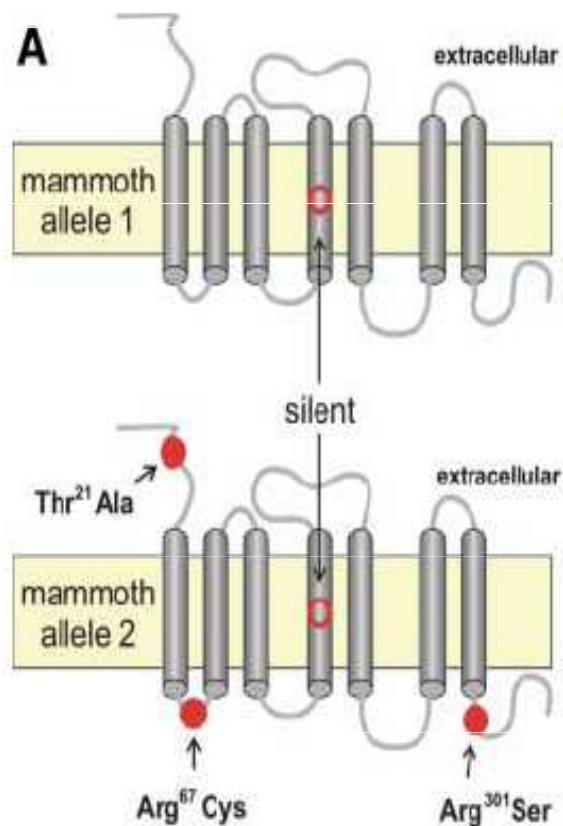
- **Arizona**

- Korelace zbarvení s prostředím i na malé škále
- mtDNA nekoreluje se zbarvením
- Sekvenování kandidátních genů (známých z inbredních myší)
- melanocortin-1 receptor MC1R
- Záměna 4 aminokyselin
- Jednoduchá dědičnost alel a zbarvení

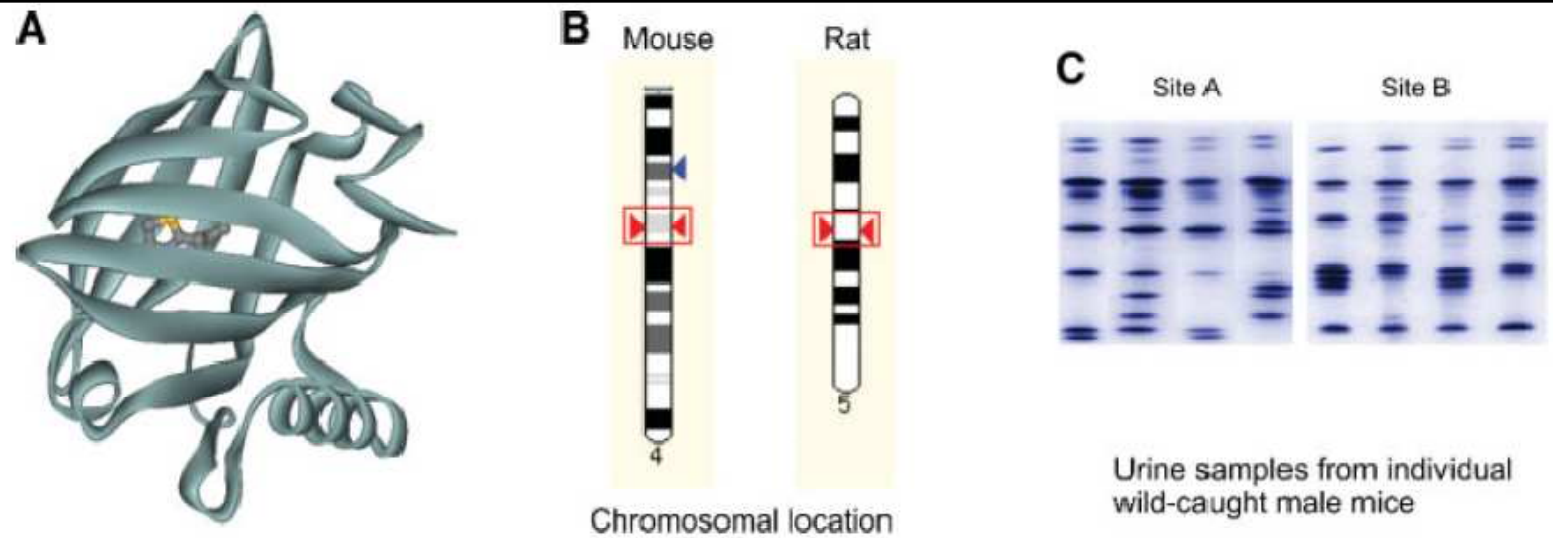


MC1R u člověka, mamuta a dalších

- U člověka zrzavé vlasy a neschopnost se opálit
- Zbarvení krav, koňů a psů
- Výskyt dvou odlišných variant u mamutů

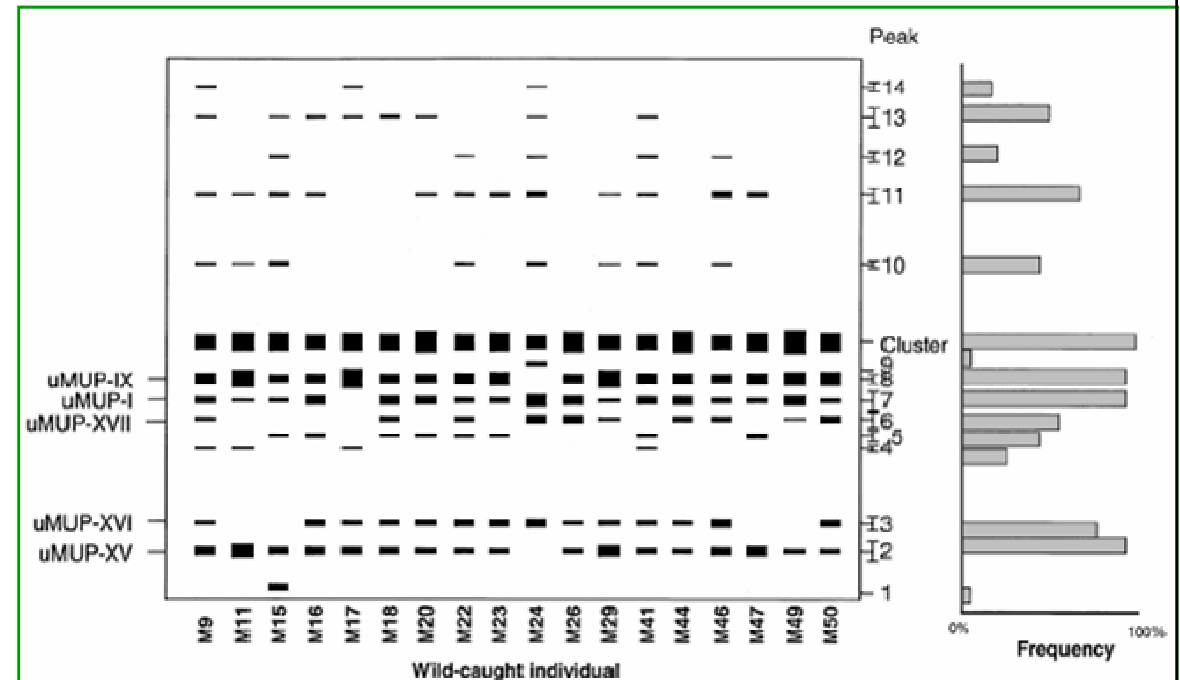


MUPs



Major Urinary Proteins - komplex velmi podobných genů

- Obtížně se studují (isoelektrická fokusace)
- Různé alely
- Navíc různá míra exprese
- → individuální profil
- Čárový kód jedince

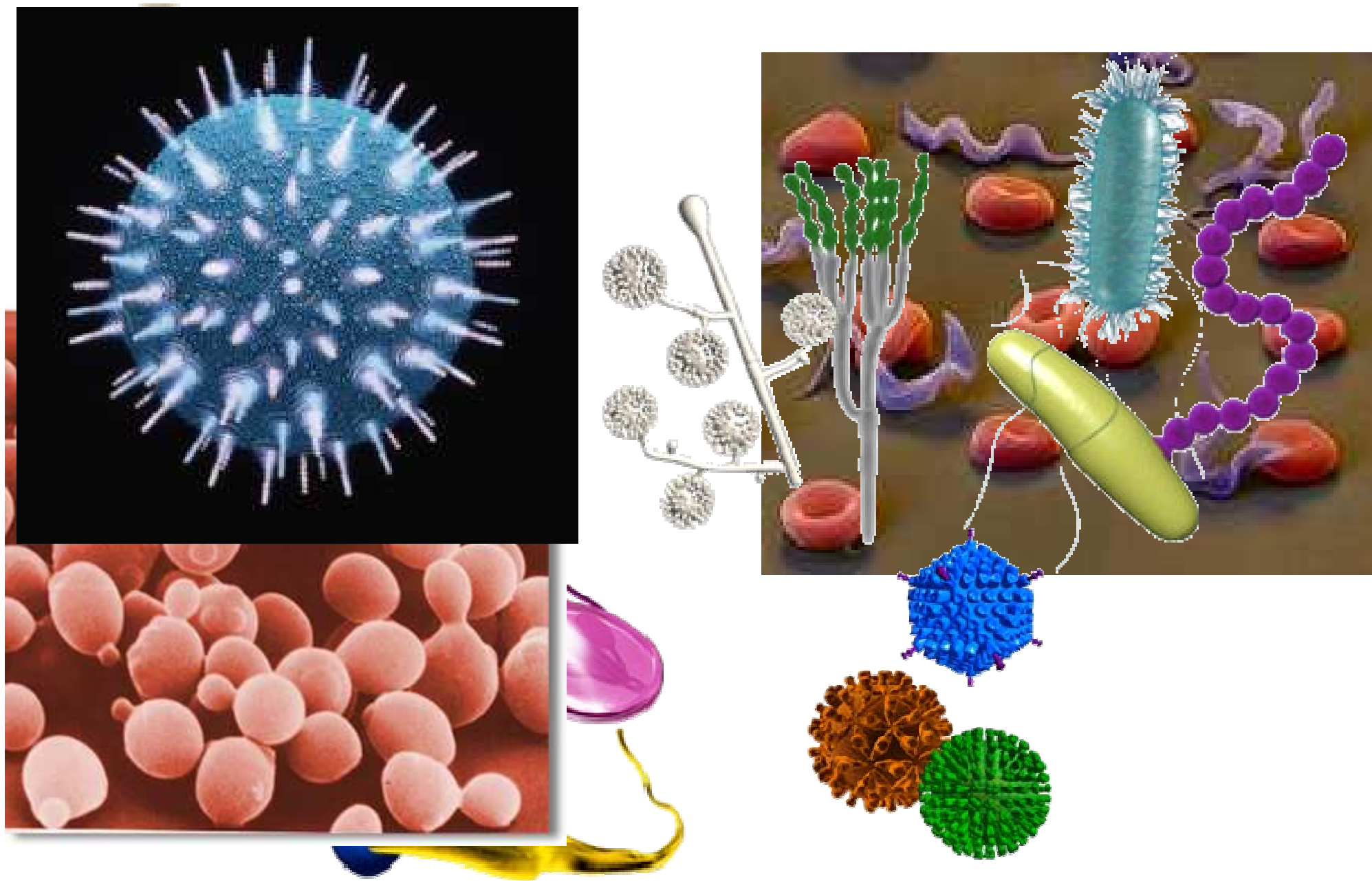


Major histocompatibility complex (MHC)

Paraziti



Paraziti / patogeny





Vibrio cholerae



Salmonella

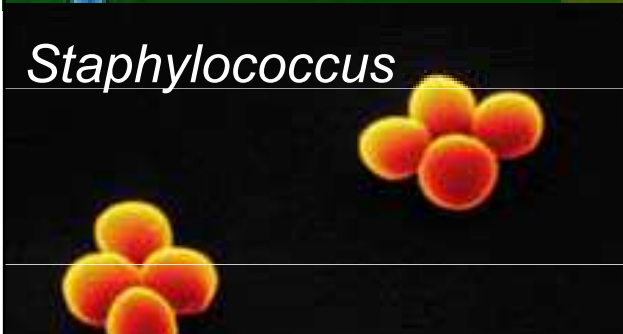


Clostridium

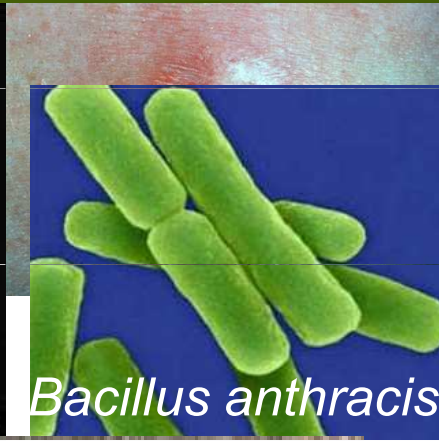
tetani



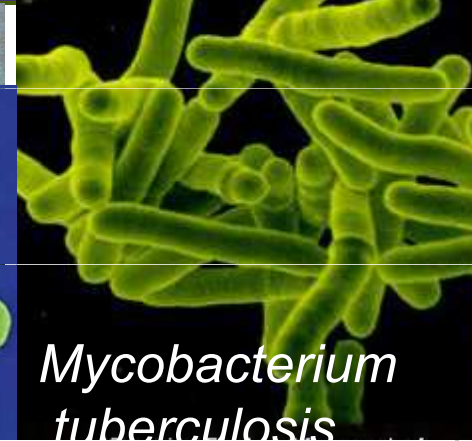
botulinum



Staphylococcus



Bacillus anthracis



Mycobacterium tuberculosis



Corynebacterium diphtheriae



Bordetella pertussis



Streptococcus



Legionella pneumophilla



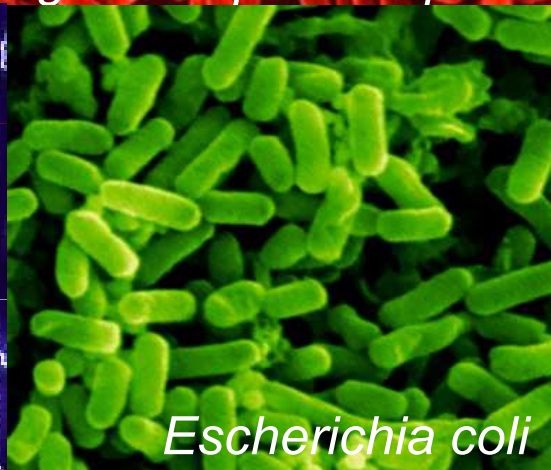
Listeria monocytogenes



Mycoplasma

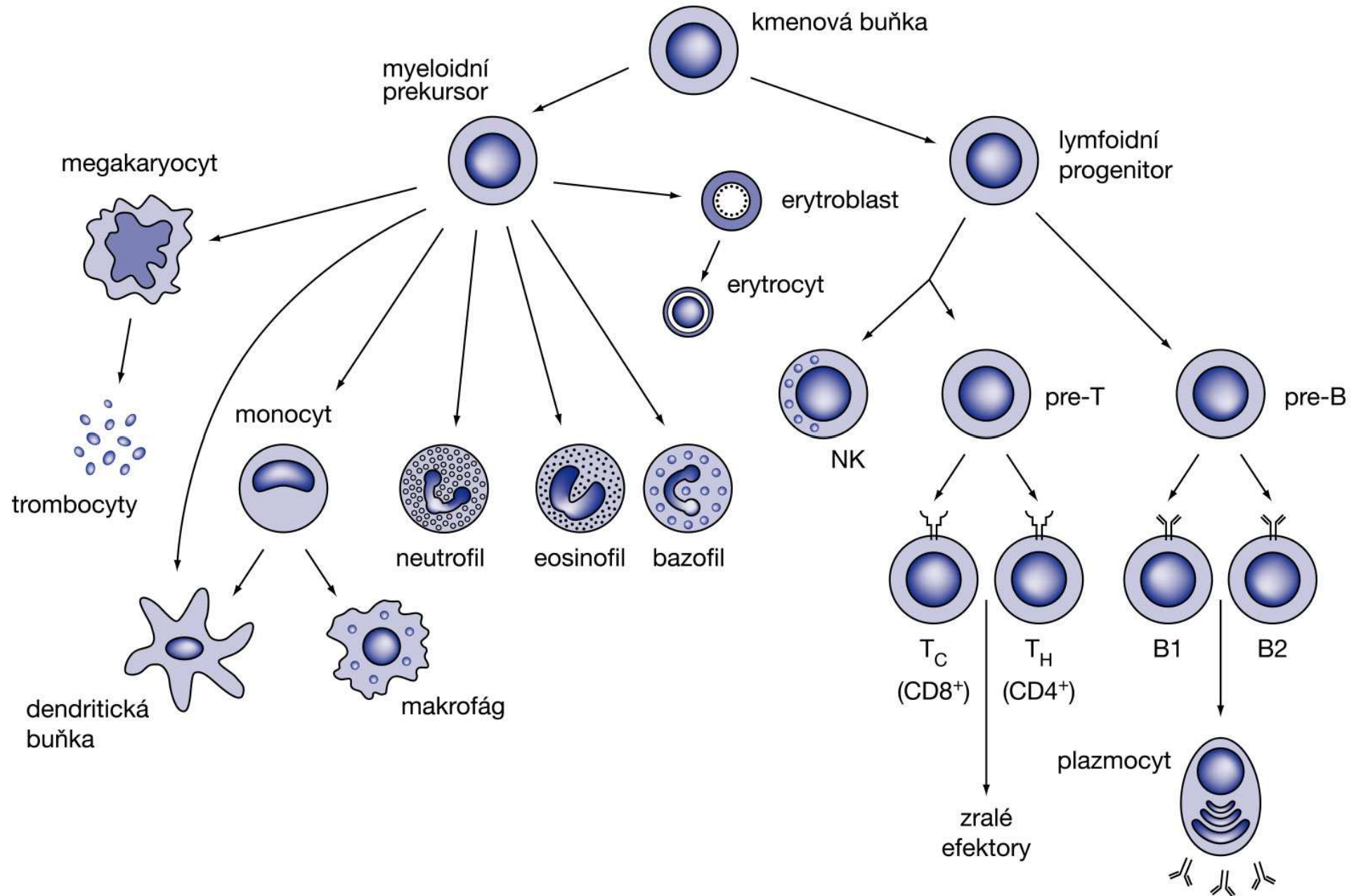


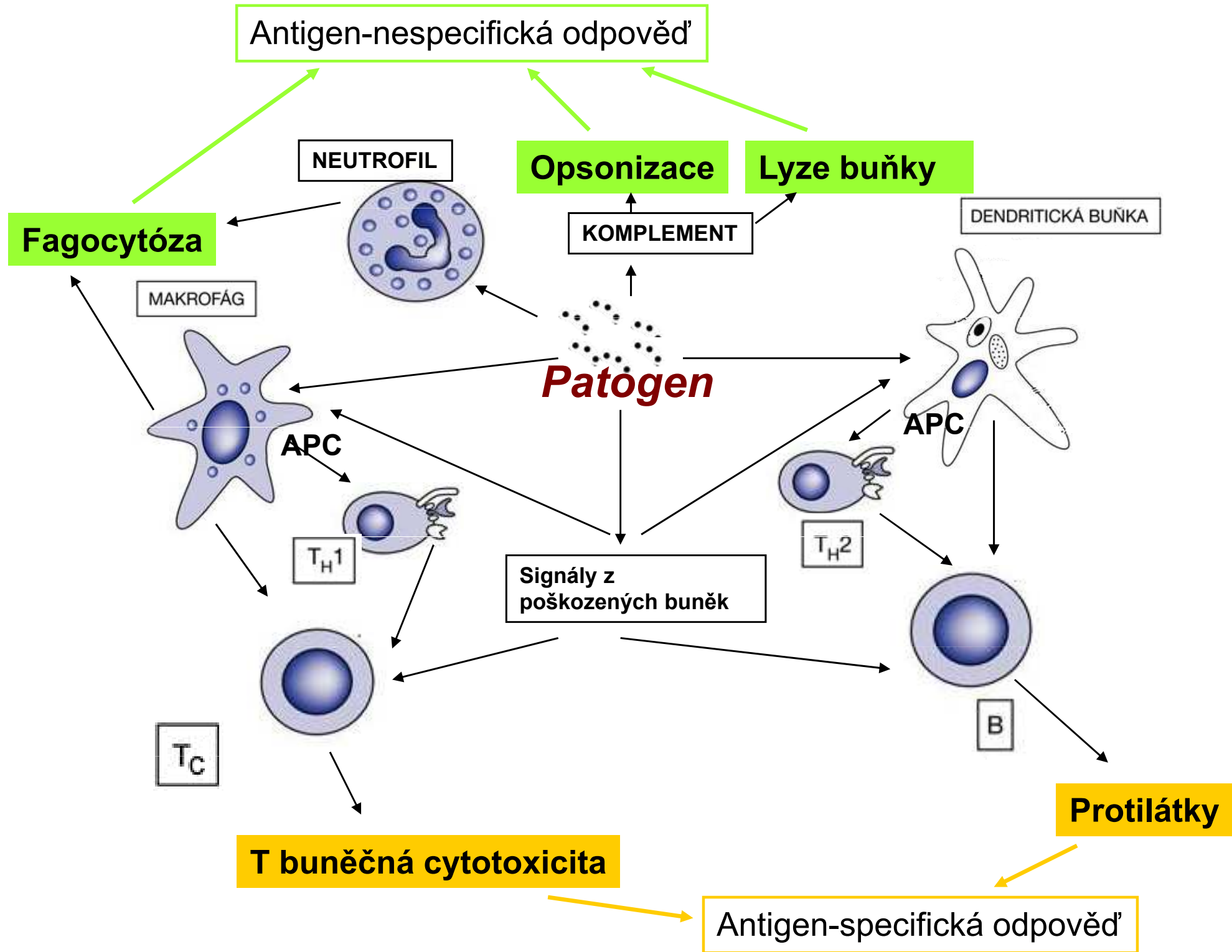
Borrelia burgdorferi



Escherichia coli

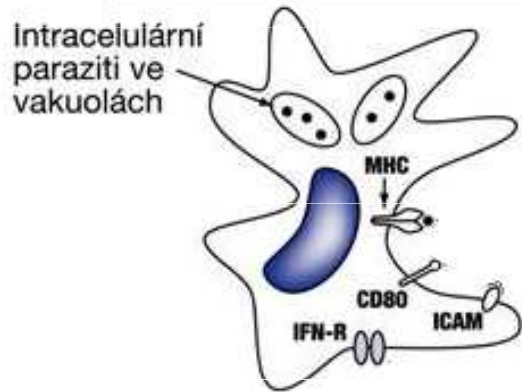
Buňky imunitního systému



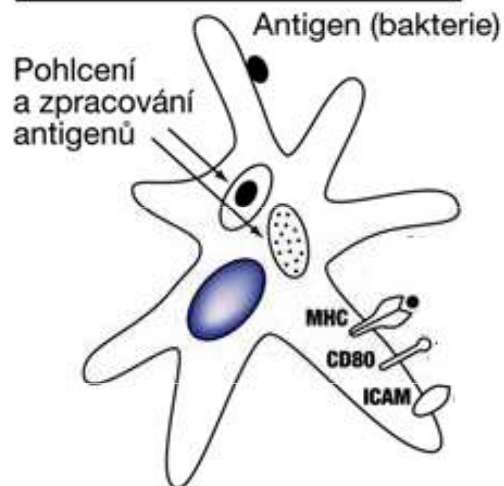


Antigen-specifická imunitní odpověď

INFIKOVANÝ MAKROFÁG

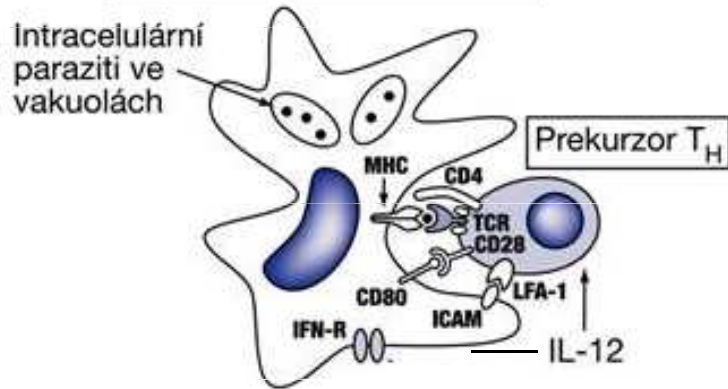


APC (DENDRITICKÁ BUŇKA)



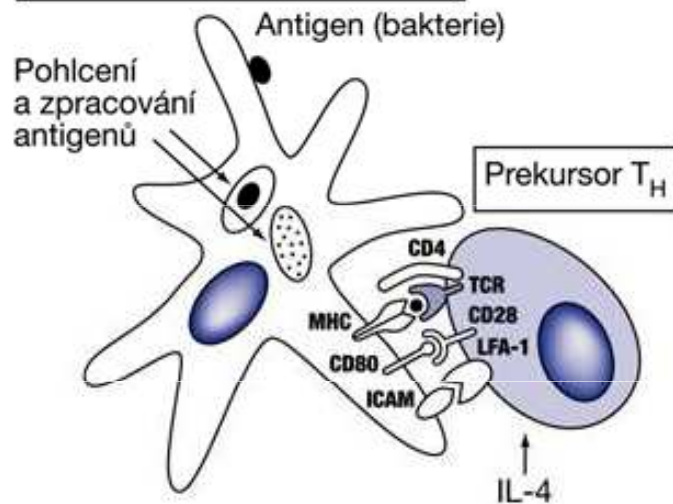
Antigen-specifická imunitní odpověď

INFIKOVANÝ MAKROFÁG

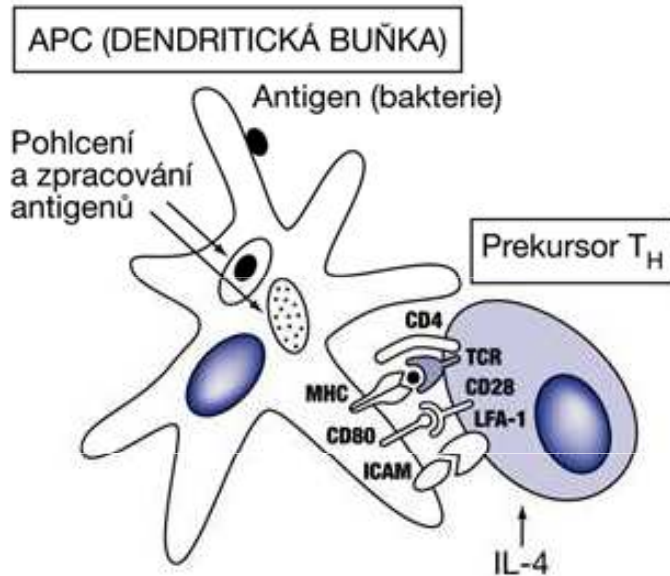
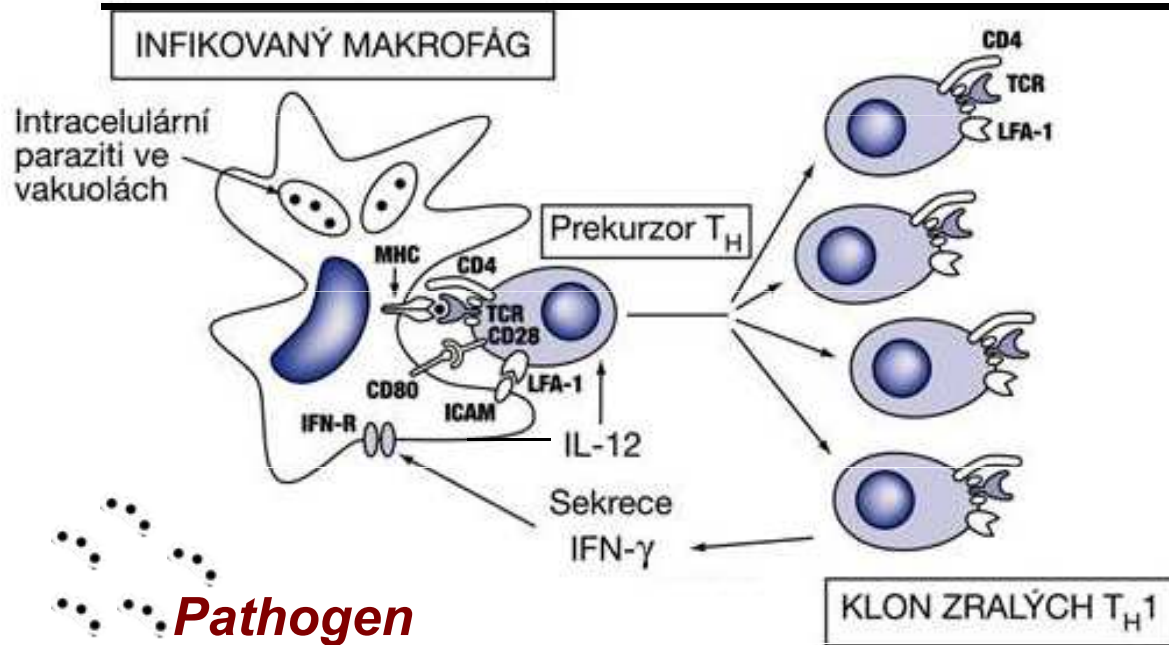


Pathogen

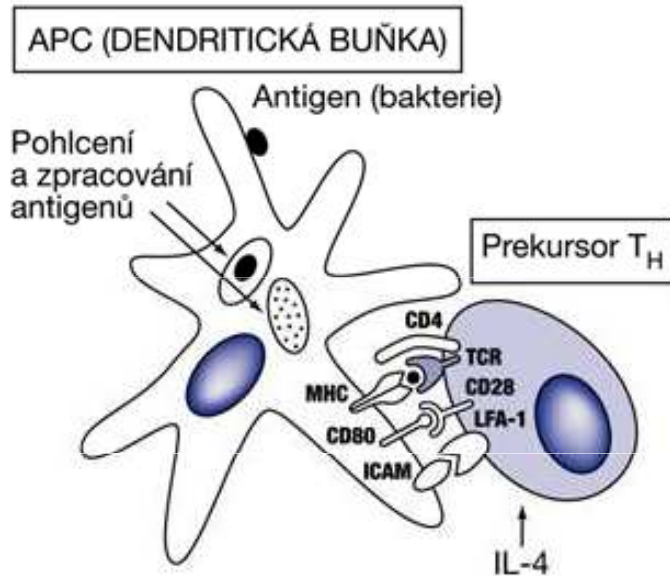
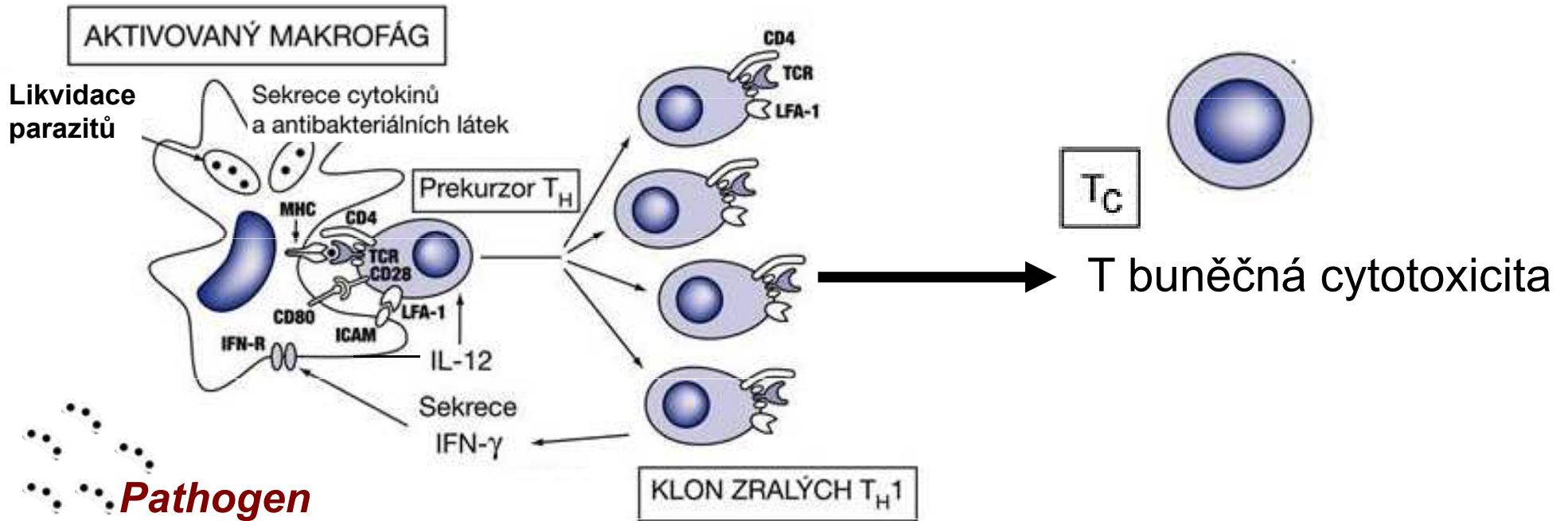
APC (DENDRITICKÁ BUŇKA)



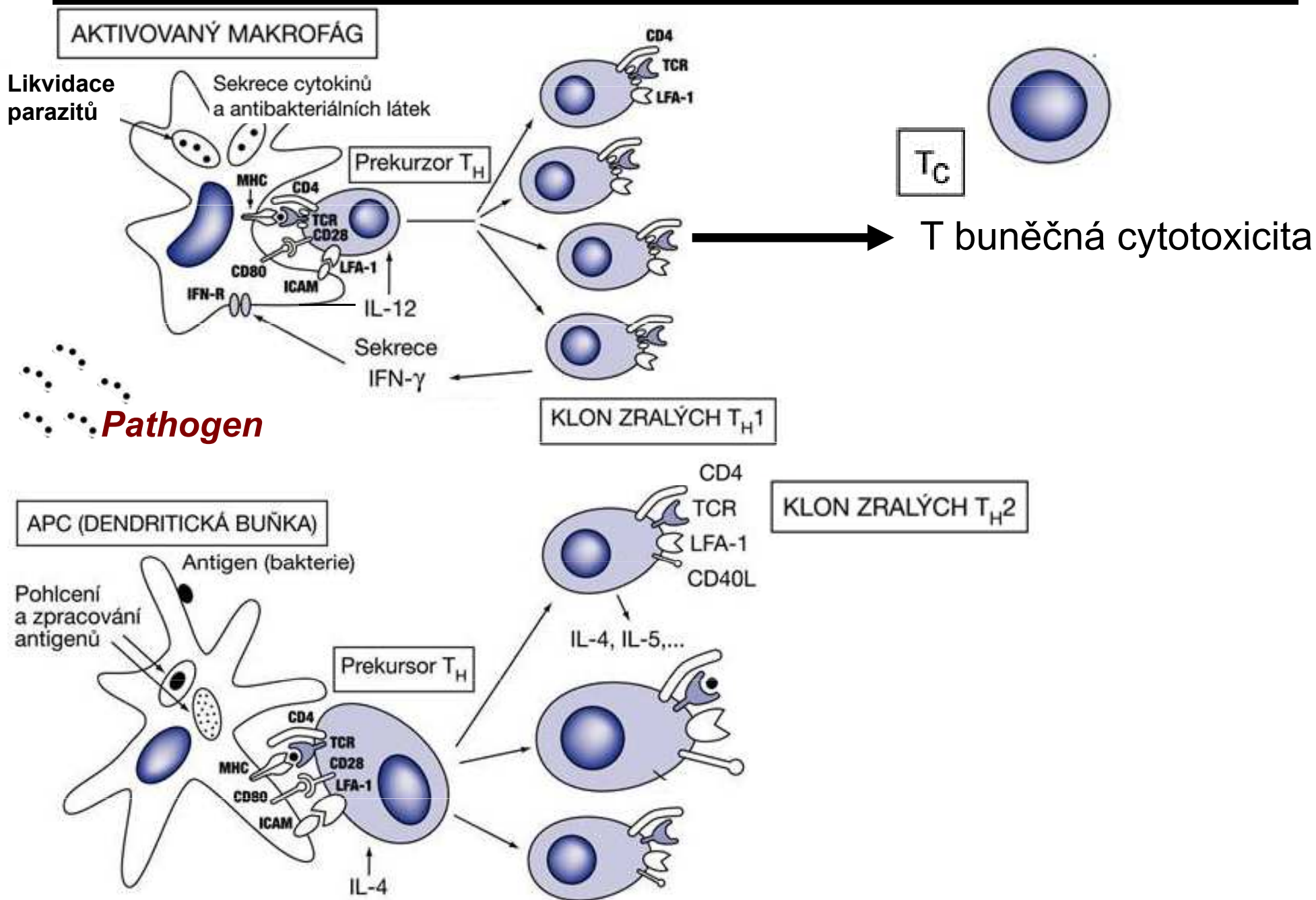
Antigen-specifická imunitní odpověď



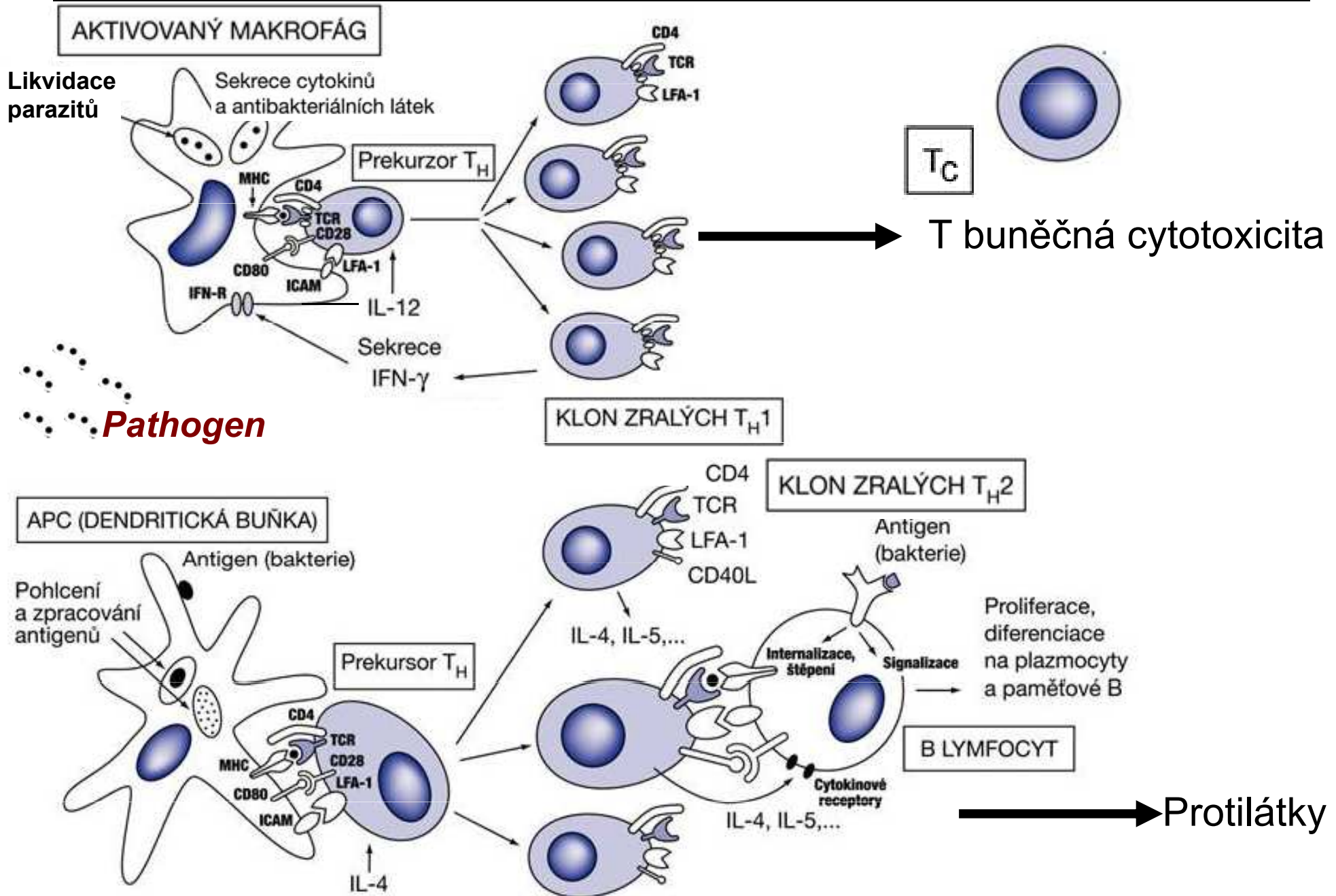
Antigen-specifická imunitní odpověď



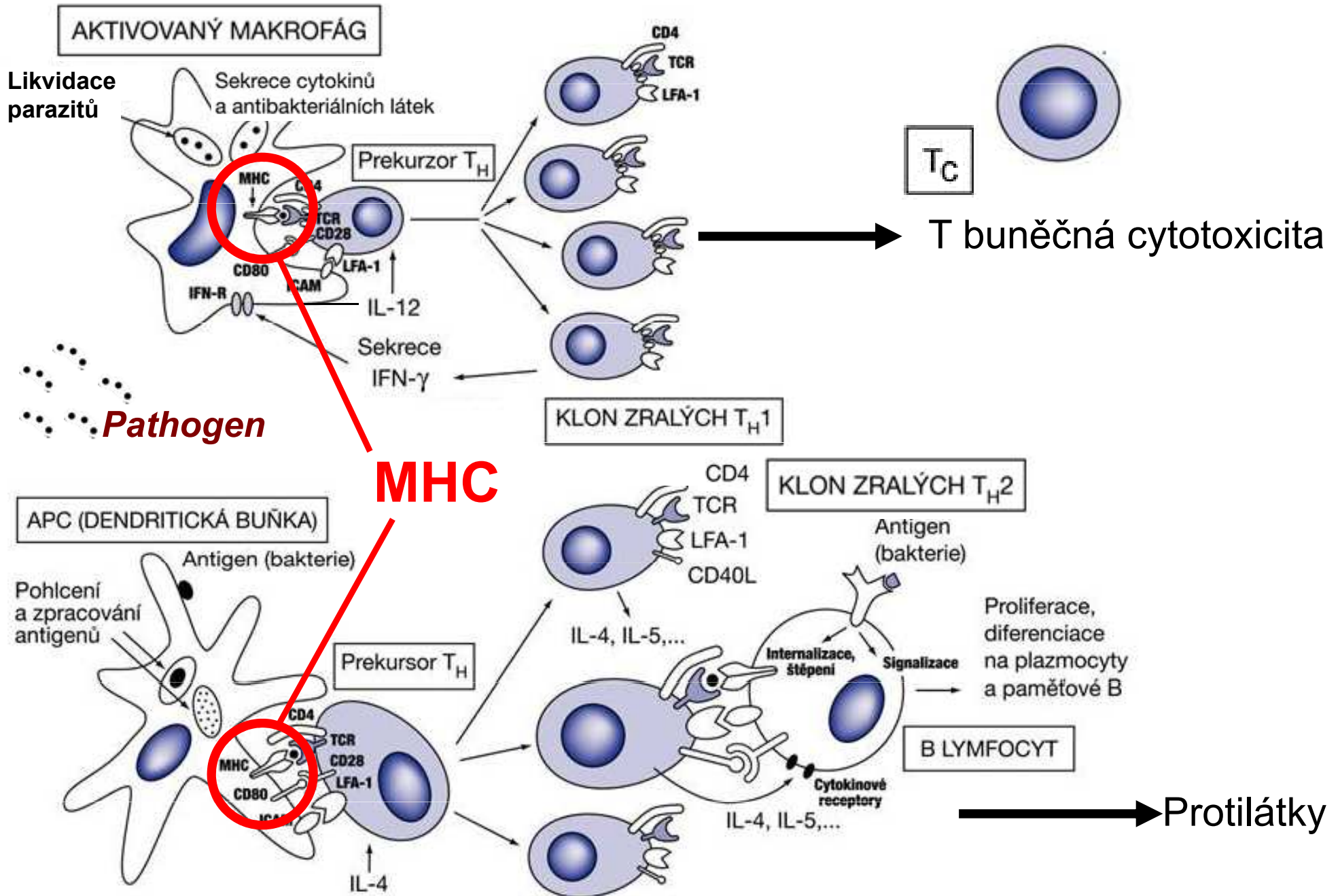
Antigen-specifická imunitní odpověď



Antigen-specifická imunitní odpověď



Evoluční ekologie: Kdo a jak rozpozná parazita ?



MHC - history of description

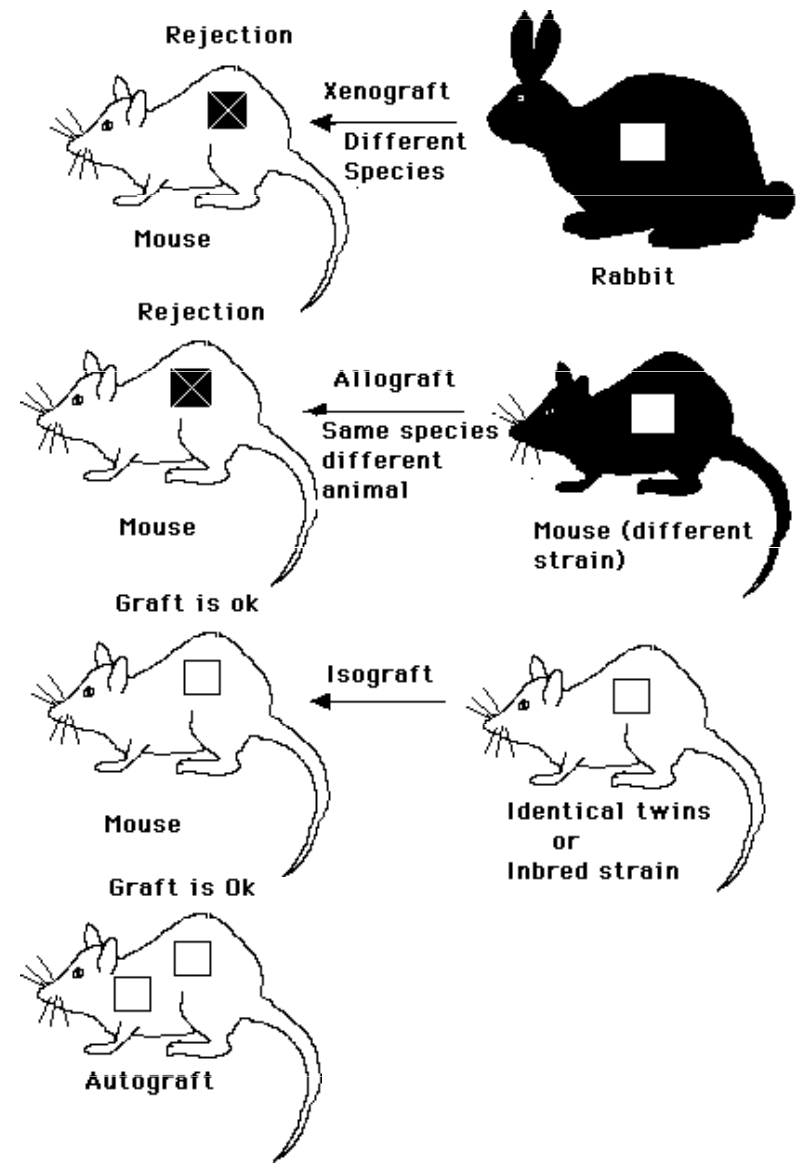
Transplantations



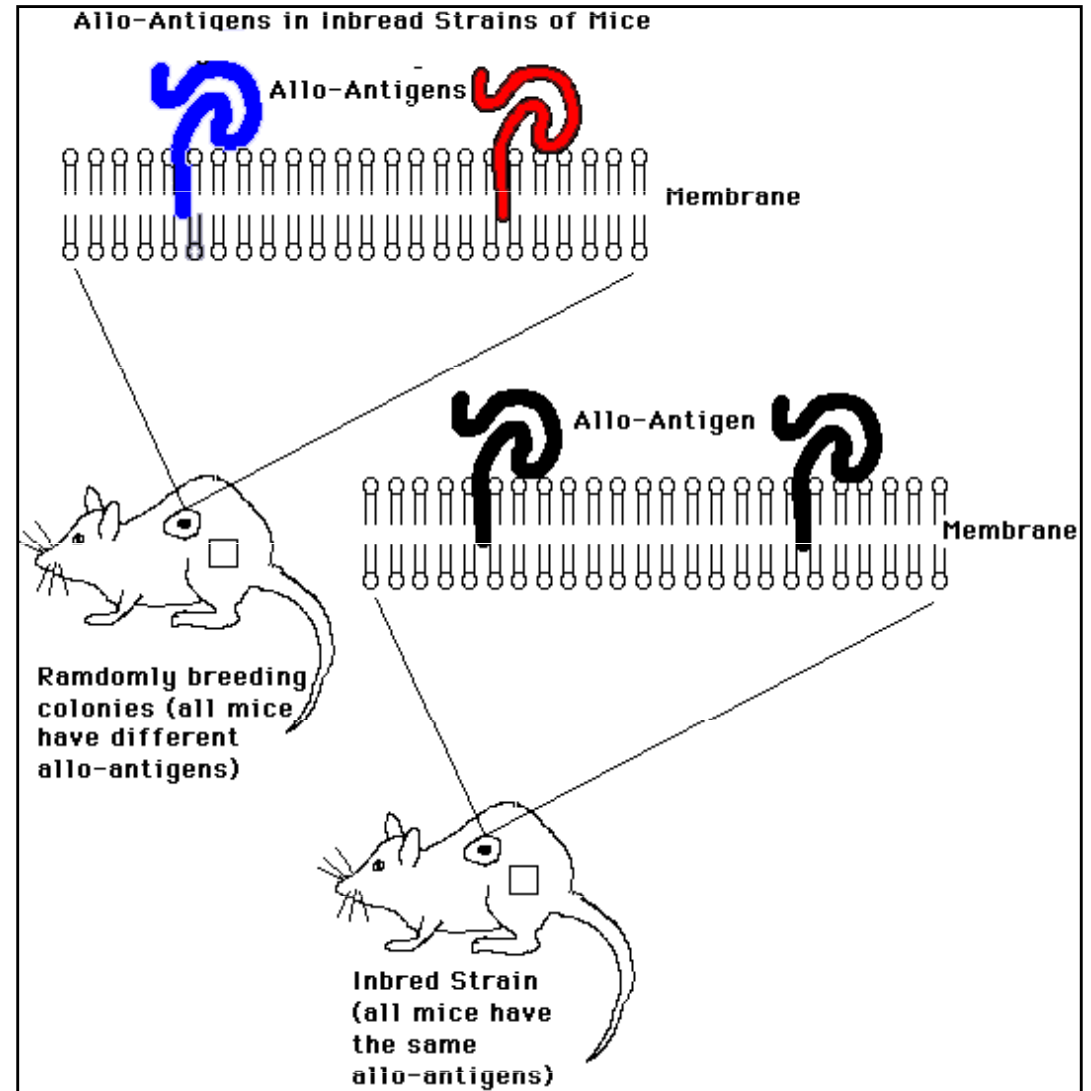
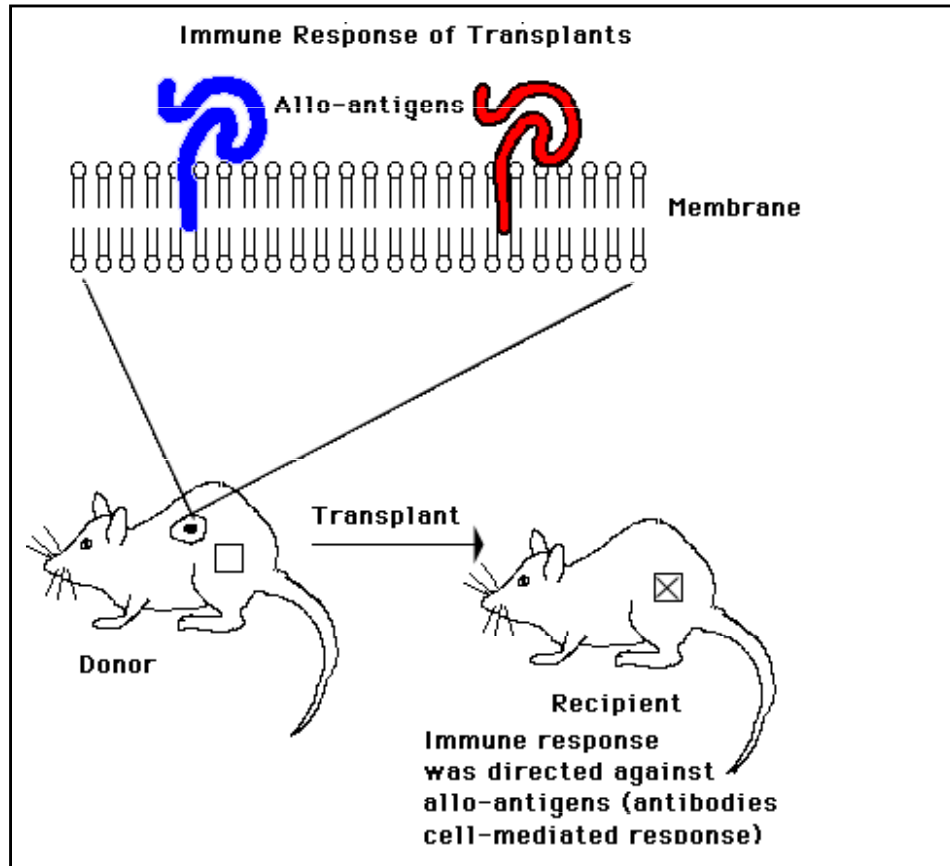
Analyses of inbred mice



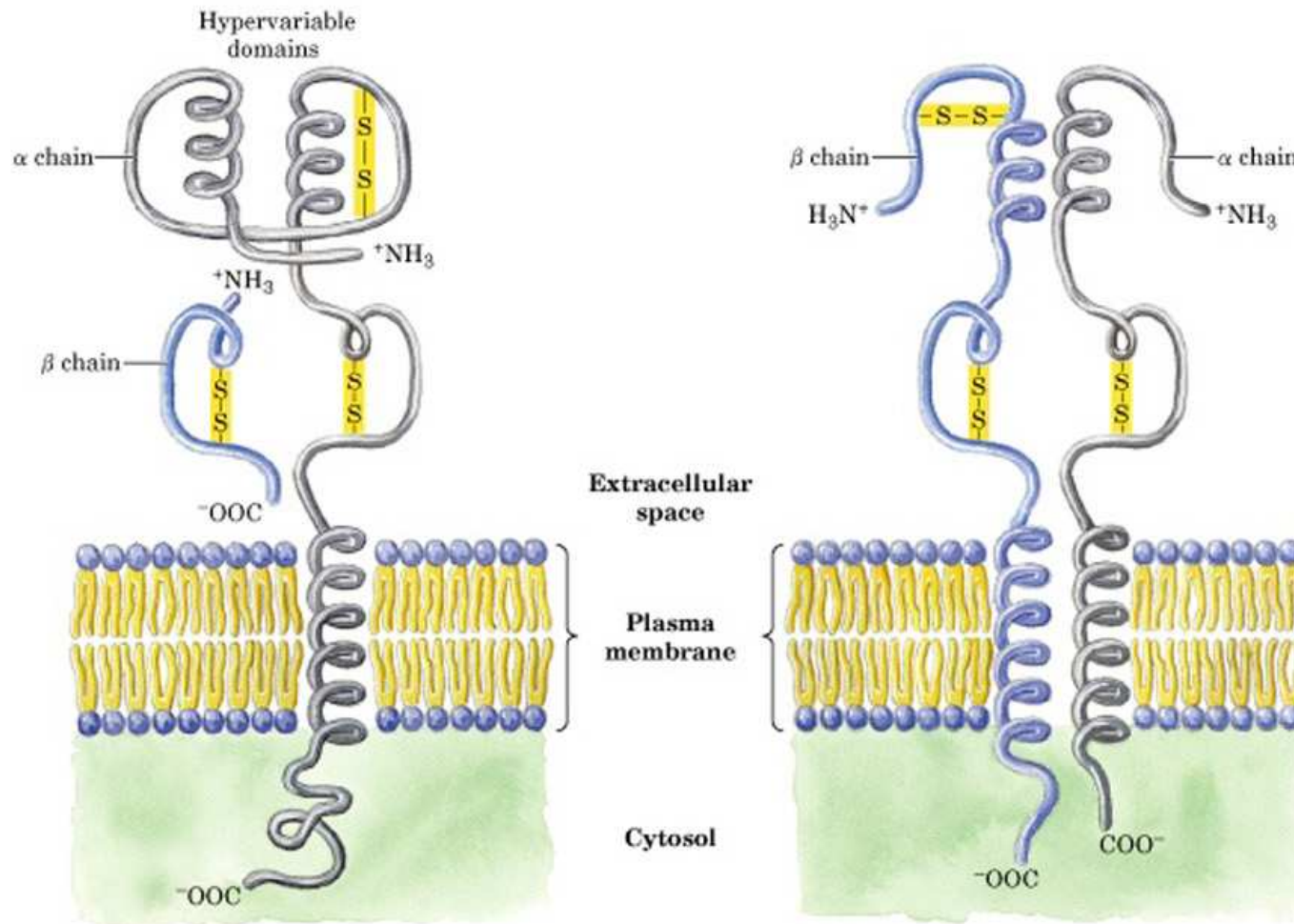
Major histocompatibility complex (MHC)



Principle of graft rejection



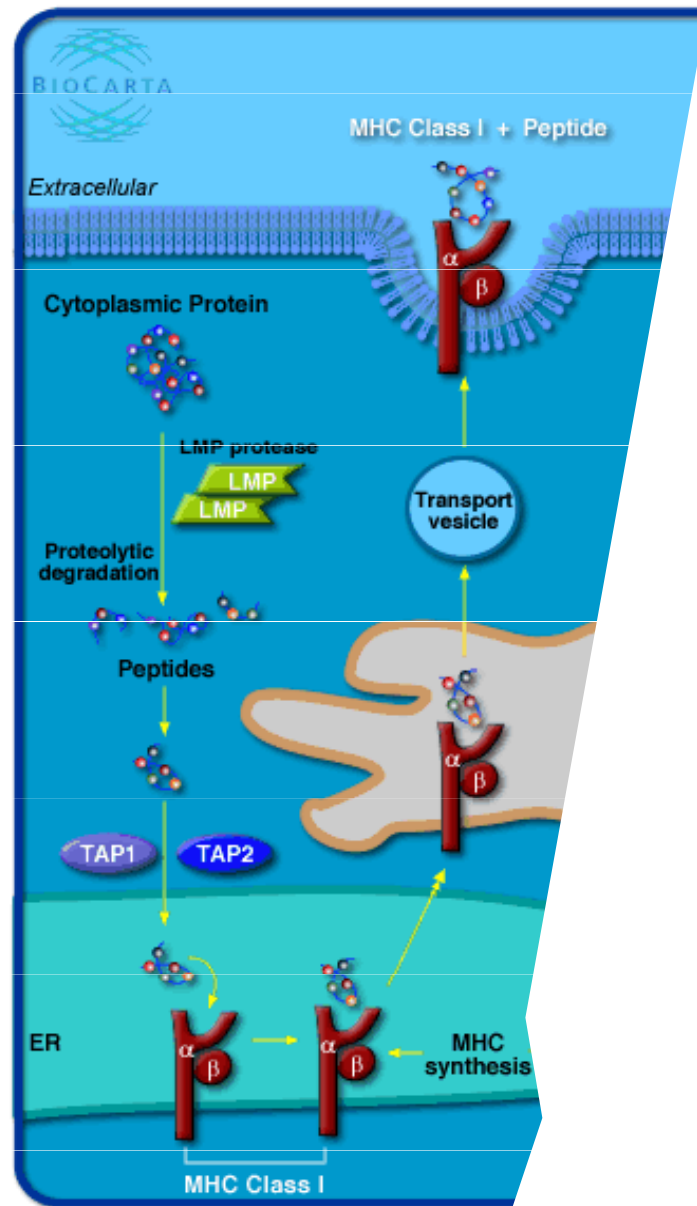
Struktura MHC (major histocompatibility complex)



Třída I

Třída II

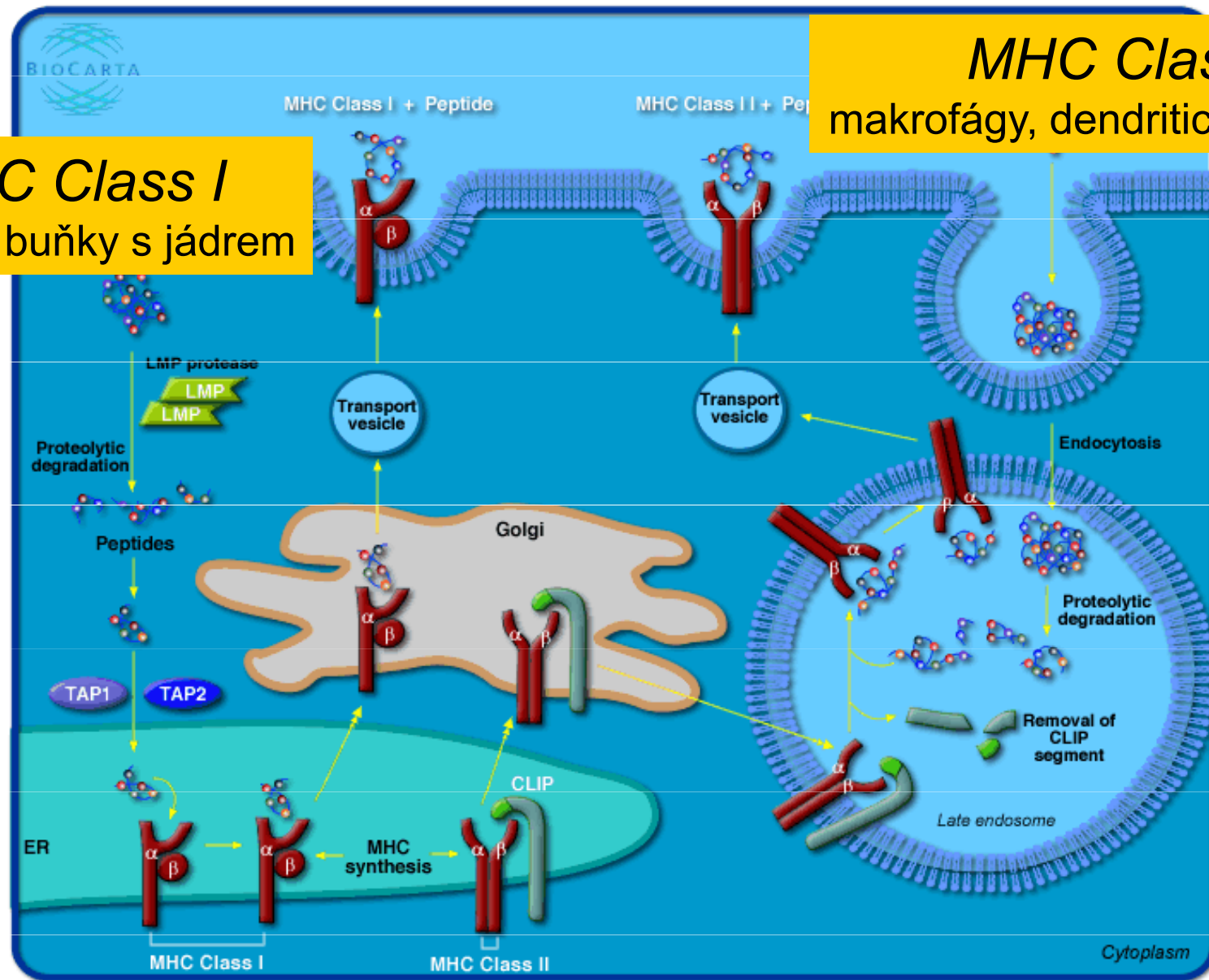
Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu



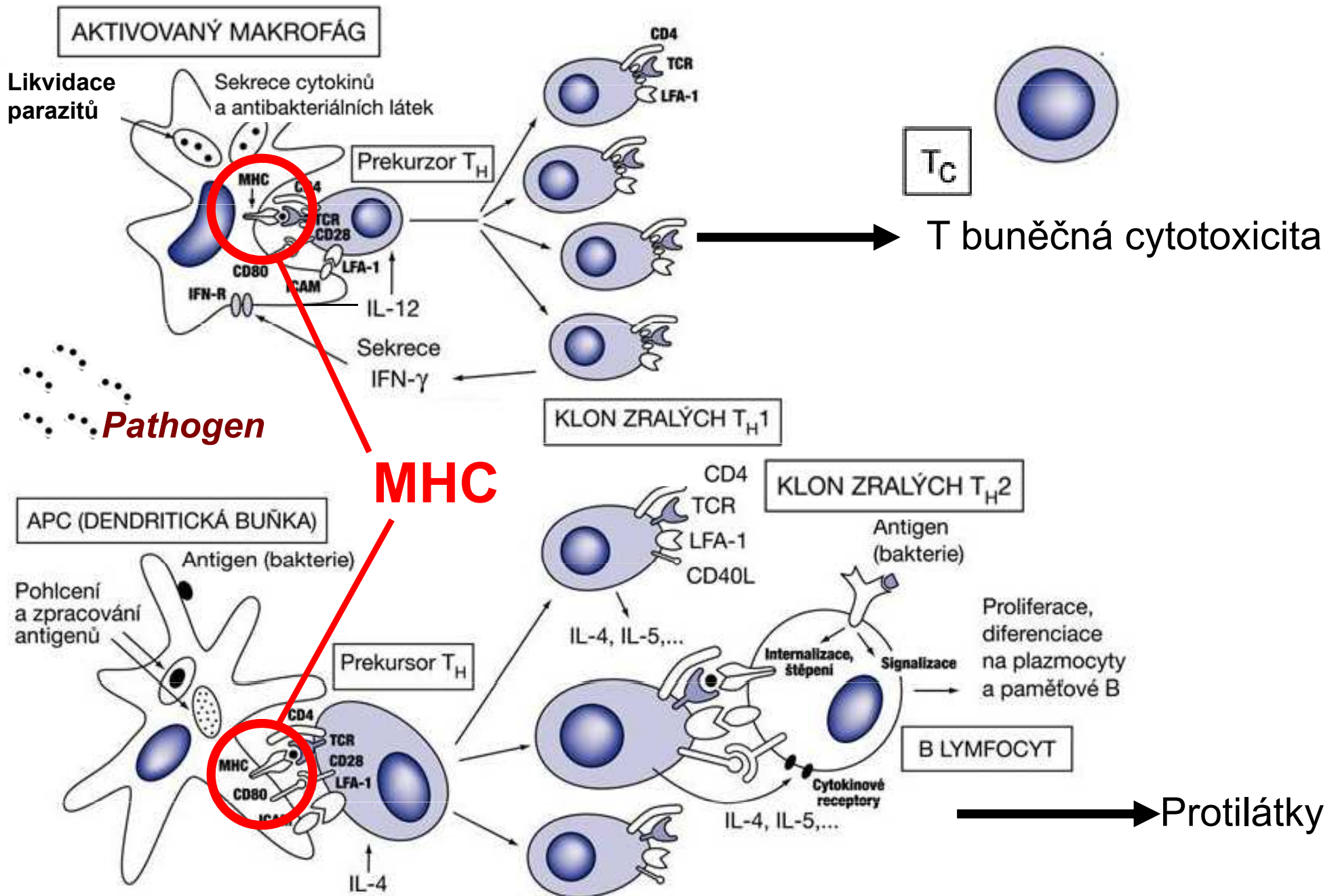
Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu

MHC Class I
všechny buňky s jádrem

MHC Class II
makrofágy, dendritické buňky aj.

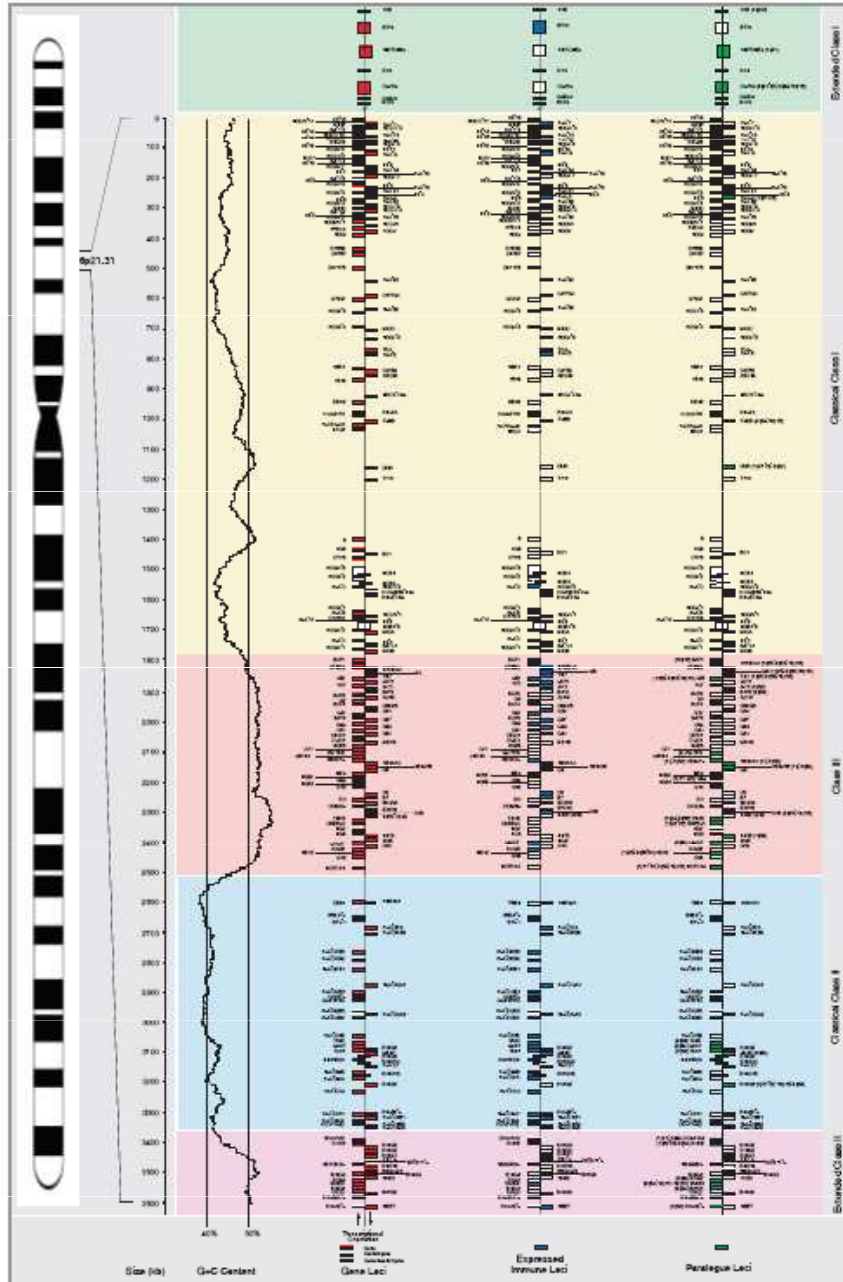


Buňka nabízející antigen spustí imunitní odpověď





Gene Map of the Human Major Histocompatibility Complex The MHC Sequencing Consortium



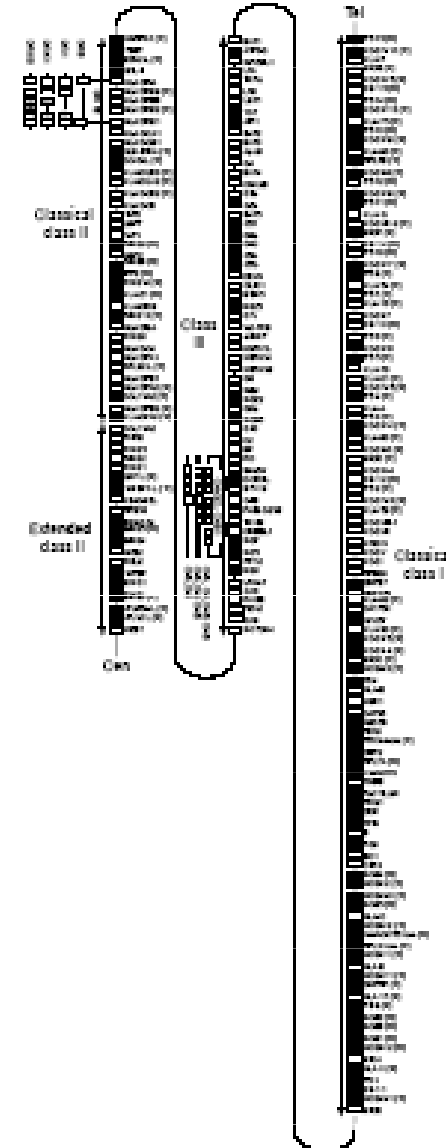
The complete nucleotide sequence of the human major histocompatibility complex has been determined (The MHC Sequencing Consortium, *Nature* 401: 1999). The resulting MHC gene map shows the approximate positions of all identified gene loci. The scale starts at the classical class I region (HLA-B) and ends at the extended class II region (HSE2). The estimated 4 Mb of the extended class I region is not shown to scale. Next to the scale is the G+C content, illustrating the low G+C and high G+C isochores of the classical class II and class III regions. The 'gene loci' column shows the approximate positions and transcriptional orientations of all identified genes and pseudogenes. The 'expressed immune loci' column highlights genes in the following categories: homology to immunoglobulin domain or other immune superfamily; expression specific to immune tissues; involvement in antigen processing and presentation (histocompatibility) or inflammation; implication in regulation of expression of immune loci; induction by immune mediators such as interferon. The 'paralog loci' column indicates the genes for which paralogues have already been identified on other chromosomes (modified from M. Kasakura, *Immunol. Rev.* 167, 17-32; 1999 and L. Du Pasquier, personal communication). HLA-A is marked here as representative of all class I-like paralogues. The cytogenetic location(s) of the paralogue(s) locus indicated next to the

The MHC Sequencing Consortium



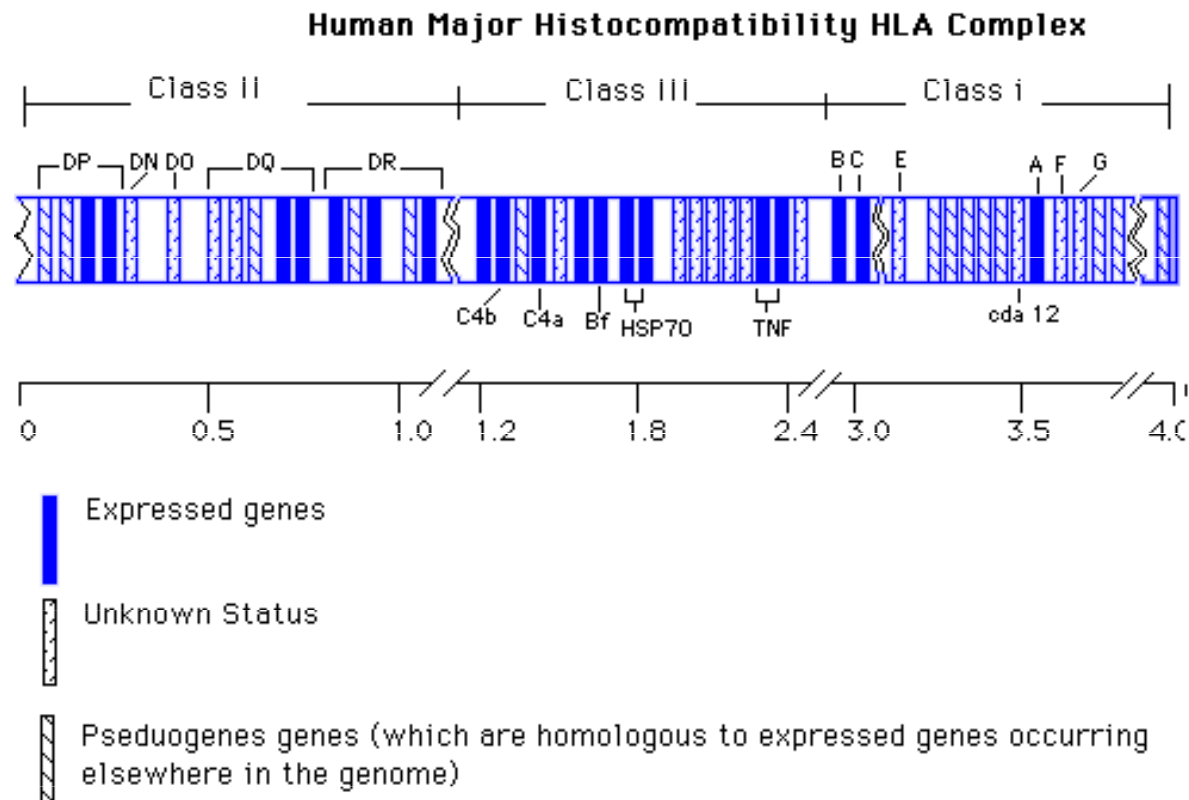
Poster produced with support from
 GeneType
 Contact: Dr Mervyn Jacobson
 Chairman & CEO
 GeneType
 PO Box 115
 Fitzroy Vic. 3065
 Australia
 Tel: +61 (0)3 9417 5711
 Fax: +61 (0)3 9417 2987
 e-mail: mjacob2579@aol.com
 www.genetype.com

Human MHC (=HLA) (Nature 1999)



« gold standard »

Genetic structure of MHC

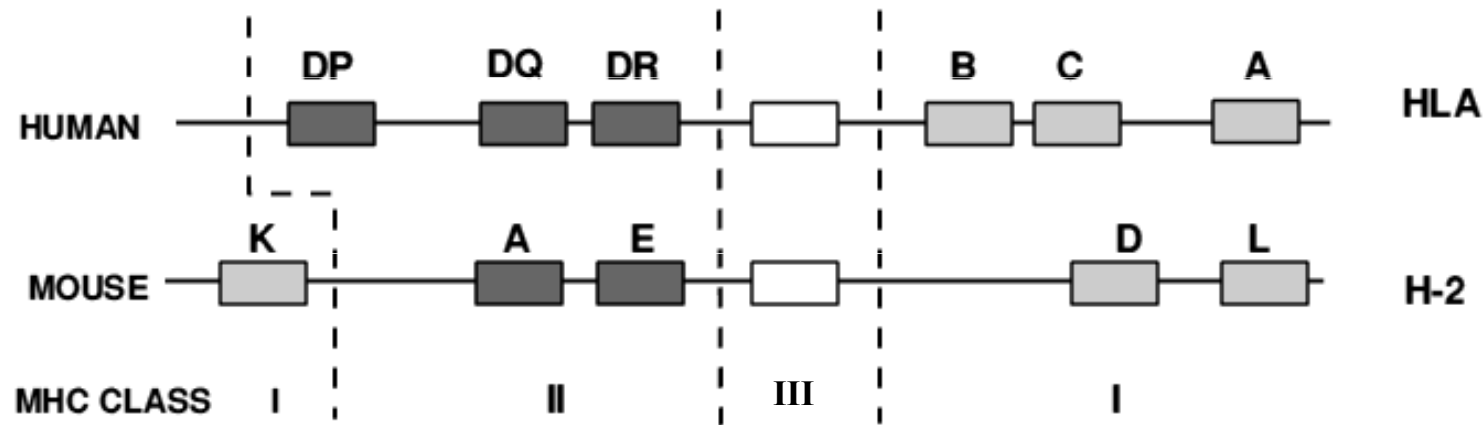


chromosom 6

Functional categories of genes within MHC

1. Antigen processing and presentation (Class I and Class II genes, TAP etc.)
2. Innate immunity, inflammation, regulation of immunity (Class III genes, such as C4, C2, cytokines, TNF, etc.)
3. Intercellular interactions via MHC receptors and ligands (notch, tenascin, class I and II)
4. Functions unrelated to immunity

Comparative genomics



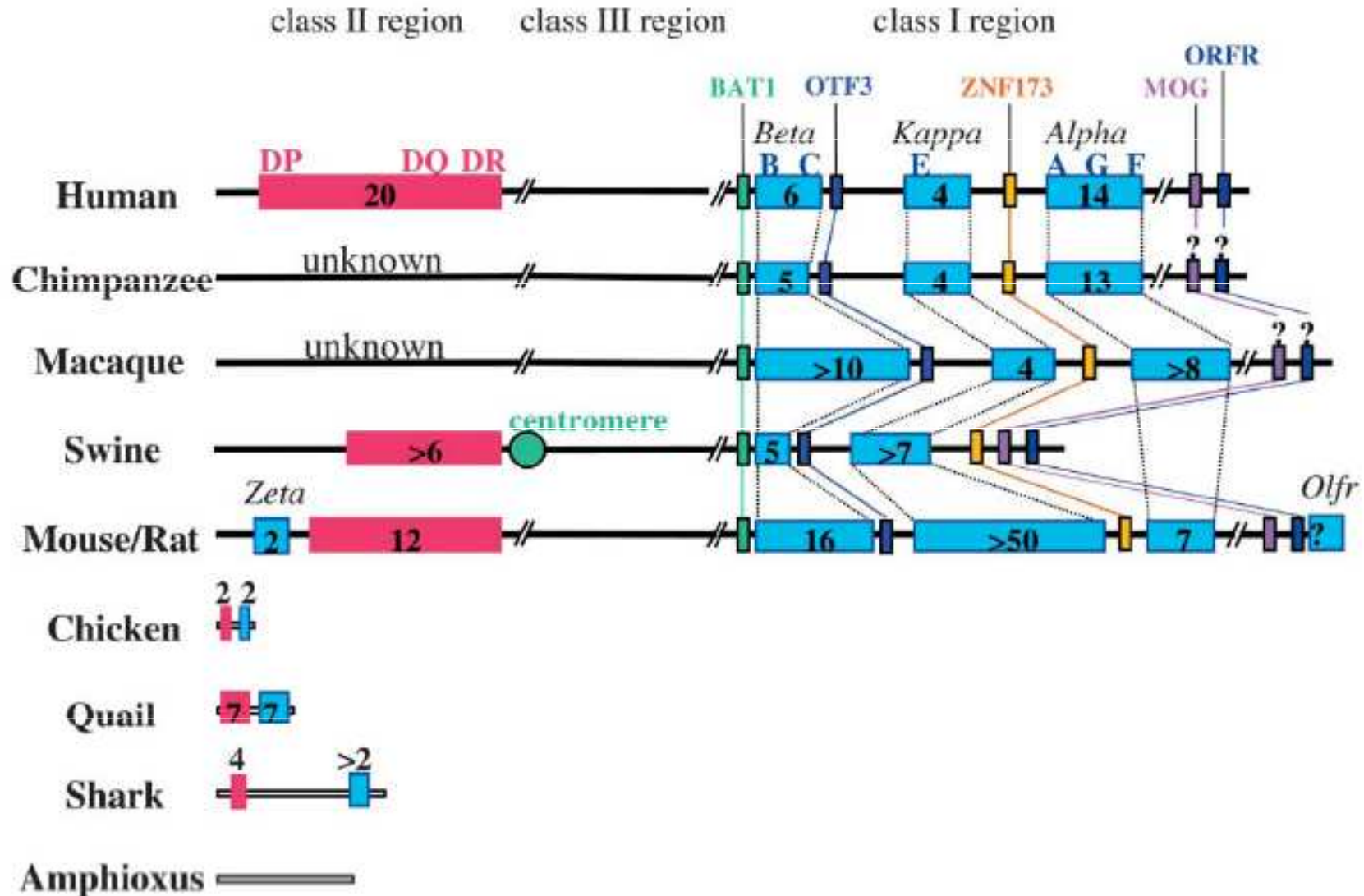
Human (HLA) – chr. 6 (completely sequenced in 1999)

Mouse (H2) – chr. 17 (first description of MHC)

Rat (RT1) – chr. 20 (completely sequenced in 2004)

Homology: DQA = H2-Aa = RT1.Ba = α subunit of MHC II

Duplication blocks



MHC in other species

BoLA - Cattle

DLA - Domestic Dogs, Wolves and Coyotes

FLA - Domestic Cats

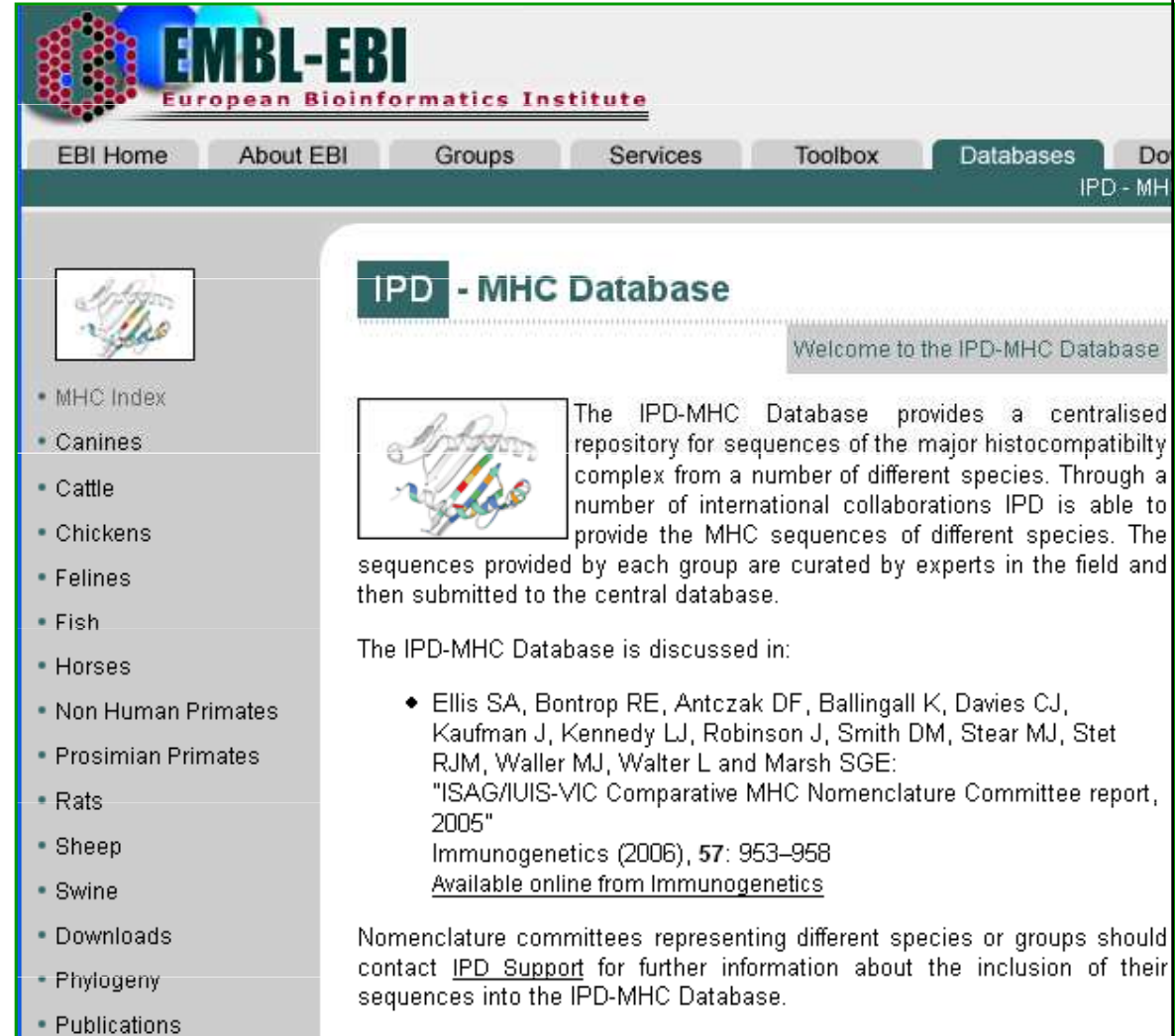
IMGT/NHP - Apes, Old World Monkeys, New World Monkeys

SLA - Pigs

ELA - Horses

Chicken MHC (B-complex + Rfp-Y) - only 19 genes (1/20 of the human one) - « minimal essential » MHC; Nature 1999

<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/index.html>



EMBL-EBI
European Bioinformatics Institute

EBI Home About EBI Groups Services Toolbox **Databases** Do
IPD - MH

IPD - MHC Database

Welcome to the IPD-MHC Database

The IPD-MHC Database provides a centralised repository for sequences of the major histocompatibility complex from a number of different species. Through a number of international collaborations IPD is able to provide the MHC sequences of different species. The sequences provided by each group are curated by experts in the field and then submitted to the central database.

The IPD-MHC Database is discussed in:

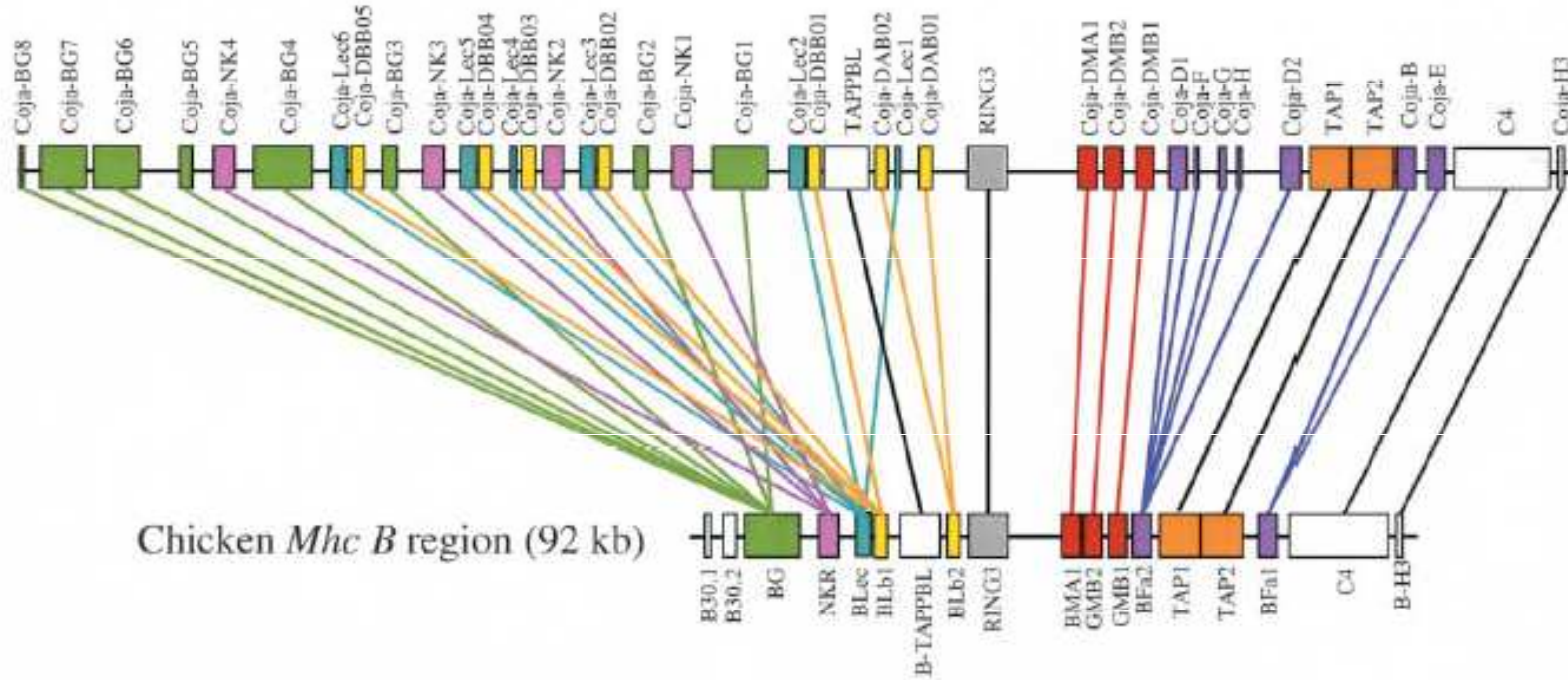
- Ellis SA, Bontrop RE, Antczak DF, Ballingall K, Davies CJ, Kaufman J, Kennedy LJ, Robinson J, Smith DM, Stear MJ, Stet RJM, Waller MJ, Walter L and Marsh SGE: "ISAG/IUIS-VIC Comparative MHC Nomenclature Committee report, 2005" Immunogenetics (2006), 57: 953-958 Available online from Immunogenetics

Nomenclature committees representing different species or groups should contact [IPD Support](#) for further information about the inclusion of their sequences into the IPD-MHC Database.

MHC Index
Canines
Cattle
Chickens
Felines
Fish
Horses
Non Human Primates
Prosimian Primates
Rats
Sheep
Swine
Downloads
Phylogeny
Publications

MHC in birds

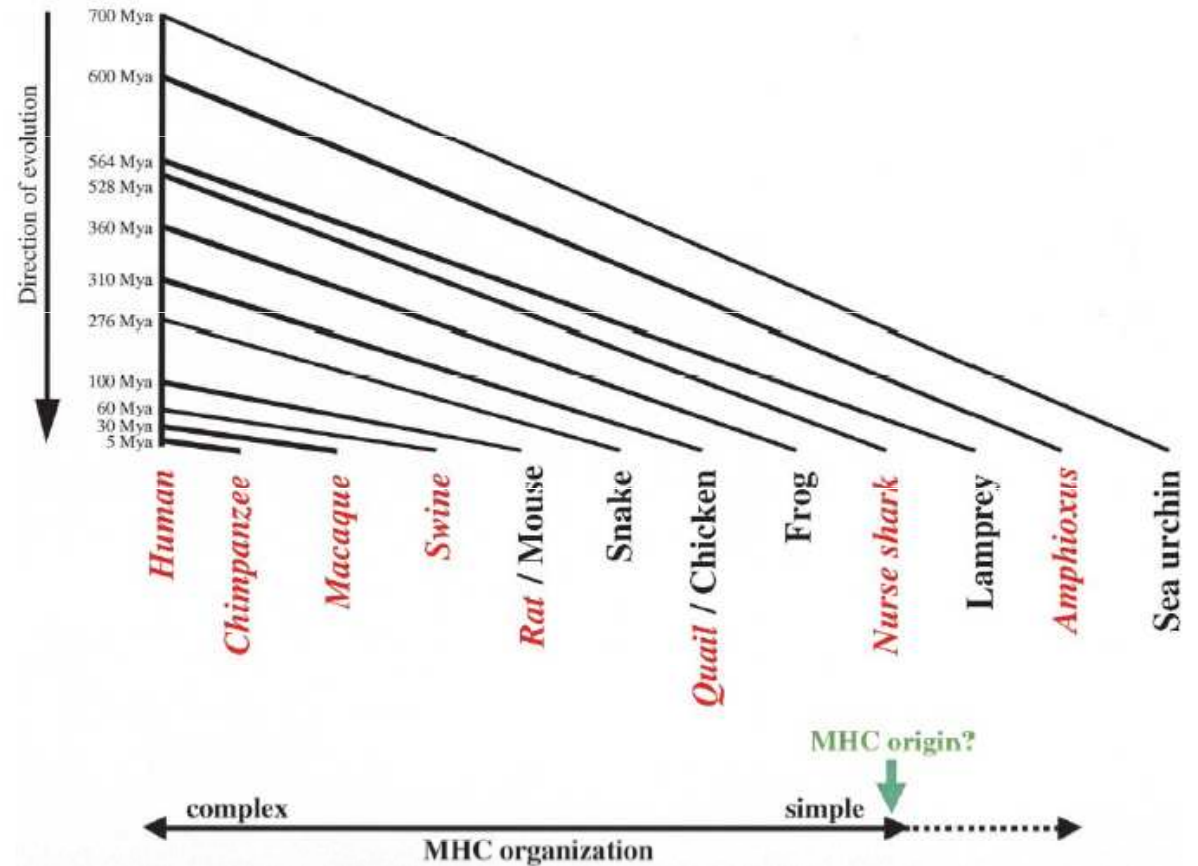
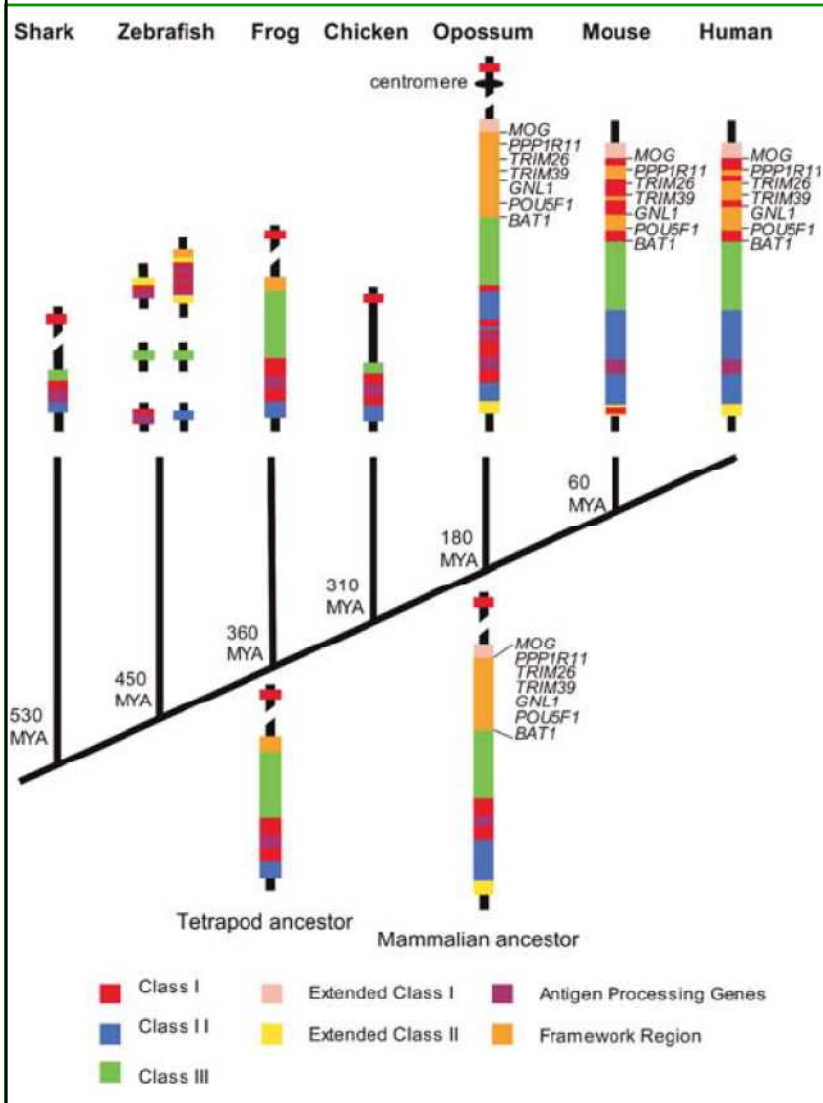
Quail *Mhc Coja* region (191 kb)



- =class I gene
- =class IIB gene
- =BG gene
- =Lectin like gene
- =NKR gene
- =HLA-DM like gene
- =other gene

« minimal essential » is not typical for all birds

MHC in all vertebrates?

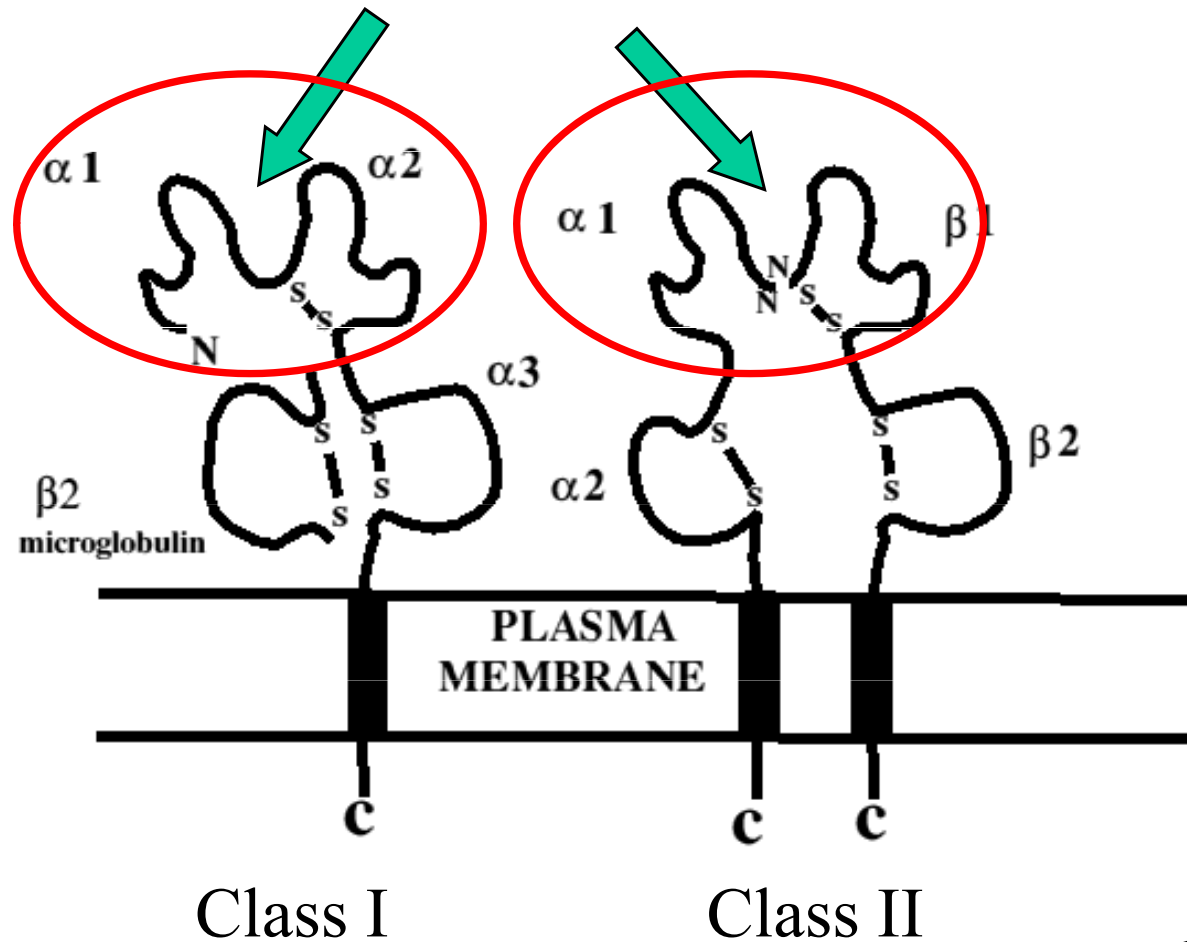


The class I or class II prototype genes have not yet been found in the lamprey, amphioxus and the sea urchin

Antigen binding site (ABS)

= antigen recognition site (ARS)

= peptide binding region (PBR)



crystal structure

ABS - většina variability

```

[           1 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888]
[ 34567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234]
Arte-DQA*01 DHVGSYGI TTYQSYGPNQ QFTFEFDGDE LLYVDLDKKE TVWRLPEFAQ LRRFDPQGGL QNIATGKHNL DILTKRSNFT PATN
Arte-DQA*02 ..I..... .V..... .Y....D.. ..... ..I...G. .G.L..... R....A.... .....T.... ....
Arte-DQA*03 ..I..... .V..... .Y....D.. ..... ..I...G. ...L..... R....A.... .V...T.... ....
Arte-DQA*04 ..... ..E.... .V..... .....
Arte-DQA*05 ..I..... .VN..... .Y....D.. ..... ..I...G. .G.L..... R....A.... .V...T.... ....
Arte-DQA*06 .....F.. DF..T.ES.. .Y..... EF....G... ..I...G. .TT..... RE..SS.Y.. ..MI....S. ....
Arte-DQA*07 ..I..F.. IVC....S.. .Y.M..... .F..... ..I...GH .AS....I.. .E..GA.Y.. .LM.....S. QV..
Miar-DQA*01 ..I..... NV....S.. .Y.M..... E....G... ..I.G.G. ..S..... ..VA.... .MWI.E.... ....
Miar-DQA*02 ..I..... NV....S.. .Y.M..... KF....G... ..I...GK .TS..... .E..RA.F.. ..I.ET.S. .T..
Miar-DQA*03 ..I..... EL..... .Y..... .F....G... ..I...GH .AS..... .EM..A.... .V.....S. ....
Miar-DQA*04 .....F.T VV..... .YIM..... ..I...GK .ASL...S.. .Q...A.... .V...M..S. .V..
Miar-DQA*05 ....TF.T VV..... .V.C..... ..I...GK .ASL..... .Q...A.F.. .V.....S. .V..
Miar-DQA*06 ....I... ..K....S. ...L..... R....M.Y.. .....S. L...
Miar-DQA*07 N..... ..I...G. .ITV..... ..V..... .....
Miar-DQA*08 ....T... ..S... ..M..N... E....G... ..I...G. ..SY..... ..VE.F.. .L..... .....
Clg1-DQA*01 ..IA.... ..K.....R. ....I...D. .IT..... ..S..F.. .V.I.Q..S. ....
Clg1-DQA*02 ....A... IVC.....D .Y.M..... .F...S.... ..I...G. .AS..... .Q...A.... ..VI....S. .T..
Clg1-DQA*03 .....F.. DF....S.. .Y..... EF...F.... ..I...G. .TS..... .E..LS.QD. ..MI....S. ....
Clg1-DQA*04 .....L SFS..HQ... .Y..... .F...S.... ..I...G. .TS..... .S..IE.... .NMI.W..S. ....
Clg1-DQA*05 N.I..... IV..... .Y..... EF..... ..I...G. .LY...N.. HD..IV.QY. .P.....S. ....
Clg1-DQA*06 ....T... ..S... ..M..... E....G... ..I...G. ..SY..... ..VE.F.. .L..... .....
Clg1-DQA*07 ....T... ..S... ..M..... E....G... .I..I...G. ..S..... ..A..F.. .L..... .....

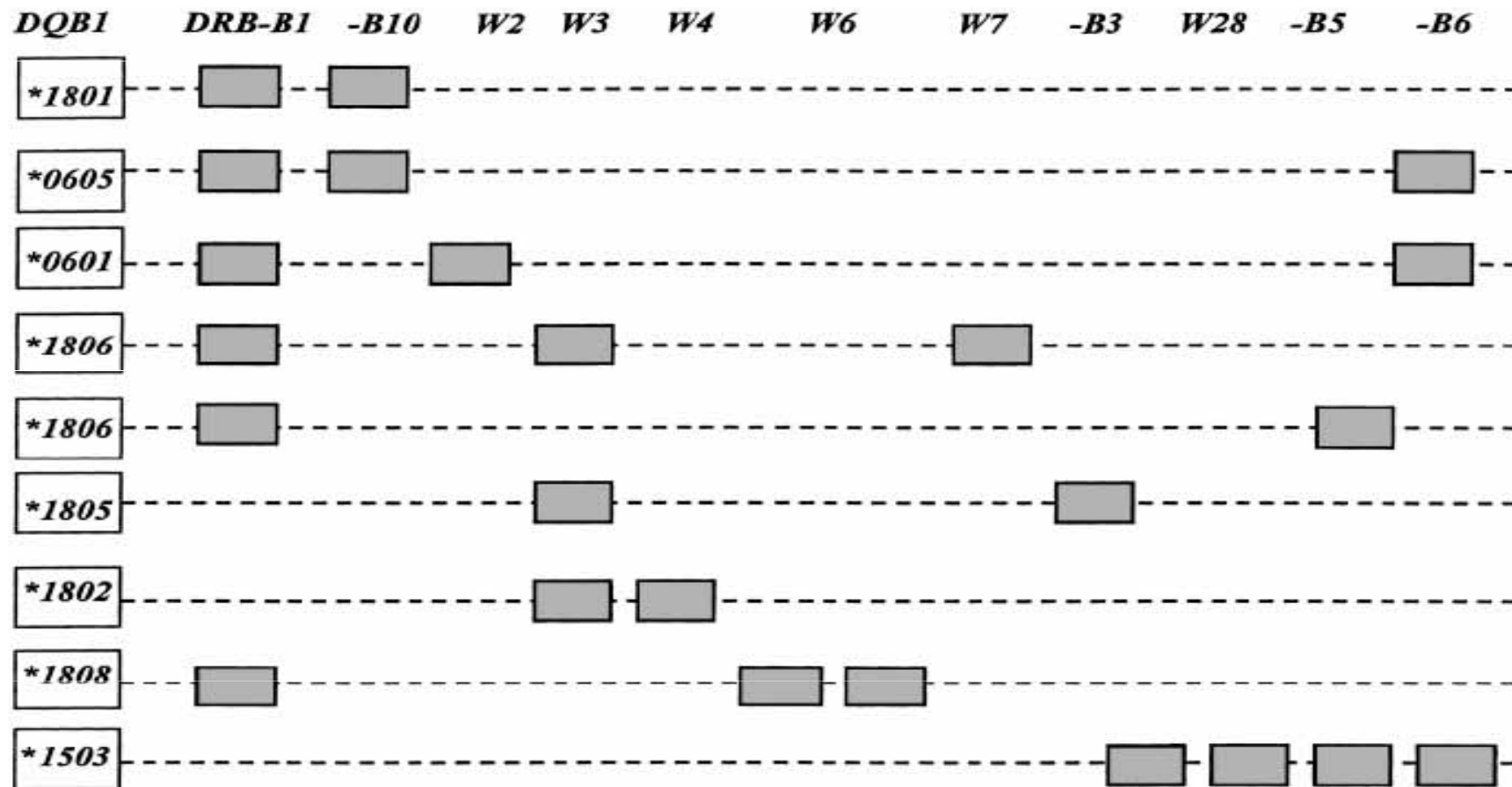
```

MHC Class II, exon 2 – encoding ABS

Jak zajistit rozpoznání obrovského množství patogenů?

- **Vysoká alelická variabilita** – více než 200 popsáných alel na DRB genu u člověka
- **Rekombinace** – uvnitř genů i mezi geny
- **Genové duplikace** – druhově specifické – Class I: až 17 genů u cichlid vs. max. 3 geny u lososovitých ryb

Complex MHC polymorphism



DQB

DRB 1-11

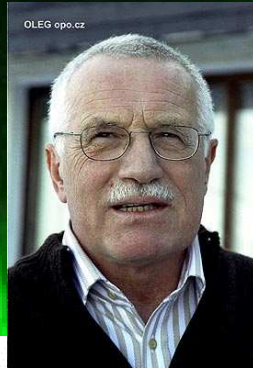
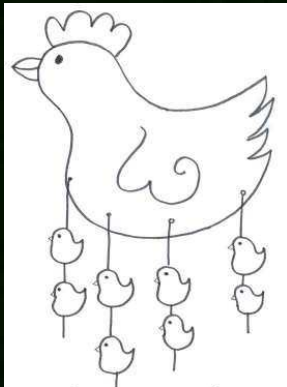
Rhesus macaque

Je variabilita opravdu důležitá a jak vzniká?

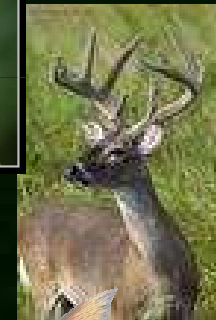
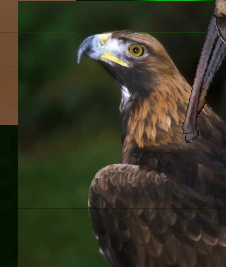
Je tato variabilita důsledkem přírodního výběru?

Jak ovlivňuje struktura imunitních genů svého nositele?

Umožňuje mu lépe přežít nebo se více rozmnožit?



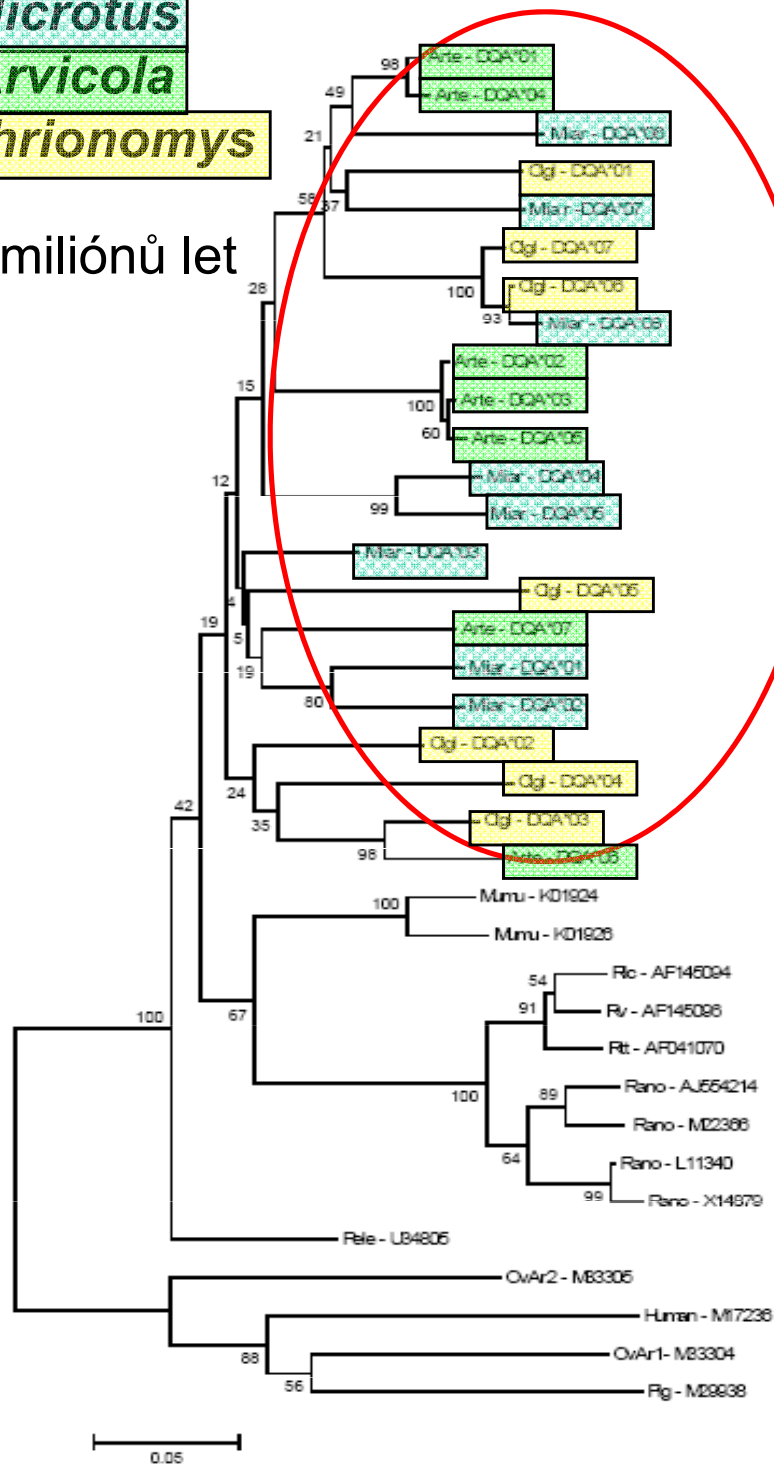
vs.



Jak zjistit, že je gen pod selekcí?

Microtus
Arvicola
Clethrionomys

7-8 miliónů let



Důkaz přírodního výběru v minulosti: analýza sekvencí



- MHC: stejné nebo podobné alely byly nalezeny u různých druhů

- když působí selekce, tak se výhodné sekvence udrží i přes období divergence druhů

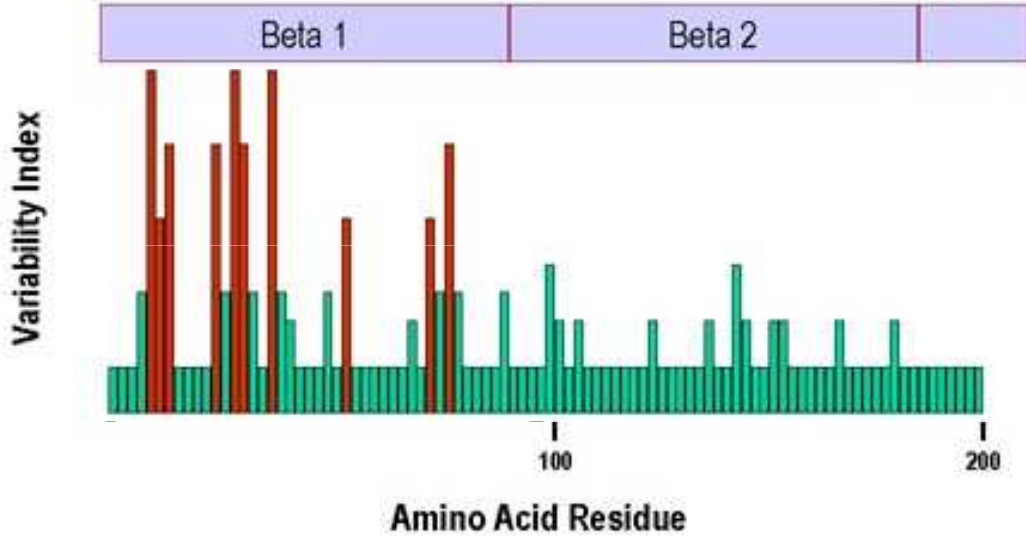
- **trans-species polymorfismus**

dN/dS

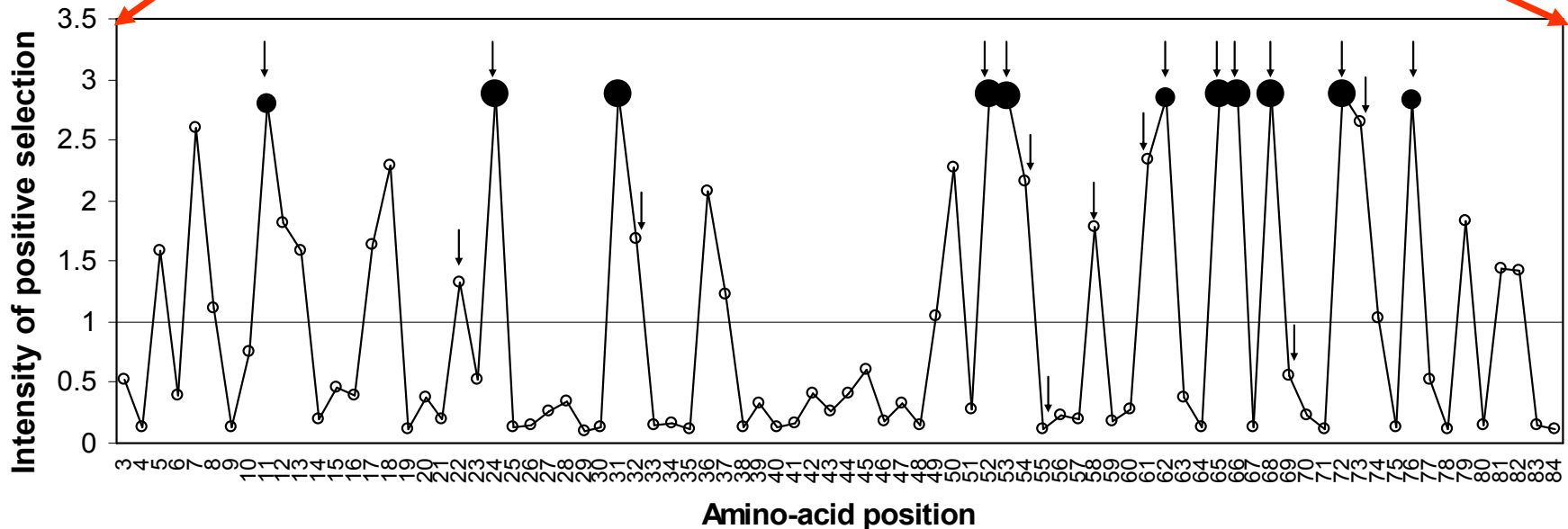
- Poměr **nesynonymních** (dN) a **synonymních** (dS) mutací
- **Alignment** sekvencí stejného genu u více druhů
→ **rozdíly** (mutace)
→ jen některé mutace změni aminokyselinu
- **Korekce** (rozdílné metody, MEGA, PAML)
jen 25 % možných záměn nezmění aminokyselinu
některé typy mutací častější
zpětné a konvergentní mutace (hlavně u více odlišných sekvencí)
- Většinou $dN/dS \ll 1$, selekce eliminuje změny, „purifying selection“
protein se nemění
- $dN/dS \gg 1$ „positive selection“ - MHC
- Různé části proteinu mohou být pod různou selekcí

Class II

Red = antigen binding sites, DRB



„historical positive selection on ABS sites“



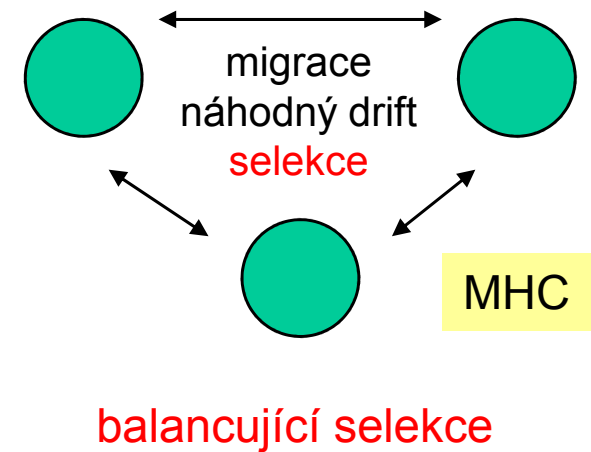
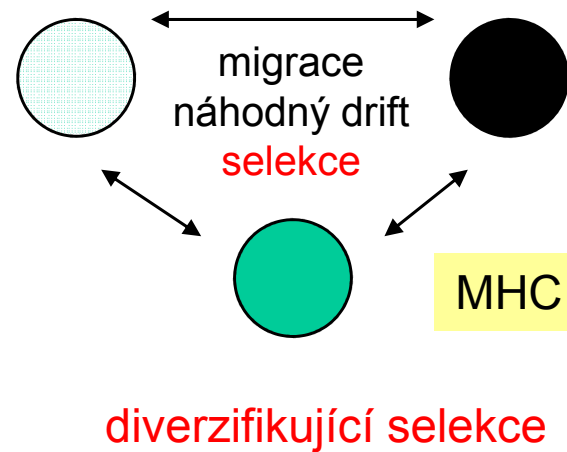
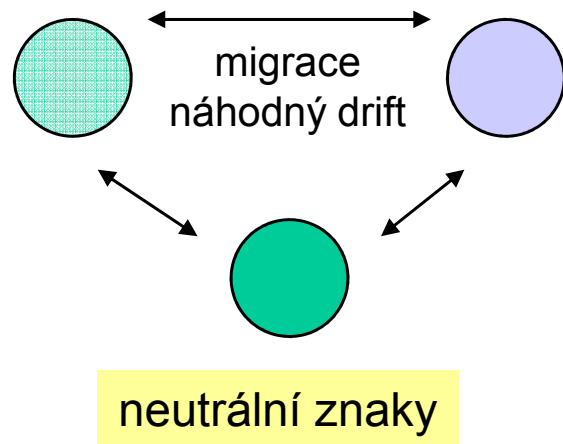
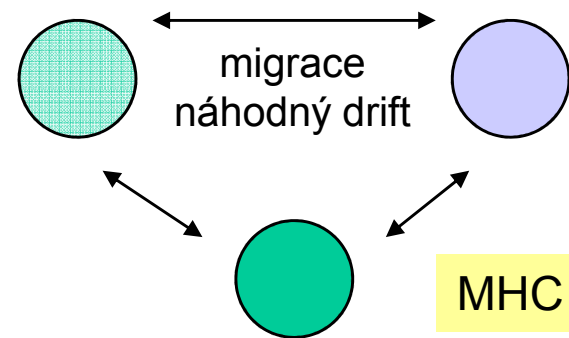
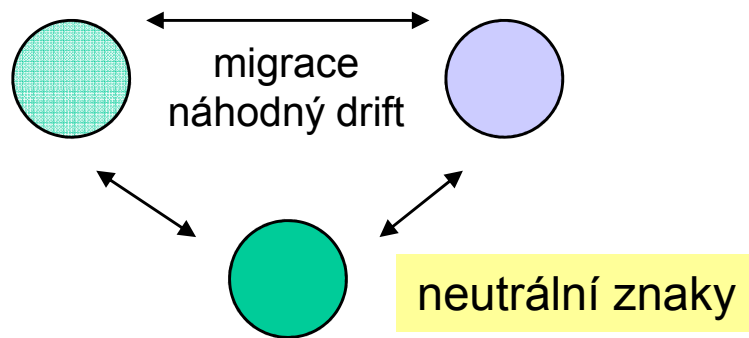
DQA exon 2 in arvicolid rodents

Důkaz a mechanismus recentní selekce

- Srovnání populačně-genetické struktury na MHC genech a neutrálních znacích (mikrosatelity)
- Asociace MHC genů a výskytu parazitů

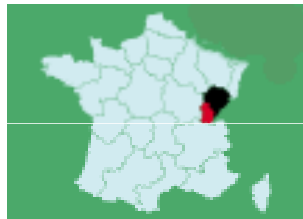
1) Analýza populačně-genetické struktury

- Srovnání populačně-genetické struktury na MHC genech a neutrálních znacích (mikrosatelity)

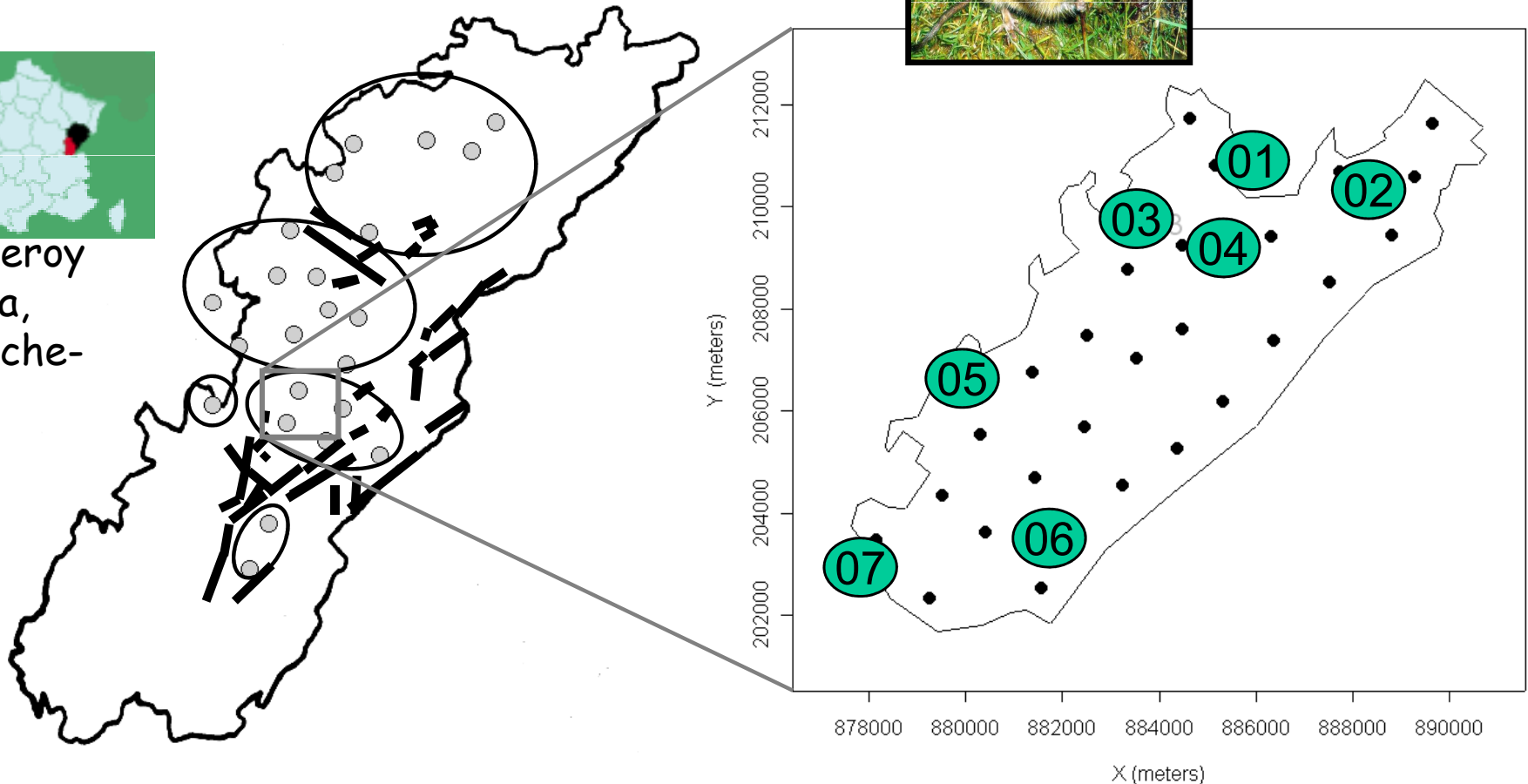


Důkaz přírodního výběru v současnosti: analýza populačně-genetické struktury

- Srovnání neutrálních znaků a MHC

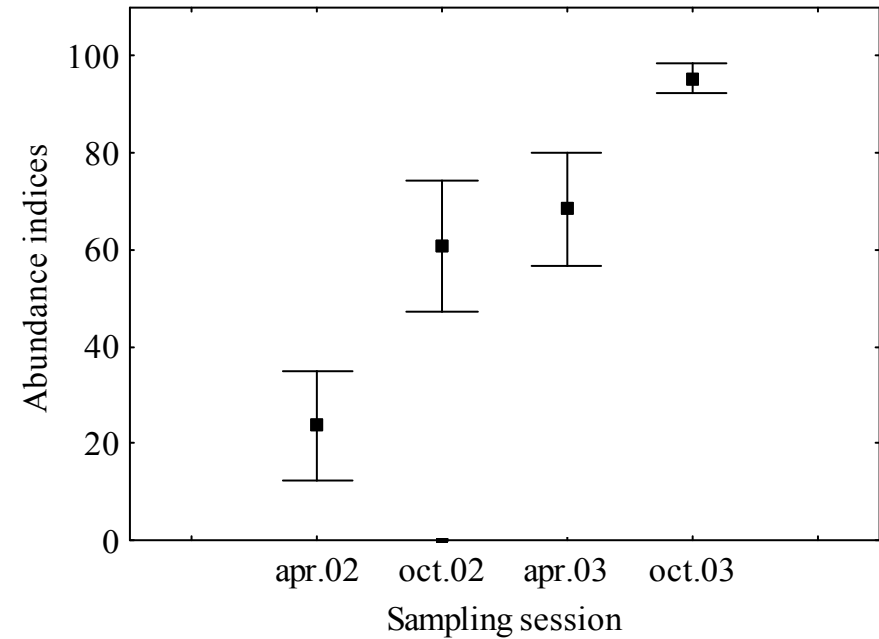
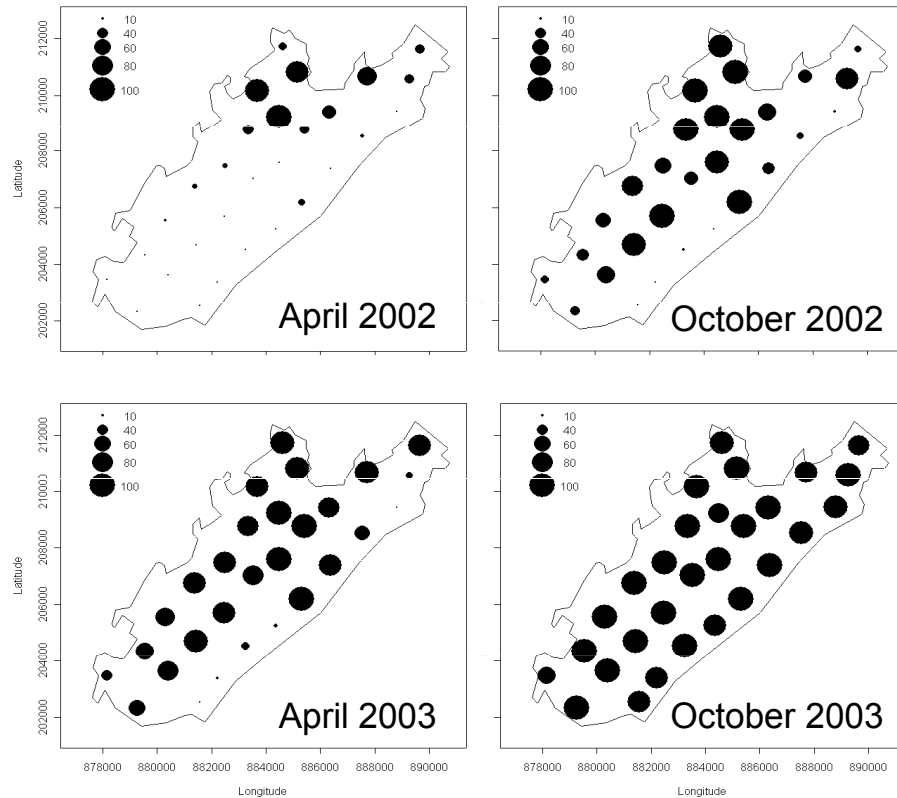


Canton Nozeroy
(pohoří Jura,
région Franche-
Comté)

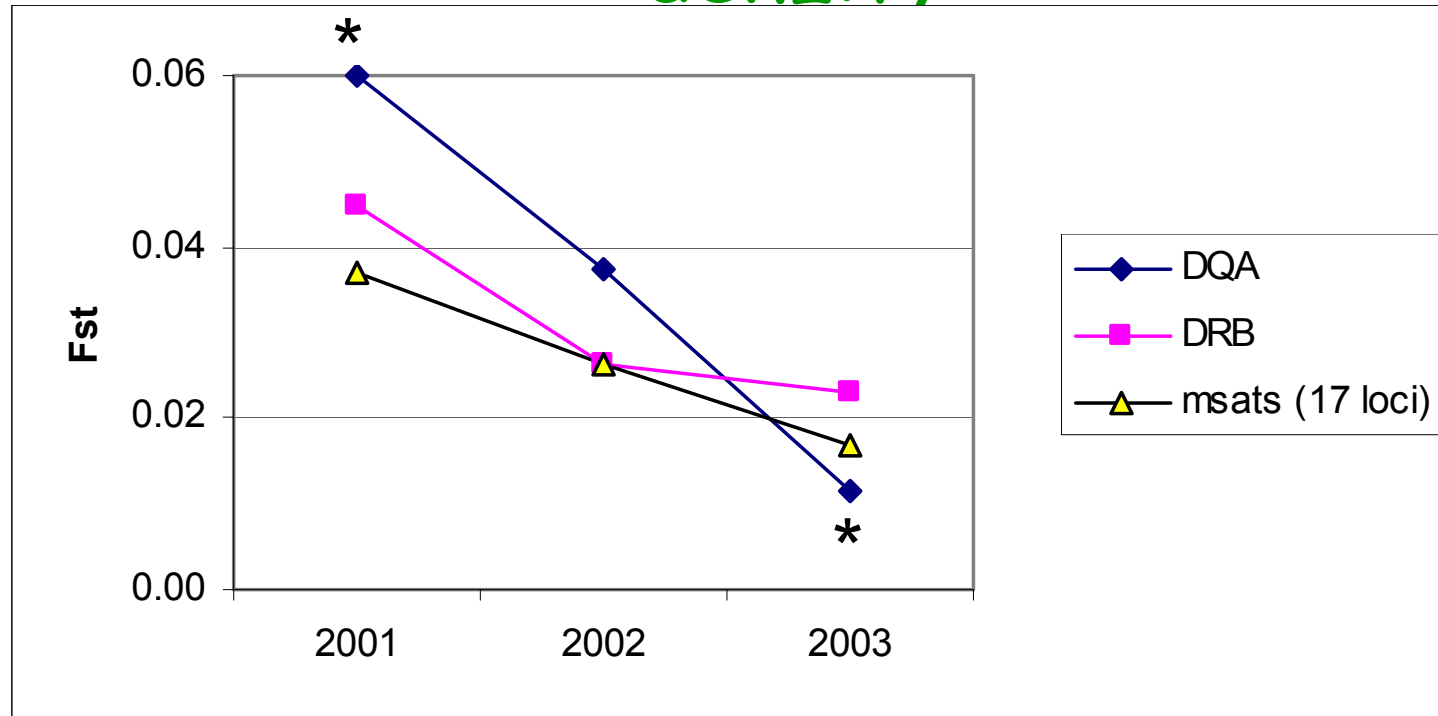


Studované lokality - 7 populací ve
stejně fázi populačního cyklu

→ 2001-2003: fáze růstu populační hustoty



Diferenciace populací v průběhu růstu denzity

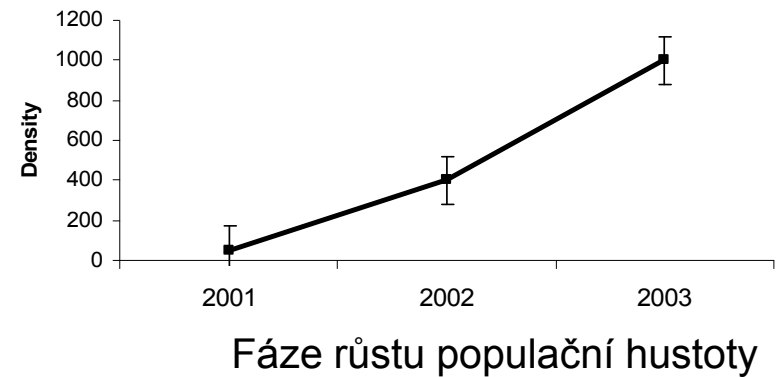
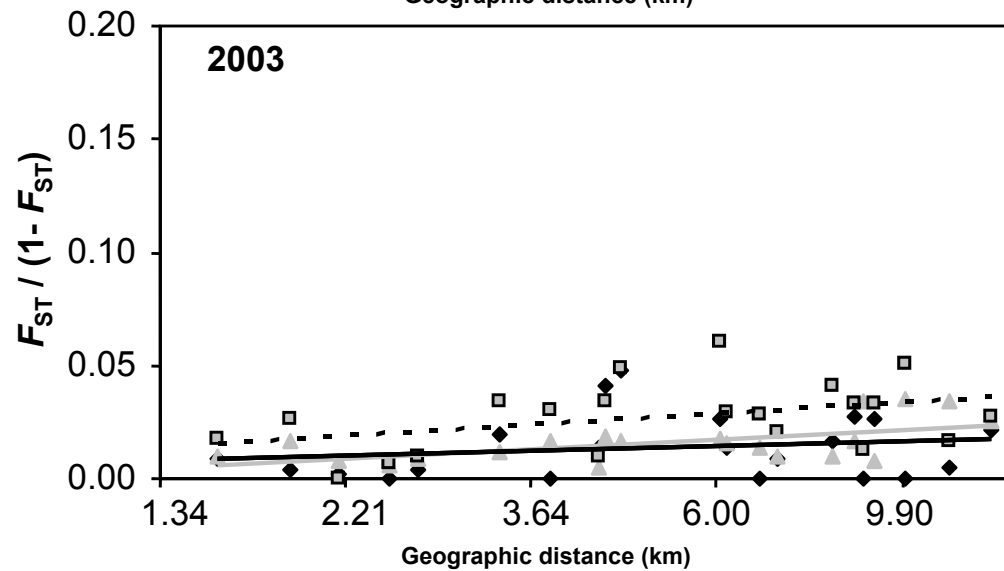
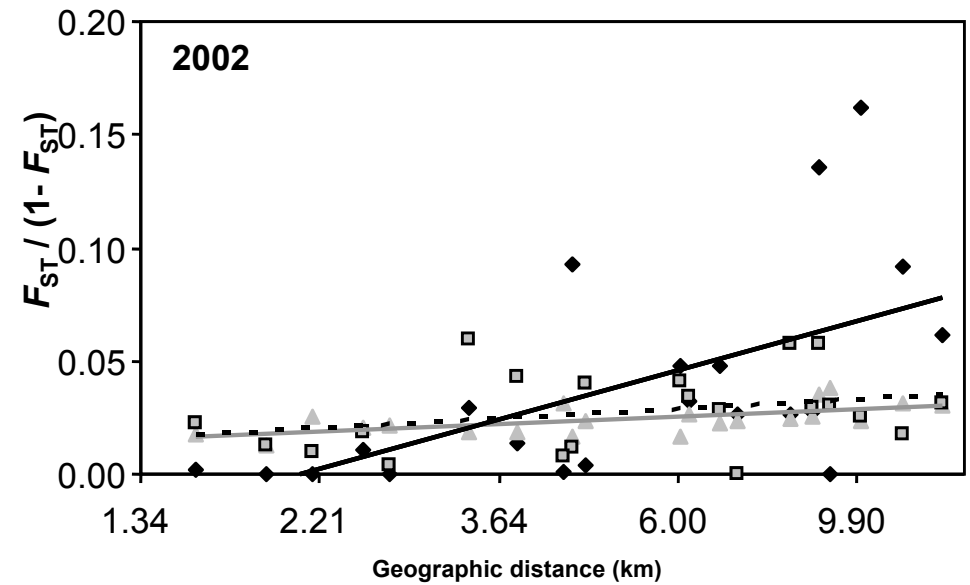
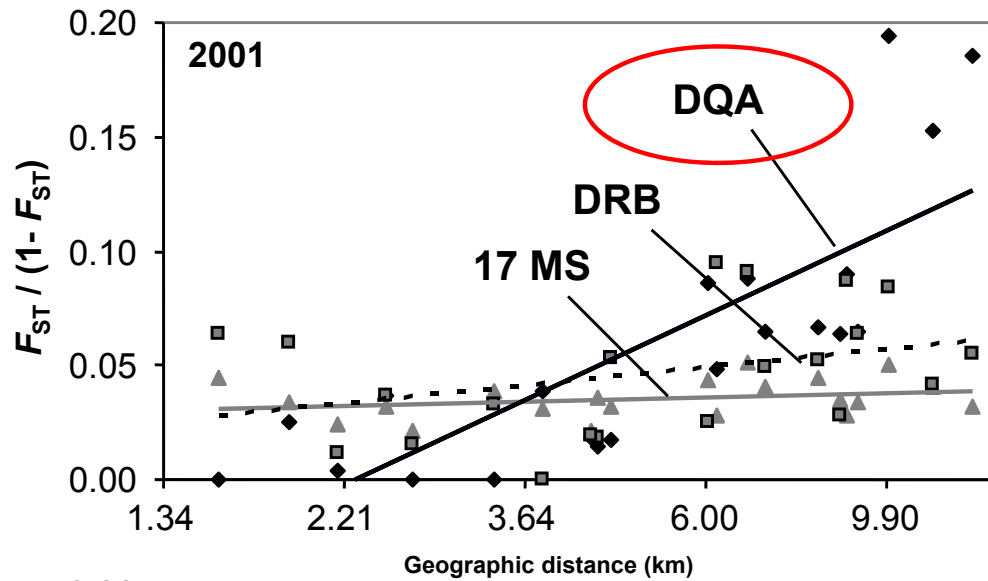


* Signifikantní rozdíl DQA1 vs. mikrosatelity

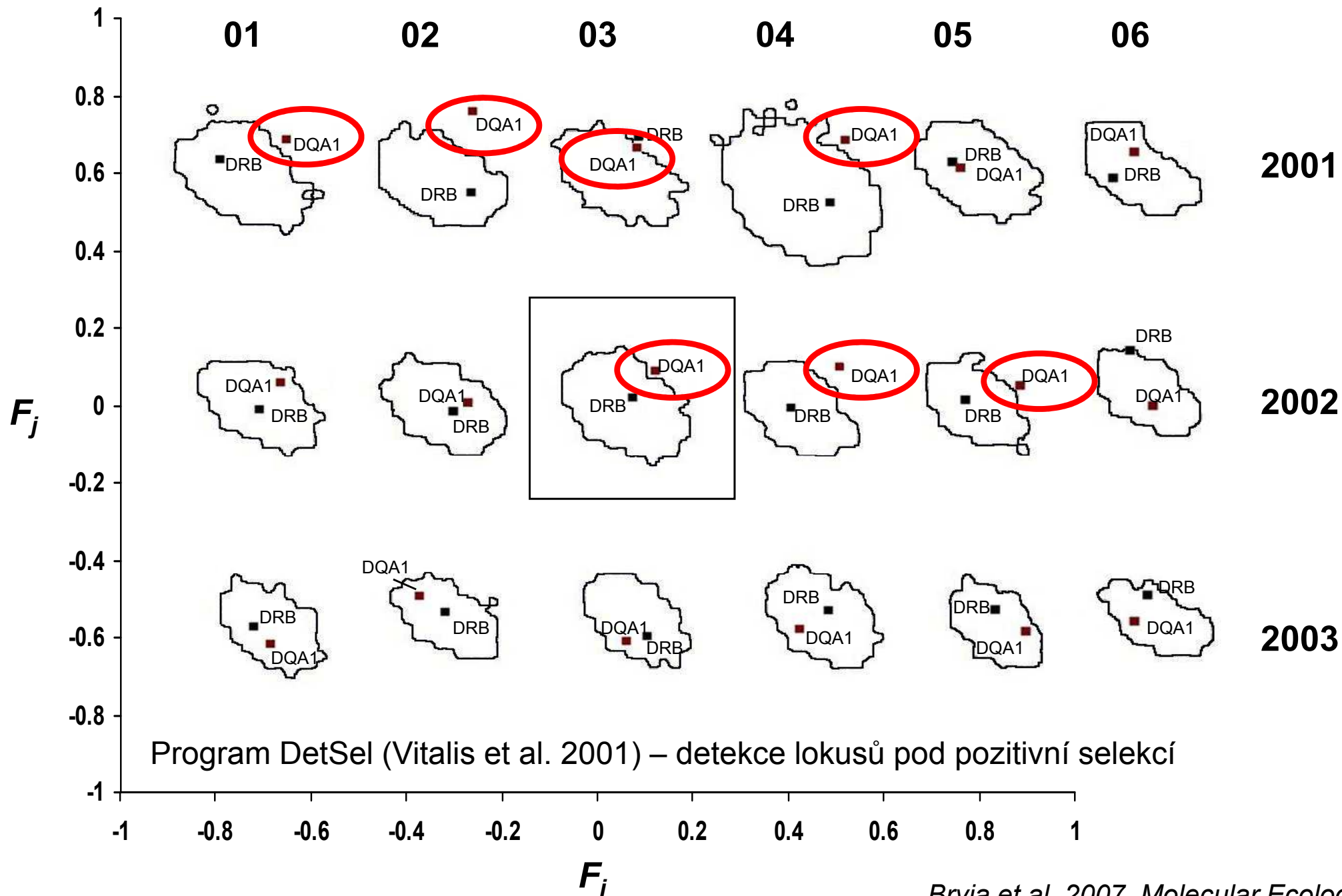
Pokles diferenciace s nárůstem denzity (nárůst disperze, tj. toku genů)

MHC (zejména DQA1) - významně odlišné od mikrosatelitů

Isolation by distance

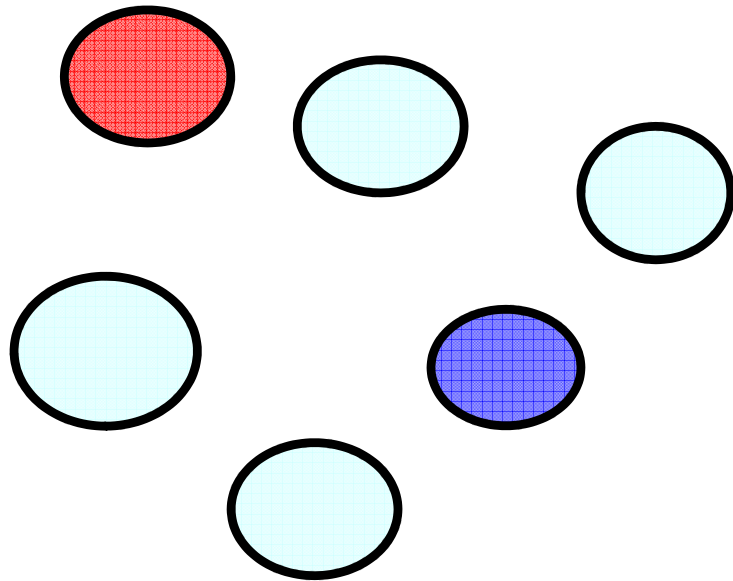


Detekce „outliers“ - populace 07 vs. ostatní



Program DetSel (Vitalis et al. 2001) – detekce lokusů pod pozitivní selekcí

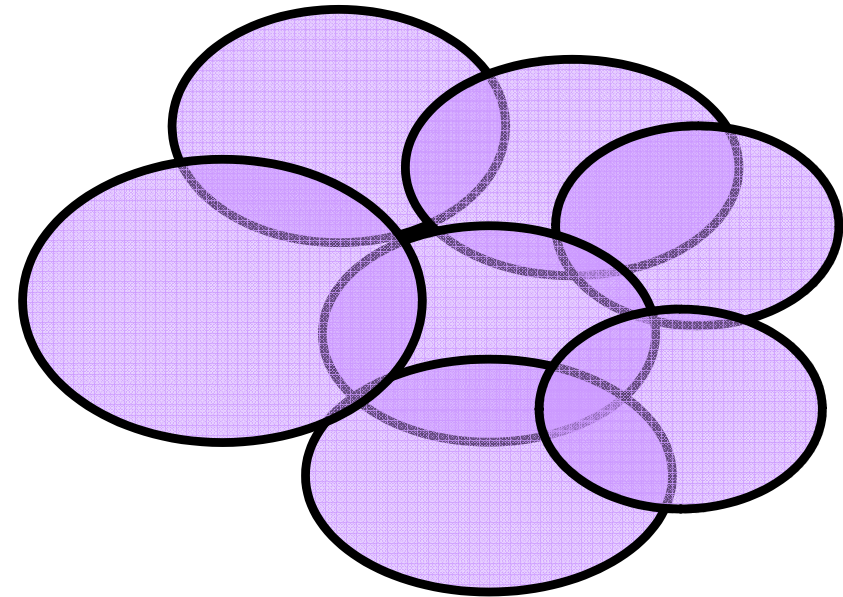
Závěr: Typ selekce na MHC závisí na početnosti populace



Nízká denzita

Lokální rozdíly ve
společenstvech patogenů

**Lokální diverzifikující
selekce**



Vysoká denzita

Nárůst diverzity
parazitů v důsledku
disperze

Balancující selekce

Jaké jsou mechanismy přírodního výběru pro udržení vysoké variability MHC?

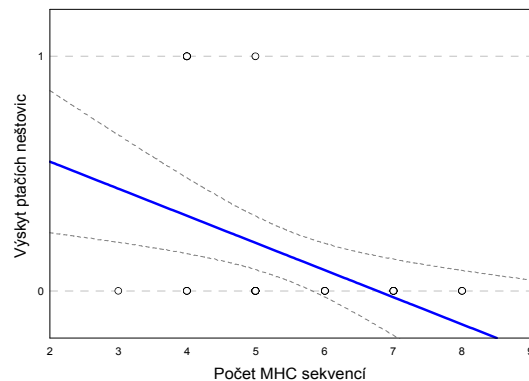
- Hypotéza výhody heterozygotů – mají 2x více alel než homozygoti, tj. mohou rozeznávat 2x více patogenů
- Výhoda vzácné alely (= selekce negativně závislá na frekvenci)

Výhoda heterozygotů



- Člověk – rychlost vývoje onemocnění HIV nebo hepatitidy B je asociována s MHC heterozygotností

- Dva druhy ryb – heterozygoti mají vyšší přežívání při umělému vystavení virům a helmintům



Pravděpodobnost výskytu ptačích neštovic klesá s počtem MHC alel



Hýl rudý (*Carpodacus erythrinus*)

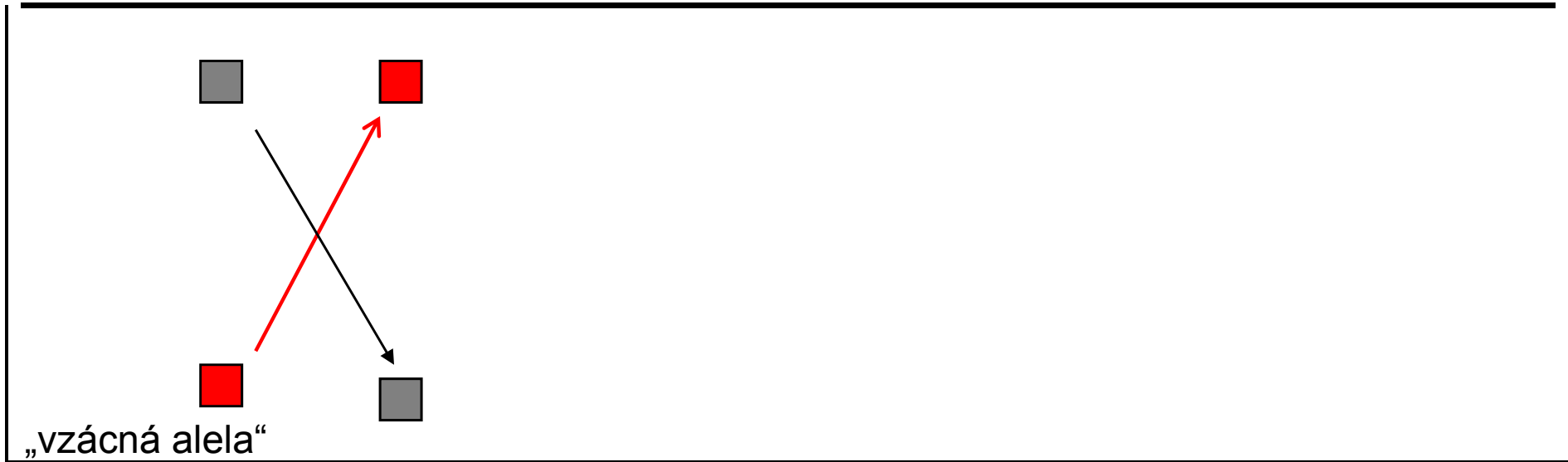
- Nejednoznačné výsledky v mnoha dalších příkladech
- Teoretické modely tuto hypotézu nepodporují ...

Výhoda vzácné (výhodné) alely

- Dynamická koevoluce mezi hostitelem a parazitem

Výhoda vzácné (výhodné) alely

Frekvence alely



Čas

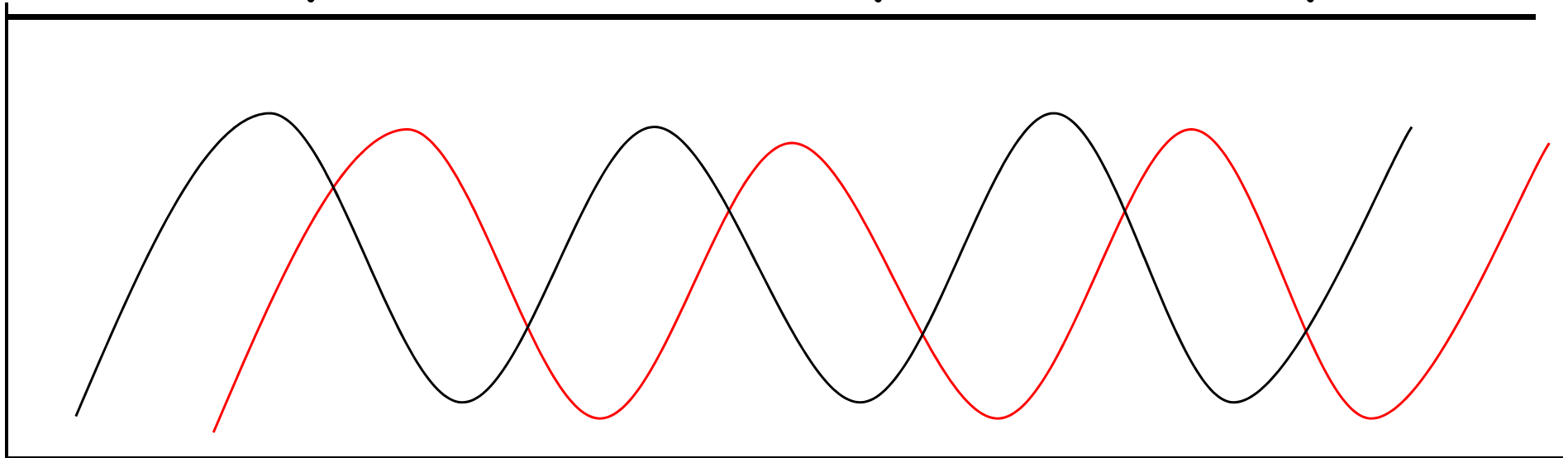
Frekvence parazita



Čas

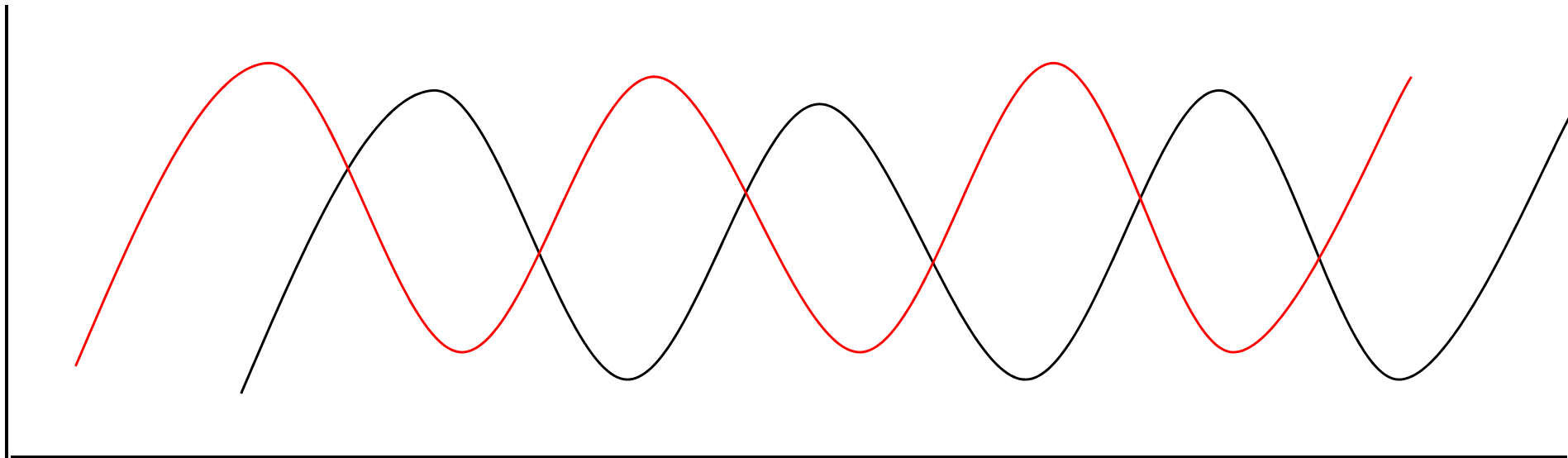
Výhoda vzácné (výhodné) alely

Frekvence alely



Čas

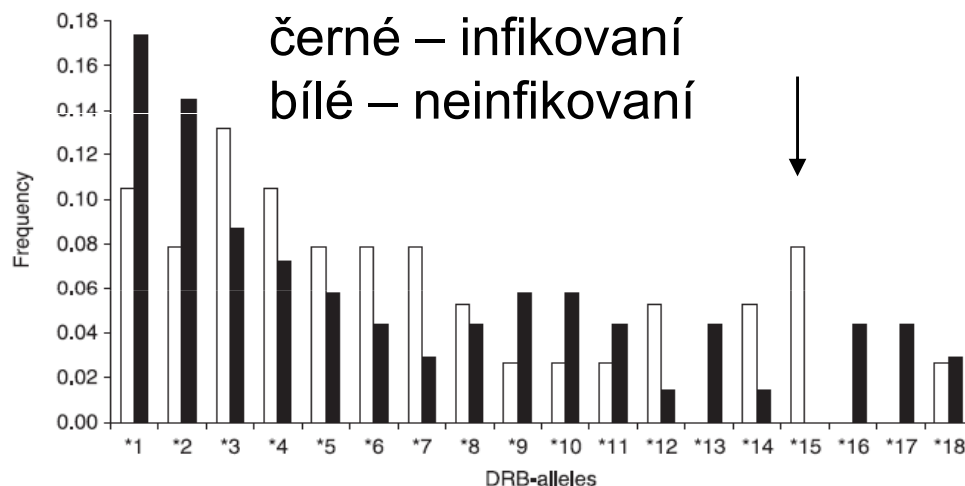
Frekvence parazita



Čas

Výhoda vzácné (výhodné) alely

- Dynamická koevoluce mezi hostitelem a parazitem
- Asociace mezi MHC alelou (alelami) a intenzitou napadení parazity (hlodavci, lemuři – 2005 a novější) nebo přežíváním při bakteriální infekci (lososi)

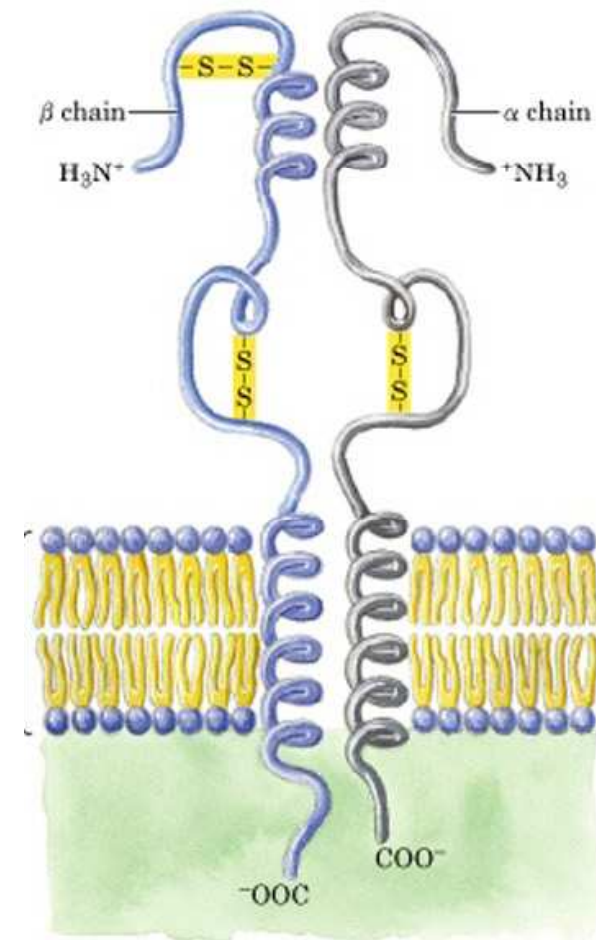


Gerbillurus paeba
(Harf & Sommer 2005)

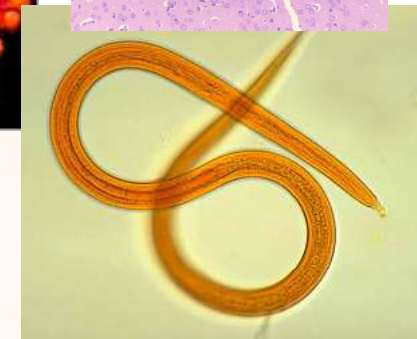
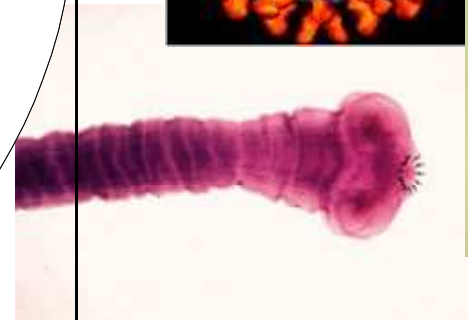
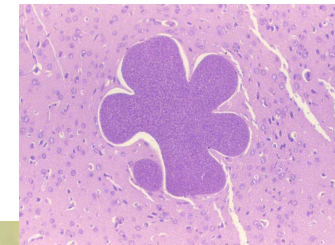
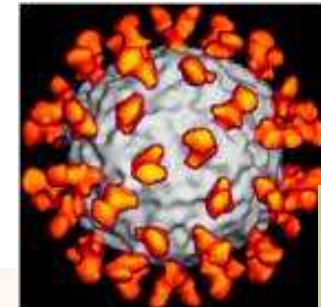
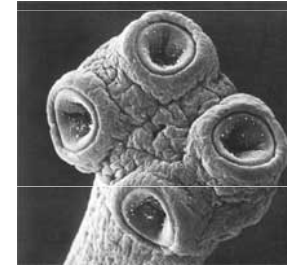
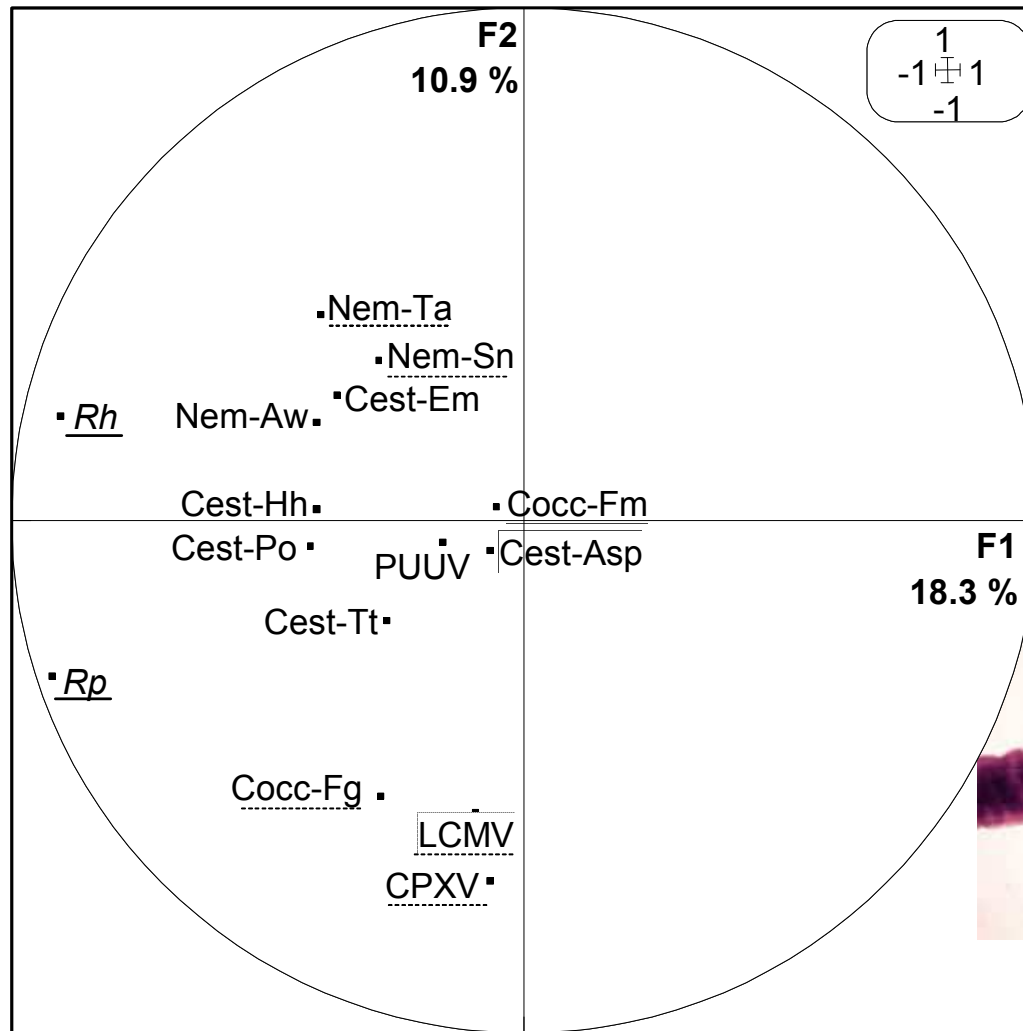
- Zdá se být pravděpodobnější než „výhoda heterozygotů“
- Nutno prokázat, že skutečně dochází k časovým změnám ve frekvenci alel a parazitů – **dlouhodobé studie neexistují !!!**

Vícerozměrné analýzy

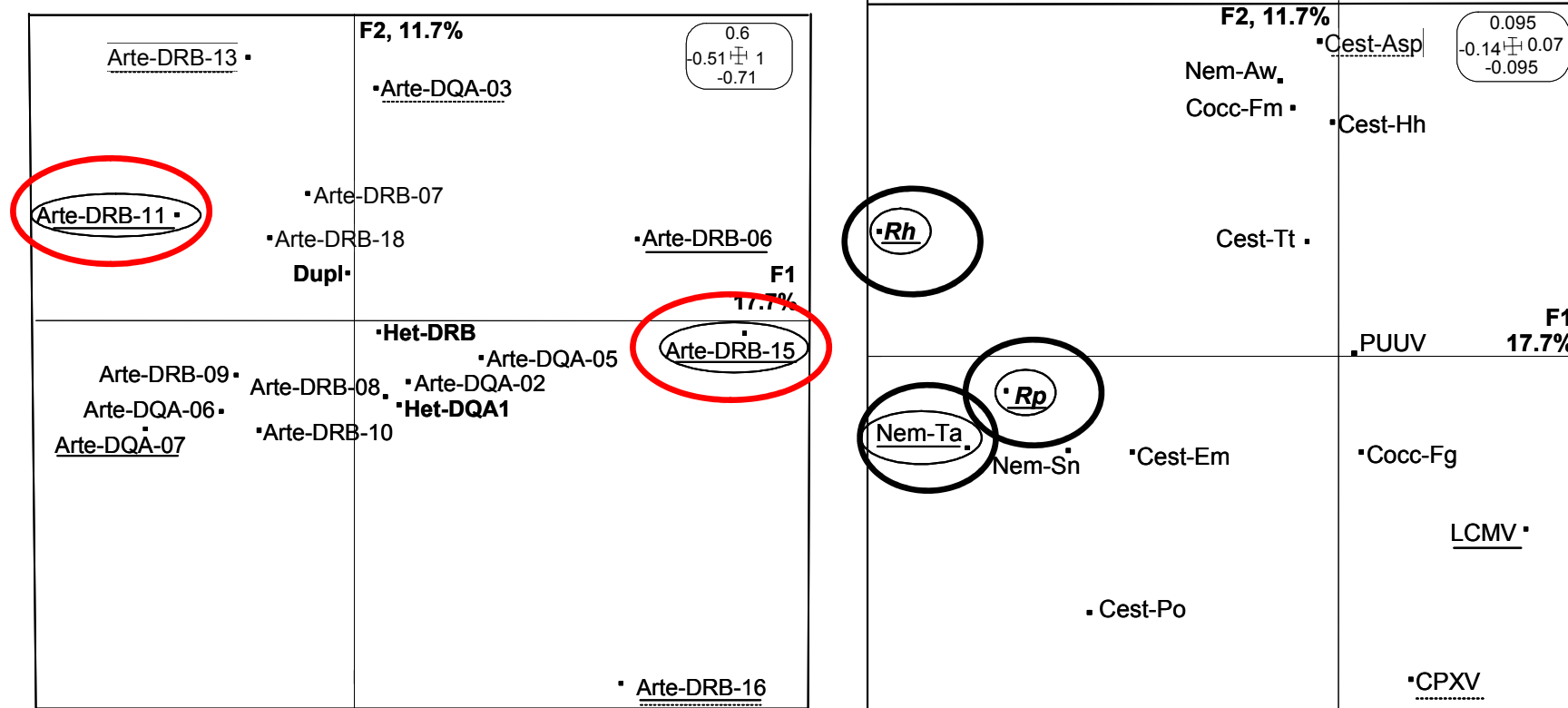
F2 12.7 %	<u>Arte-DRB-11</u>	1.7 -1 ± 1.5 -1.5
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Arte-DQA-07</u> ▪ <u>Arte-DRB-10</u> ▪ <u>Arte-DRB-16</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arte-DQA-02 	<u>Arte-DQA-06</u>
<u>Arte-DRB-07</u>	Het-DQA1 Het-DRB	<u>Arte-DRB-09</u>
<ul style="list-style-type: none"> Arte-DQA-03▪ Arte-DRB-06▪ Arte-DRB-08▪ Arte-DQA-05▪ 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arte-DRB-18 ▪ Dupl ▪ Arte-DRB-15 ▪ <u>Arte-DRB-13</u> 	F1 14.6 %



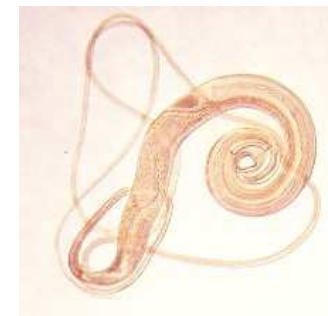
Parazitologická data - PCA



Analýza koinercie (co-inertia analysis)



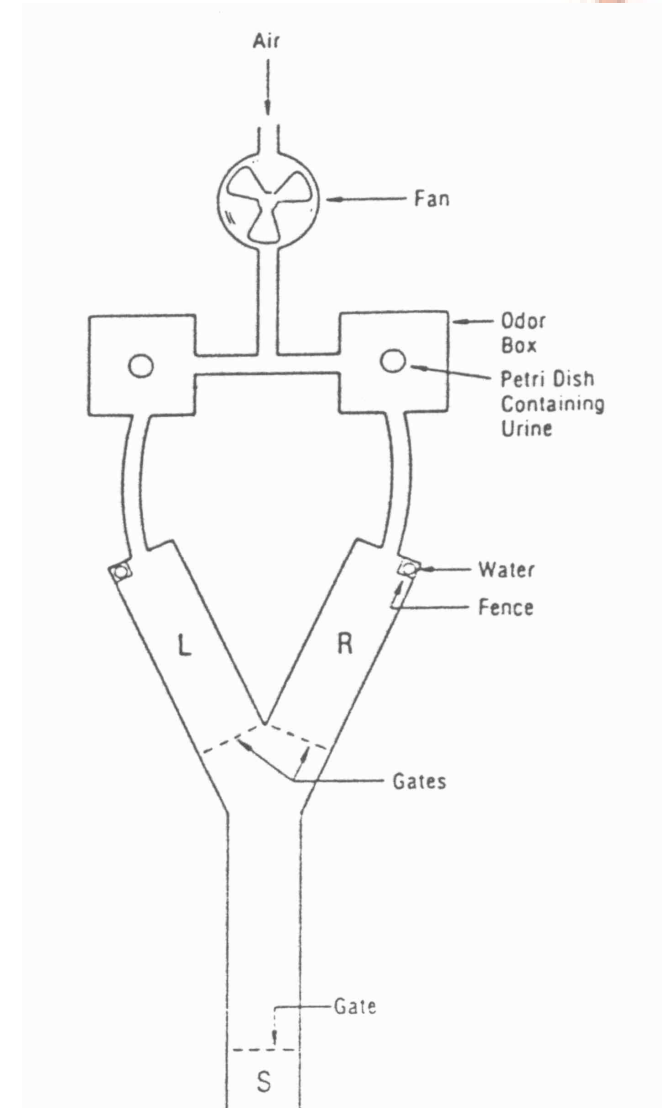
Alely DRB-11 a DRB-15 mají antagonistický efekt vzhledem k *Trichuris arvicolae* a k celkové diverzitě parazitů



Výběr partnera a MHC



- 90. léta – experimenty s laboratorními kmeny myši vs. složení MHC
- pachové signály jsou využívány při rozeznávání příbuznosti a výběru partnera
- myši si vždy vybíraly partnera s odlišným MHC

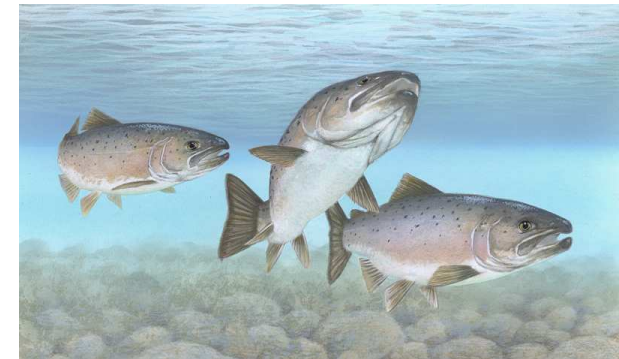


Hypotézy pohlavního výběru podle MHC

Ideál: Výběr partnera se specifickým genotypem zajišťujícím rezistenci

A) Výběr partnera s odlišným MHC – „inbreeding avoidance hypothesis“

- MHC = „komplementární geny“



Hypotézy pohlavního výběru podle MHC

Ideál: Výběr partnera se specifickým genotypem zajišťujícím rezistenci

B) Výběr partnera, který nemá parazity (tj. není nemocný)

- MHC = „dobré geny“, které lze „cítit“

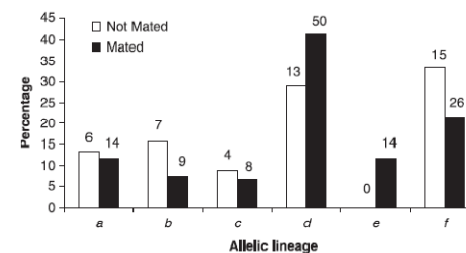


Hypotézy pohlavního výběru podle MHC

Ideál: Výběr partnera se specifickým genotypem zajišťujícím rezistenci

C) Výběr nejlepšího partnera, který nemá parazity, ale má ještě „něco navíc“

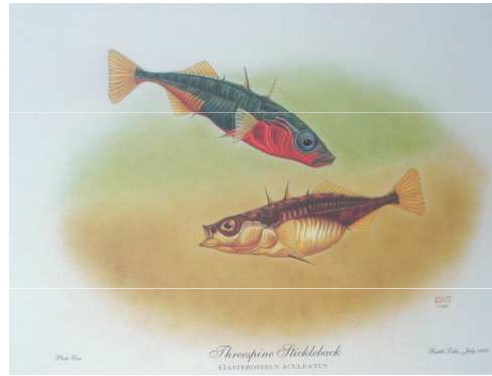
- MHC = „dobré geny“, umožňující expresi sekundárních pohlavních znaků



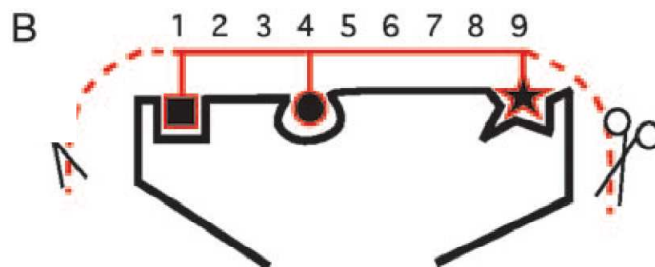
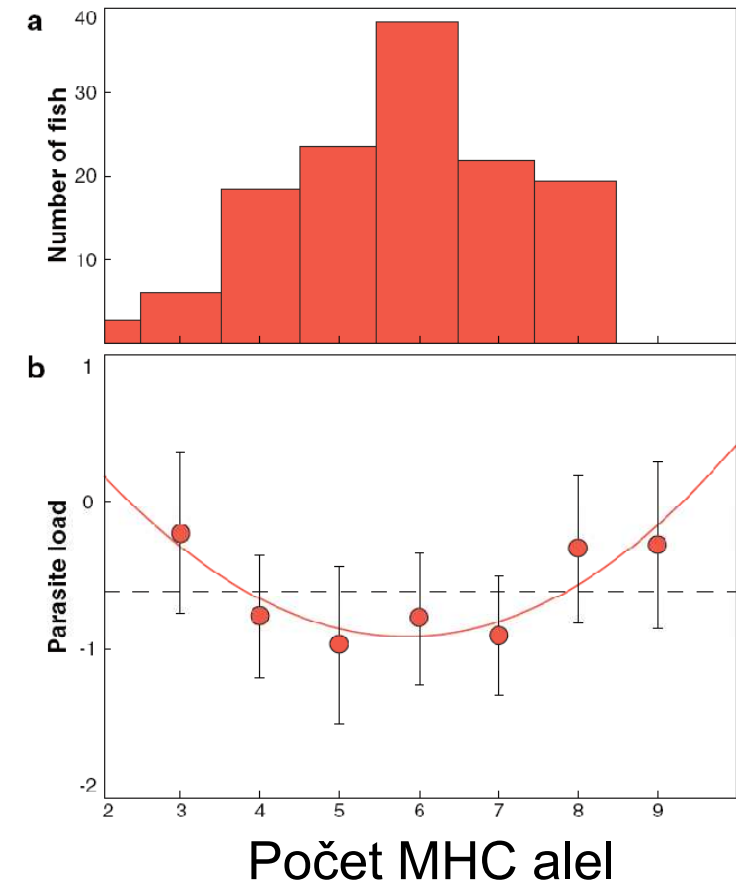
Gallinago media
Ekblom et al. 2005

Gasterosteus aculeatus

Milinski et al. (2001-dosud)



- Nedávno duplikované MHC class IIB geny
- Nejvíce jedinců má střední počet alel
- Střední počet alel = minimum parazitů
- ♀♀ „počítají“ vlastní počet alel a vybírají si ♂♂ tak aby optimalizovali počet alel u potomstva
- Výběr je ovlivněn strukturou komplexu MHC-peptid



„zlatá střední cesta“

- ideální počet alel se liší v závislosti na prostředí (tj. diverzitě parazitů)

Methods for MHC analyses

- **Identification of allele sequences - cloning and sequencing methodology**

Cloning and sequencing

- separation of two (or more in duplicated genes) alleles

each clone contain the only allele

vector =

pl

!!! cloning - 1000 Kč
!!! sequencing 1 clone - 150 Kč

ligation, transformation



Ex.: duplicated gene = max 4 diff. alleles

Methods for MHC analyses

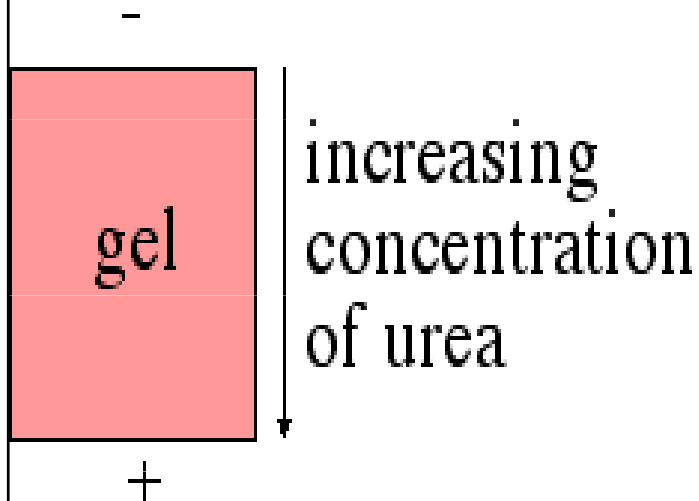
- Identification of allele sequences - cloning and sequencing methodology
- **Population screening** - methods for mutation detection (TGGE, DGGE, SSCP - gel and capillary variants)

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

The small (200-700 bp) genomic fragments are run on a low to high denaturant GRADIENT acrylamide gel

Each fragments move according to molecular weight, but as they progress into more denaturing conditions, each (depending on its sequence composition) reaches

A POINT where the DNA BEGINS TO MELT



↓

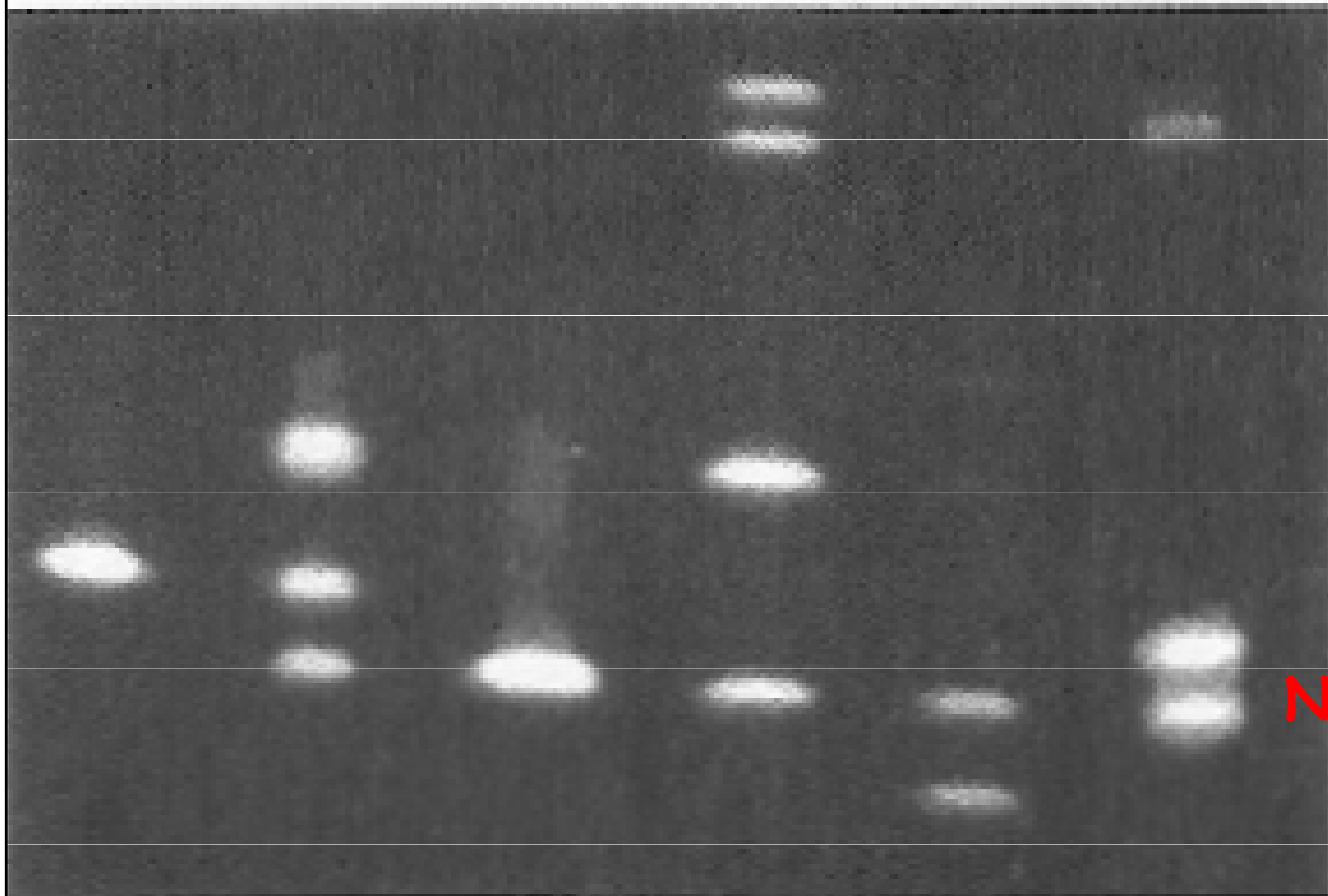
They retard, and we will see shift in mobility

↓

We will see different shifts in mobility for differing products

Many samples in one gel - we will not see any curves

1 2 3 4 5 6



1 - normal homozygote

3 - Homozygous mutations will yield one band on a different position

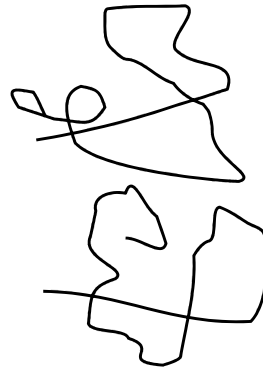
2, 4, 5, 6 - heterozygous mutations will yield 4 bands (2 homozygous and 2 heterozygous)

**NOT ALL BANDS ARE SEEN
!!!!**

Single strand conformation polymorphism (SSCP)

Allele 1

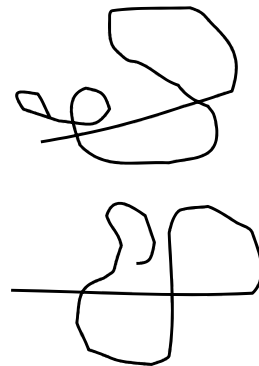
...CGCTTCAGG ...
...GCGAAGTCC...



heating - denaturation
snap-cooling → partial renaturation

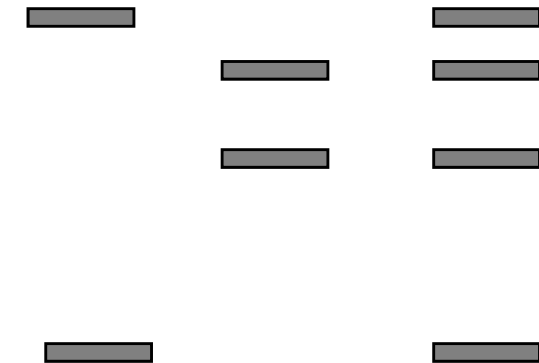
Allele 2

...CGCTTAAGG ...
...GCGAATTCC...



sequence-specific
ssDNA conformations

Homo1 Homo2 Hetero



!!! non-denaturing PAGE

radioisotopes
silver-staining
fluorescent dyes (SYBR gold)

The use of automated sequencers

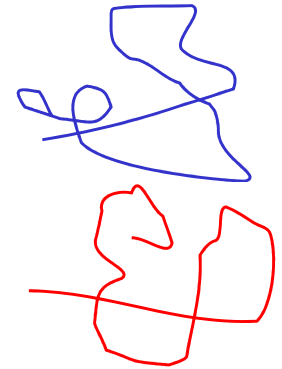
Why not non-denaturing electrophoresis?

CAP (conformation analysis polymer) - Applied Biosystems



Allele 1

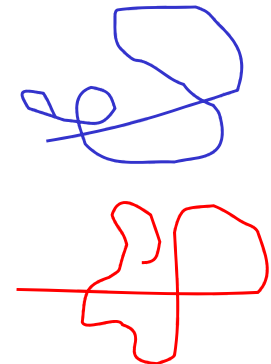
FAM... CGCTTCAGG ...
... GCGAAGTCC ...*HEX*



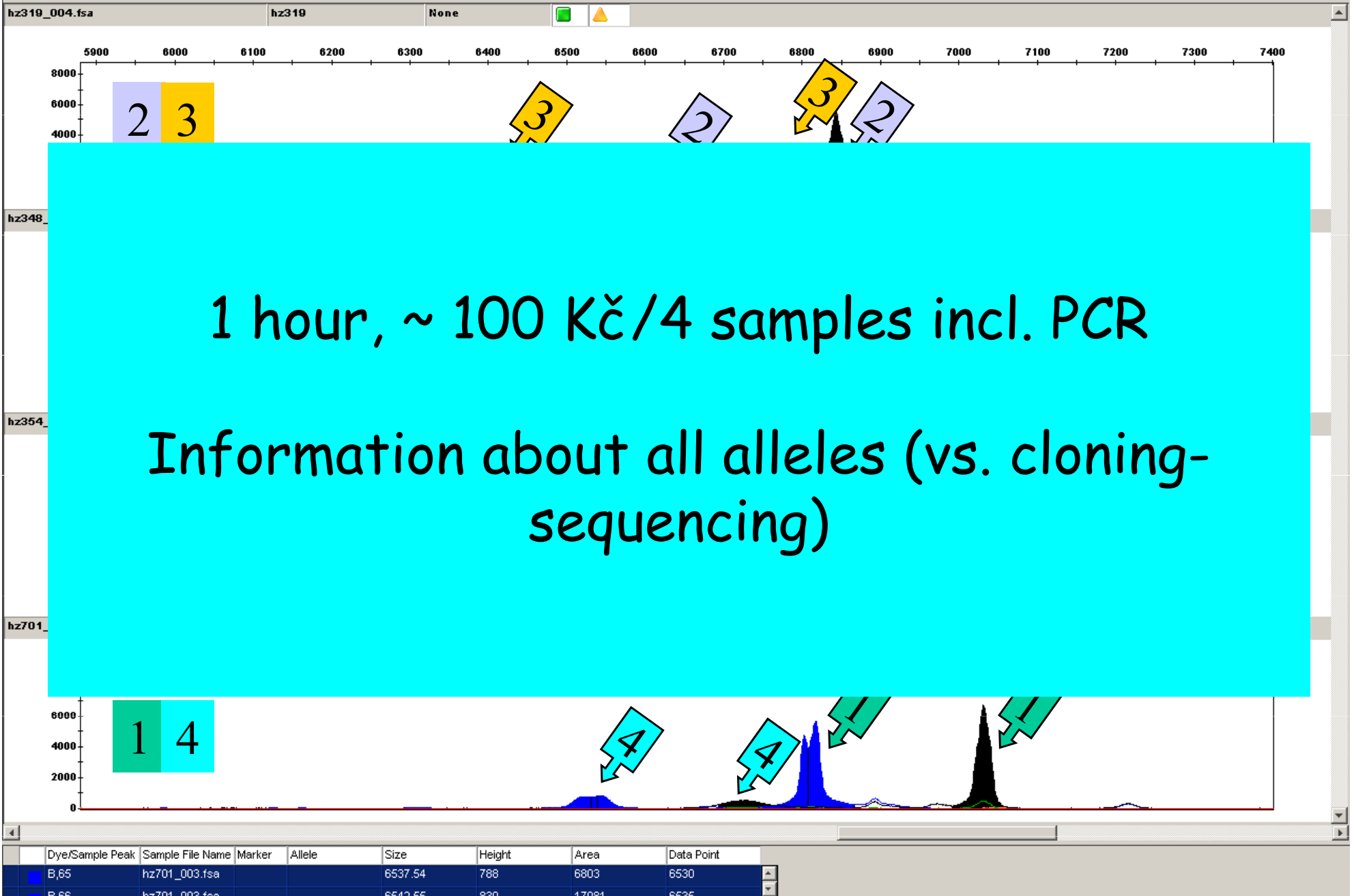
- well controlled electrophoresis
- two fluorescent labels
- high sensitivity

Allele 2

FAM... CGCTTAAGG ...
... GCGAATTCC ...*HEX*



MHC Class II (DQA gene) – mice HZ



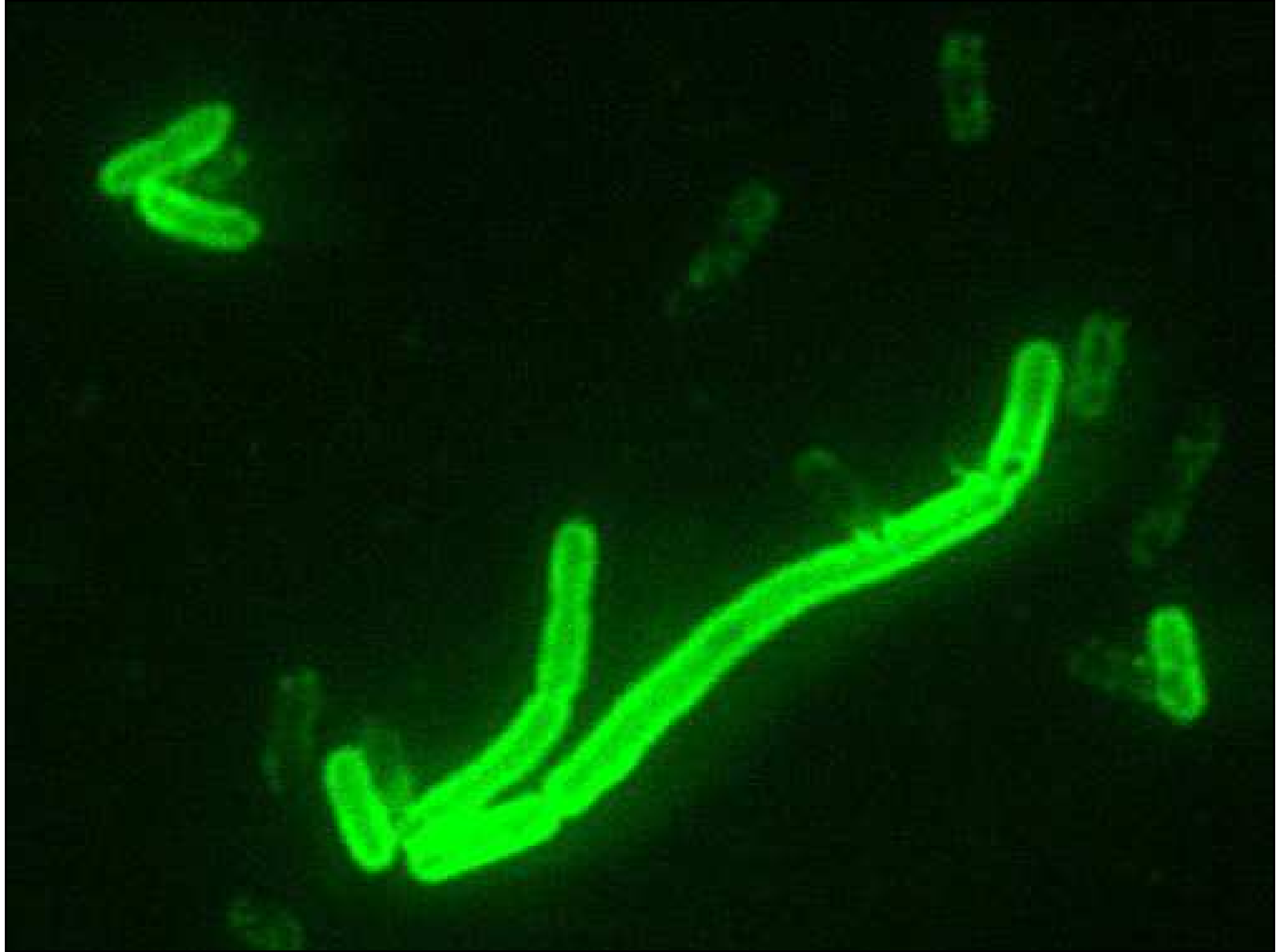
[X 6128,09 Y 5929]

Methods for MHC analyses

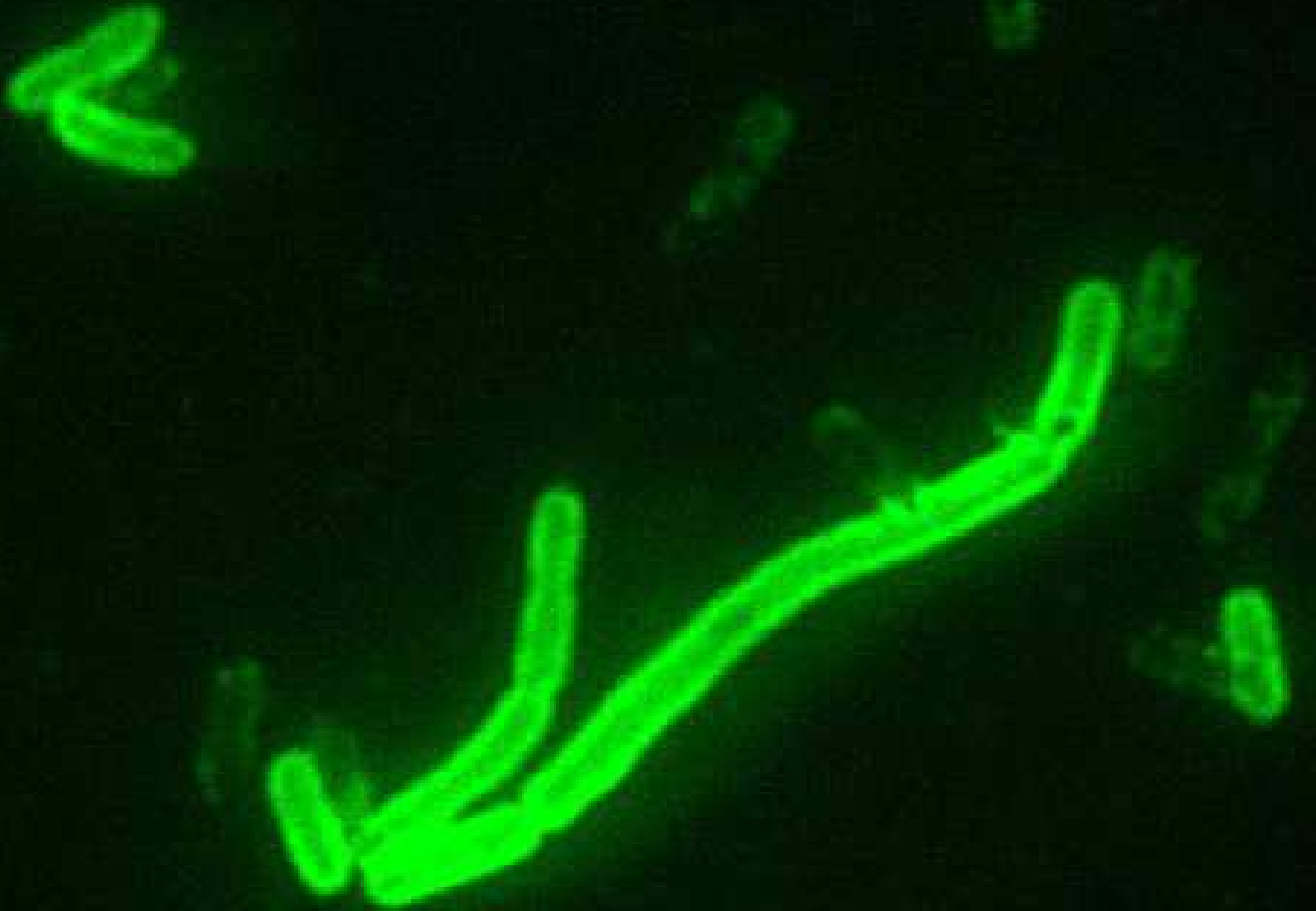
- **Identification of allele sequences** – cloning and sequencing methodology
- **Population screening** – methods for mutation detection (TGGE, DGGE, SSCP – gel and capillary variants)
- **DNA vs. cDNA analysis !!!** (cDNA analysis is more rigorous due to common existence of pseudogenes)

Kam dál ve výzkumu MHC v evoluční ekologii?

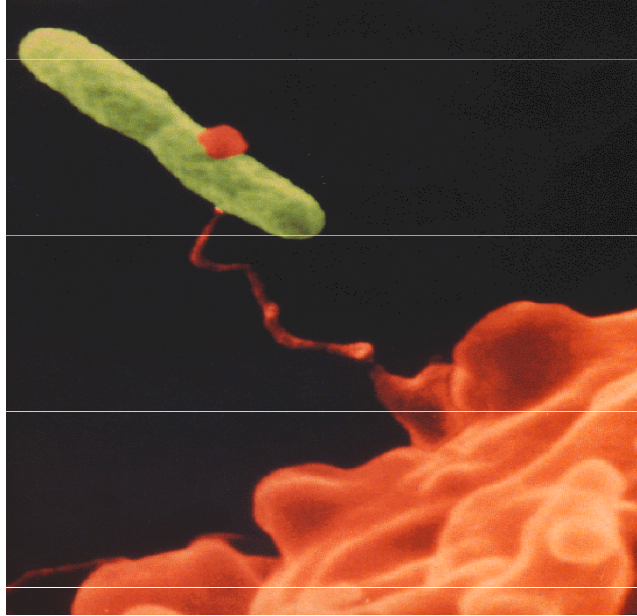
- zvýšit počet studií na divokých populacích (s údaji o parasitech, neutrální genetické variabilitě, údaje o kondici zvířat atd.)
- experimenty v zajetí s jedinci se známým MHC genotypem (a sledování vlivu na přežívání a reprodukční úspěšnost)
- genomika, transkriptomika, proteomika – popis „skutečné“ MHC variability



MHC je důležité, ale ...

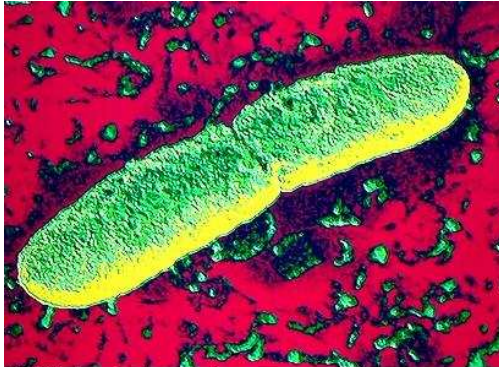


Kdo nejrychleji zjistí přítomnost patogenu?



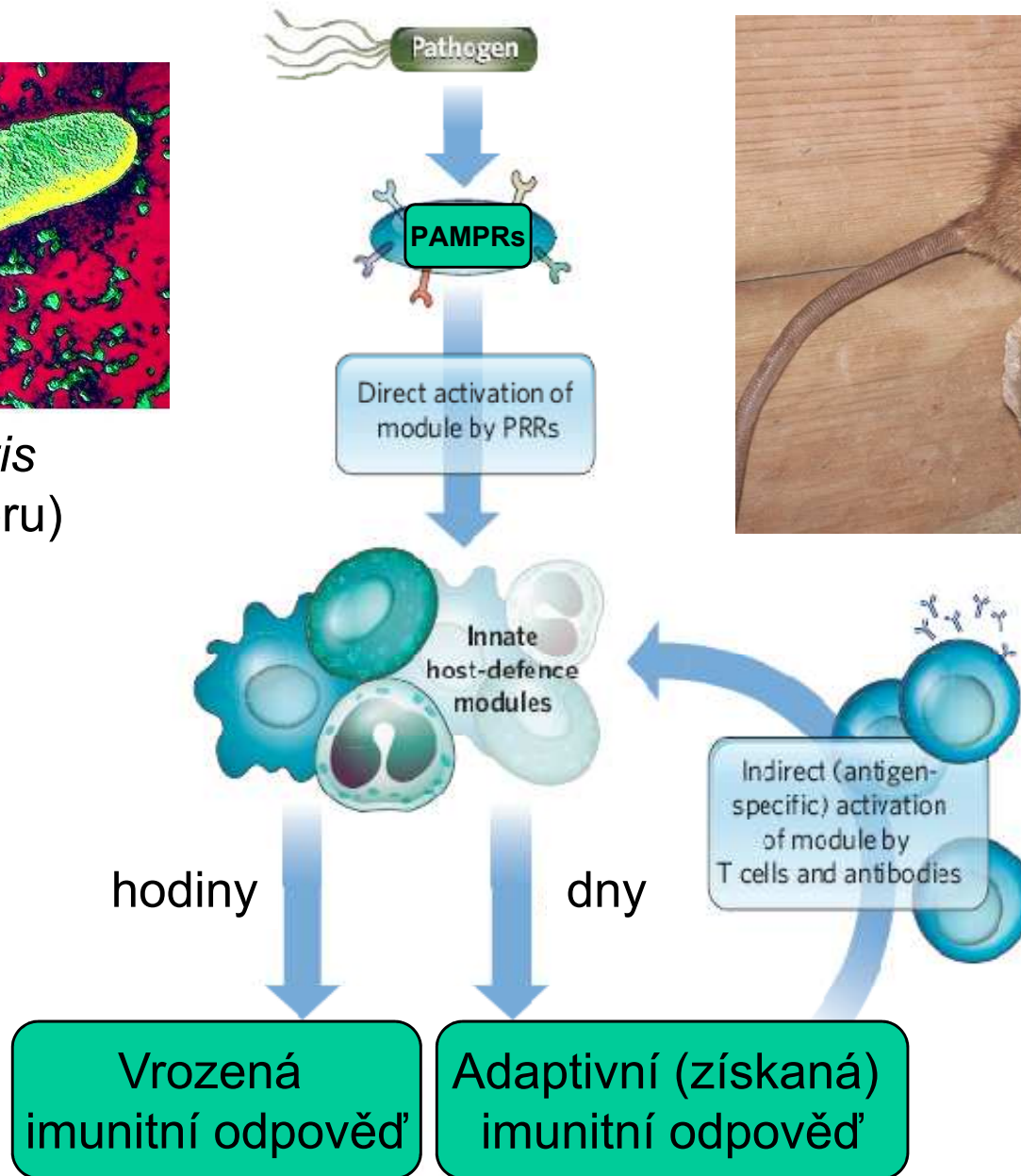
- Receptory vrozené imunity
 - První obrannou linii tvoří specifické receptory, které nejsou součástí adaptivní imunity
 - Tyto receptory jsou vrozené a připravené „v předstihu“ = „vrozená imunita“
- Fungují jako „PAMPs“ (*pathogen associated microbial pattern receptor*)
 - Jsou jedny z prvních molekul, které identifikují přítomnost patogenu a alarmují imunitní systém
 - Doteď je známo 11 TLRs u myši (poprvé zjištěny v 90. letech)
 - Jsou velmi konzervativní – molekuly tohoto typu jsou i u rostlin

Signalizace přes TLRs



© 1997 The Learning Company, Inc.

Yersinia pestis
(původce moru)

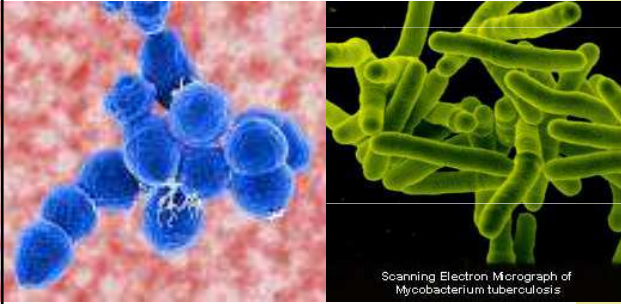
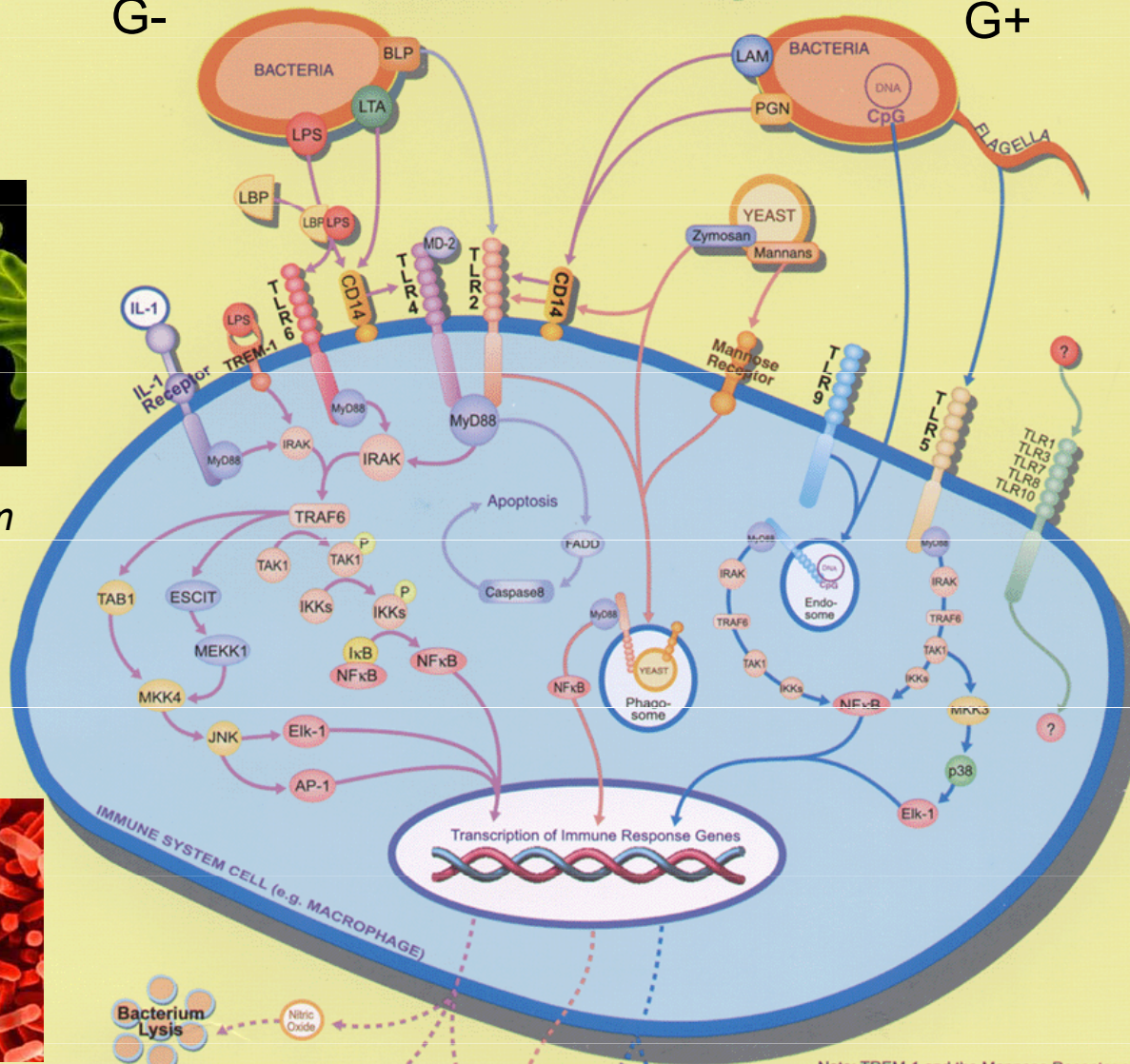


© Miloš Anděra

Toll-Like Receptors

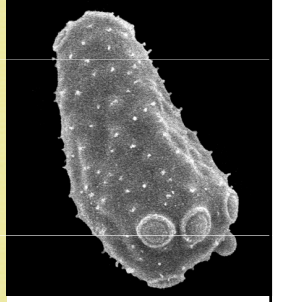
G-

G+

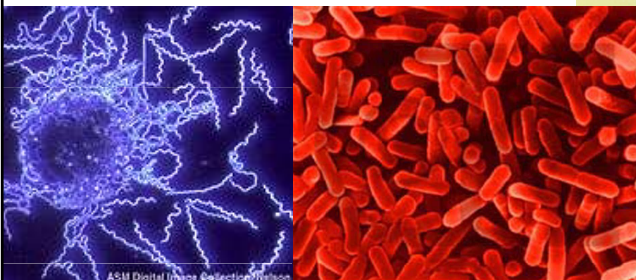


Scanning Electron Micrograph of Mycobacterium tuberculosis

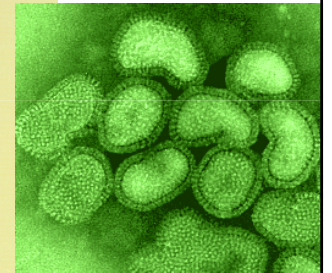
Staphylococcus Mycobacterium
G+ bacteria



kvasinka



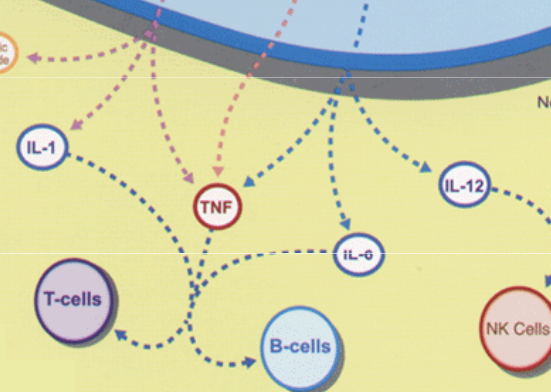
Borrelia Legionella
G- bacteria



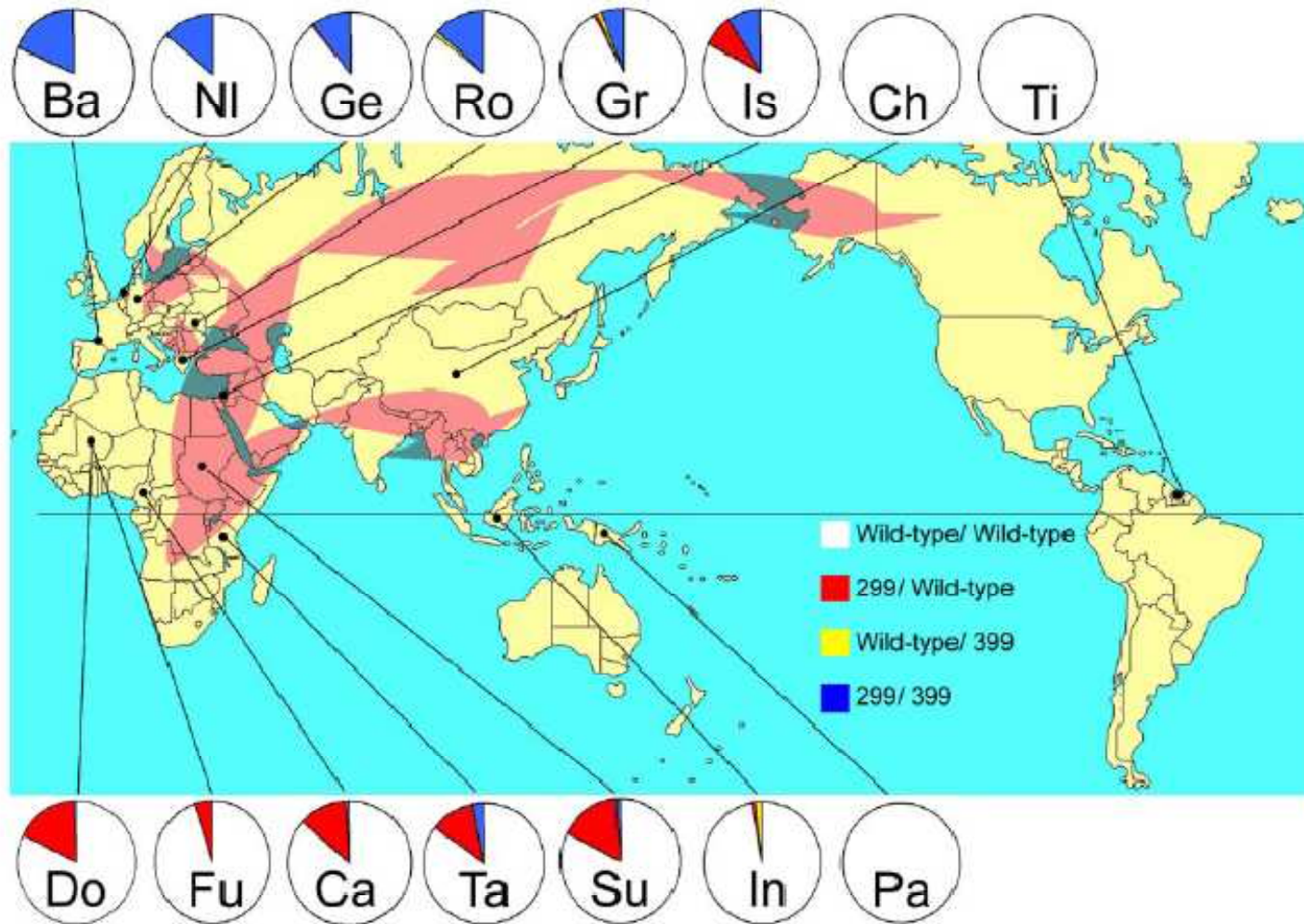
virus
chřipky

Terminology
TLR: Toll-Like Receptor
BLP: bacterial lipoprotein
LAM: lipoarabinomannan
LPS: lipopolysaccharide
LBP: LPS-binding protein
LTA: lipoteichoic acid
PGN: peptidoglycans

Note: TREM-1 and the Mannose Receptor are not considered to be members of the Toll-Like Receptor family, but they do share homology in function with the Toll-Like Receptors.



Ekologický a evoluční kontext vrozené imunity



mutace 299

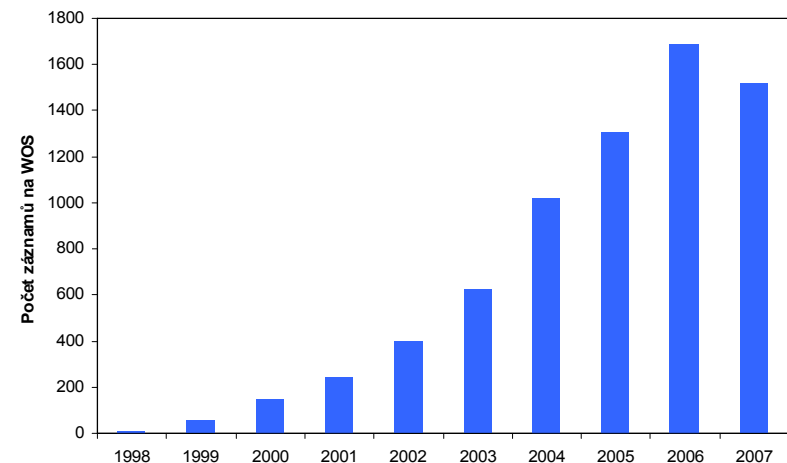
- snižuje intenzitu imunitní odpovědi při bakteriální infekci
- neutrální v heterozygotním stavu s **mutací 399**

- výhodná při onemocnění malárií

TLR 4 polymorfismus u člověka

Minimum údajů o TLRs a dalších součástech vrozené imunity u volně žijících živočichů !!!

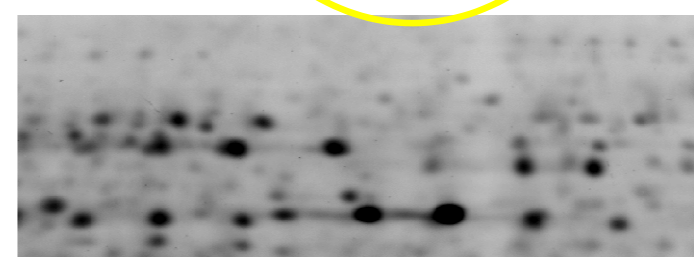
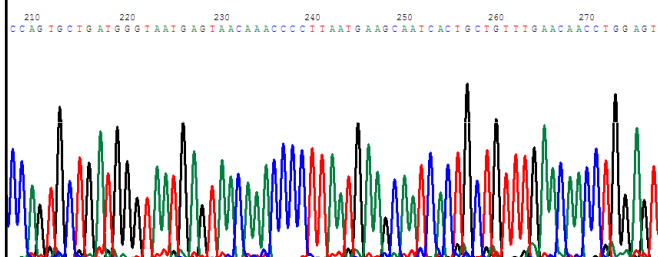
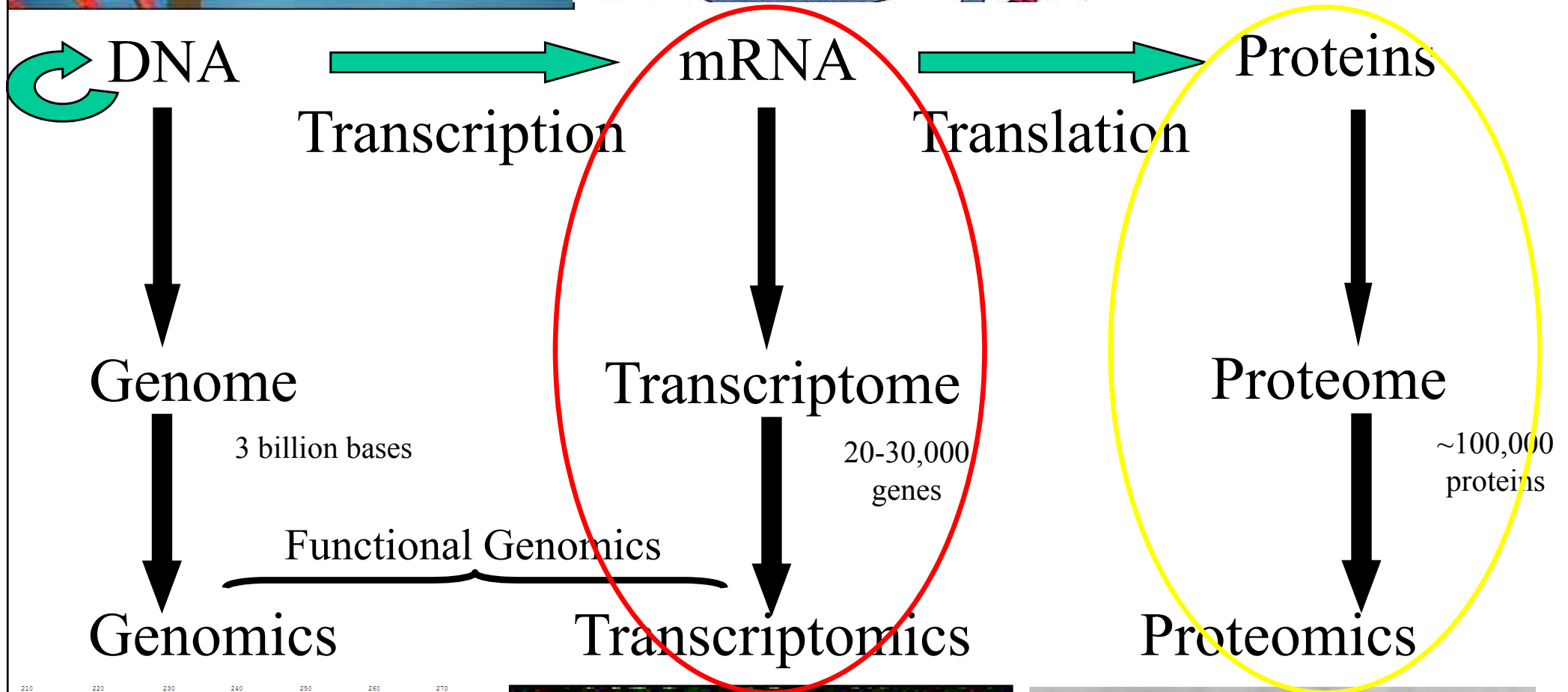
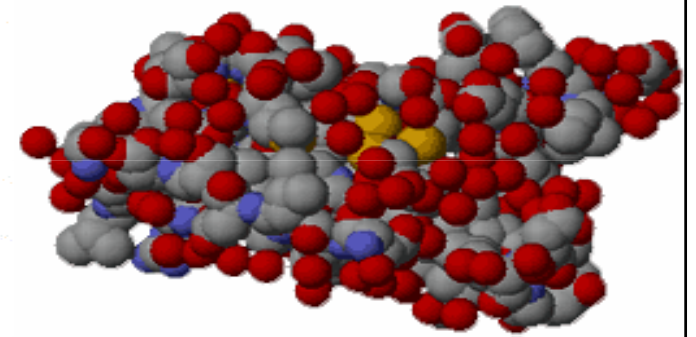
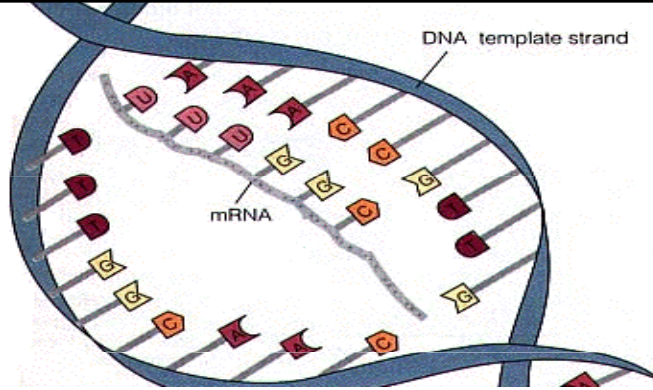
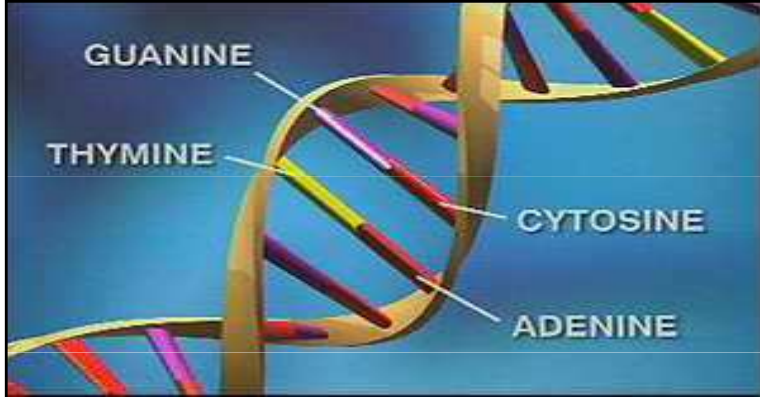
- velký rozvoj imunogenetického výzkumu volně žijících populací v současnosti
- komplexní studium genetické struktury a exprese nejrůznějších složek imunitního systému může významně přispět k pochopení evoluce a ekologie současných obratlovců

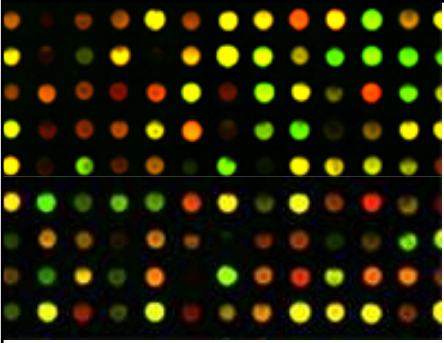


Databáze Web of Science
Heslo „TLR*“

... máme se na co těšit !!!

Sledování mnoha genů najednou

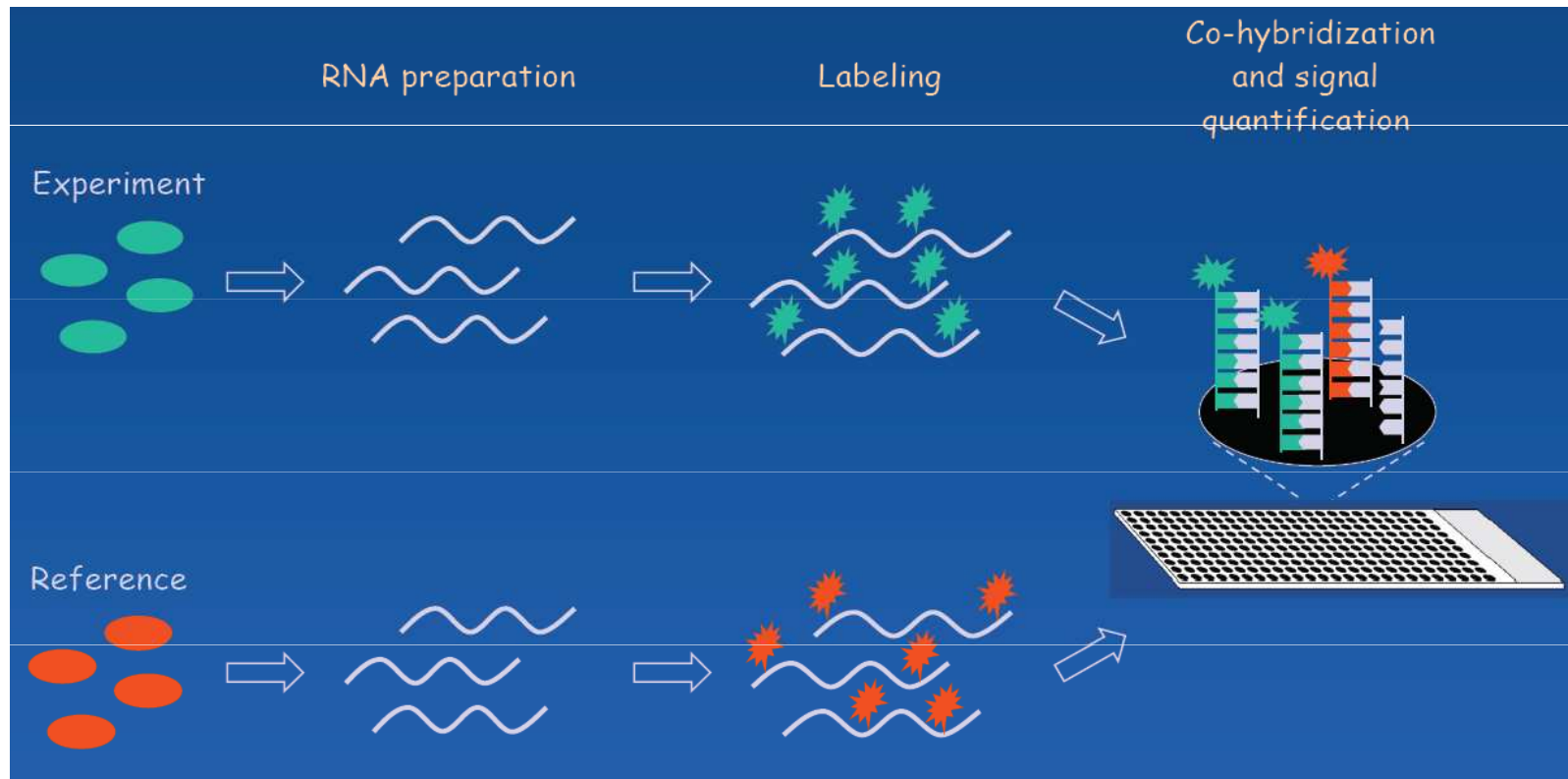




Sledování exprese genů microarrays



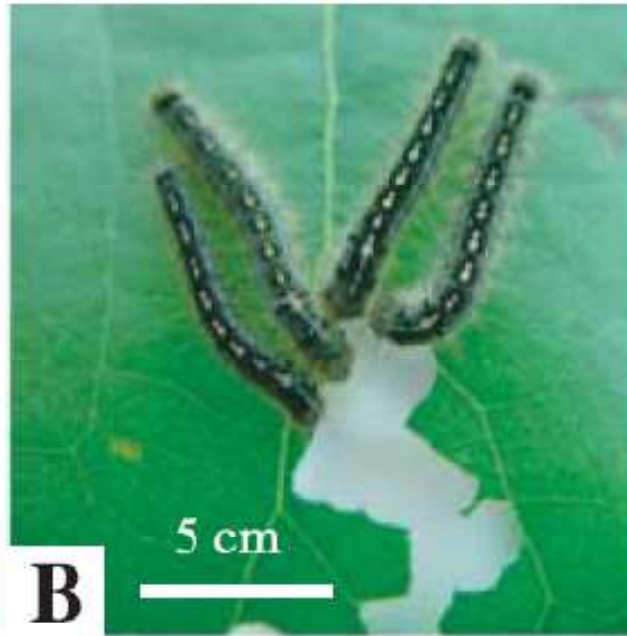
- Sledování exprese mnoha (tisíce) genů najednou
- Založeno na hybridizaci
- Sleduje se rozdíl vůči kontrole





Populus trichocarpa x *deltoides*
a *Malacosoma disstria* bourovec
Ralph et al. 2006

- cDNA microarray
- 15496 genů > 3/4 genomu
- Po 24 hodinách
1191 genů up-regulated
537 down-regulated
- Obrana: endochitinázy, inhibitory proteáz
- Signální funkce
- Transport, metabolismus, regulace transkripce



Závěr

- Molekulární ekologie se rychle vyvíjí
- Metody se zásadně vylepšují a mění
- Co platilo dnes, nemusí platit zítra
- Těšme se tedy na zítřek
- **A hlavně je třeba číst!**