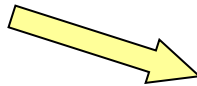
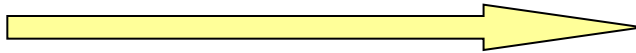
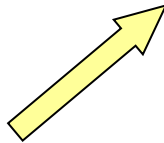


Exprimované geny a přírodní selekce

Produkty funkčních genů a
jejich význam v ekologických
studiích

Geny a adaptace

- studium selekčních tlaků daných prostředím a evoluční odpovědi na ně → vznik **adaptací**, tj. **geneticky podmíněné** přizpůsobení se prostředí
- např. interakce s abiotickým prostředím



Proč geny v molekulární ekologii?

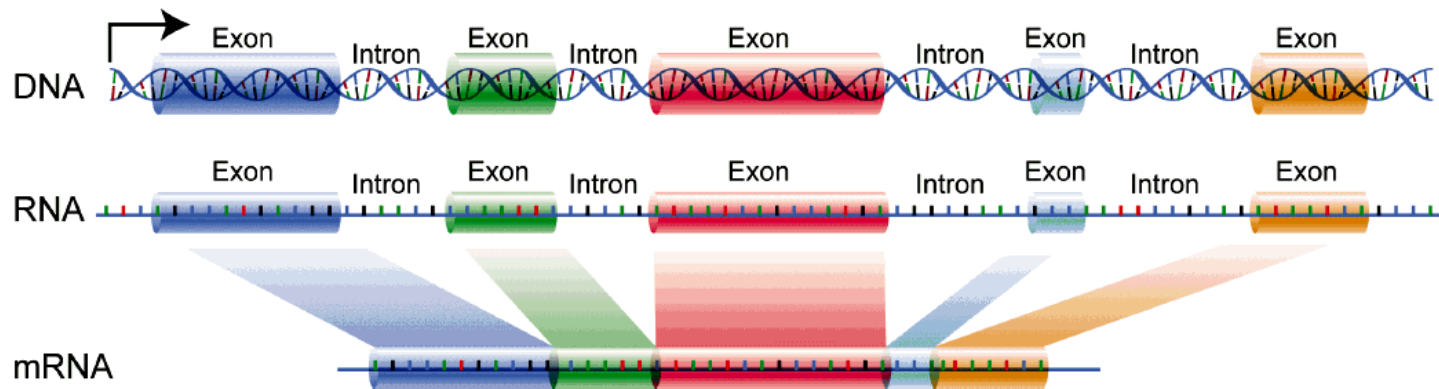
- Geny mají funkční význam - geneticky determinovaný polymorfismus
- -> studium **proximálních mechanismů**



- **Př.: Proč je samec hýla rudého červeně zbarven?**
- **ultimátní vysvětlení** - aby se líbil samicím a zplodil s nimi více potomků
- **proximátní vysvětlení** - protože karotenoidy získané z potravy ukládá více do peří a méně je používá v imunitní odpovědi (protože má dobré geny)

Struktura genů

- Exons → protein coding, under selection
- Introns → non-coding, neutral
- Intergenic regions → non-coding, neutral



Degenerovaný genetický kód

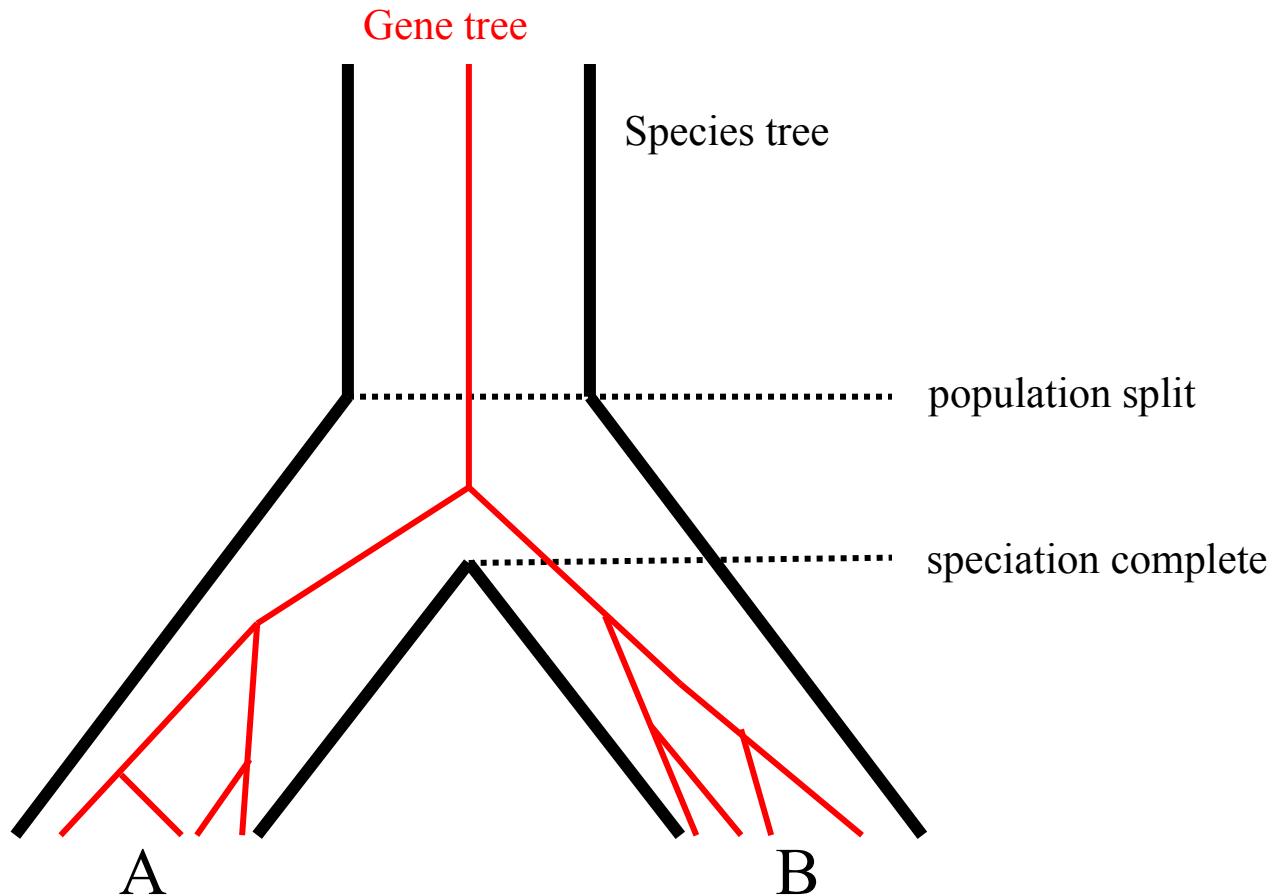
GCT	→	Alanine
GCA	→	Alanine
GCC	→	Alanine
GCG	→	Alanine
CCT	→	Proline
GGA	→	Glycine

→ 3rd position evolves neutrally

→ 1st and 2nd position under selection

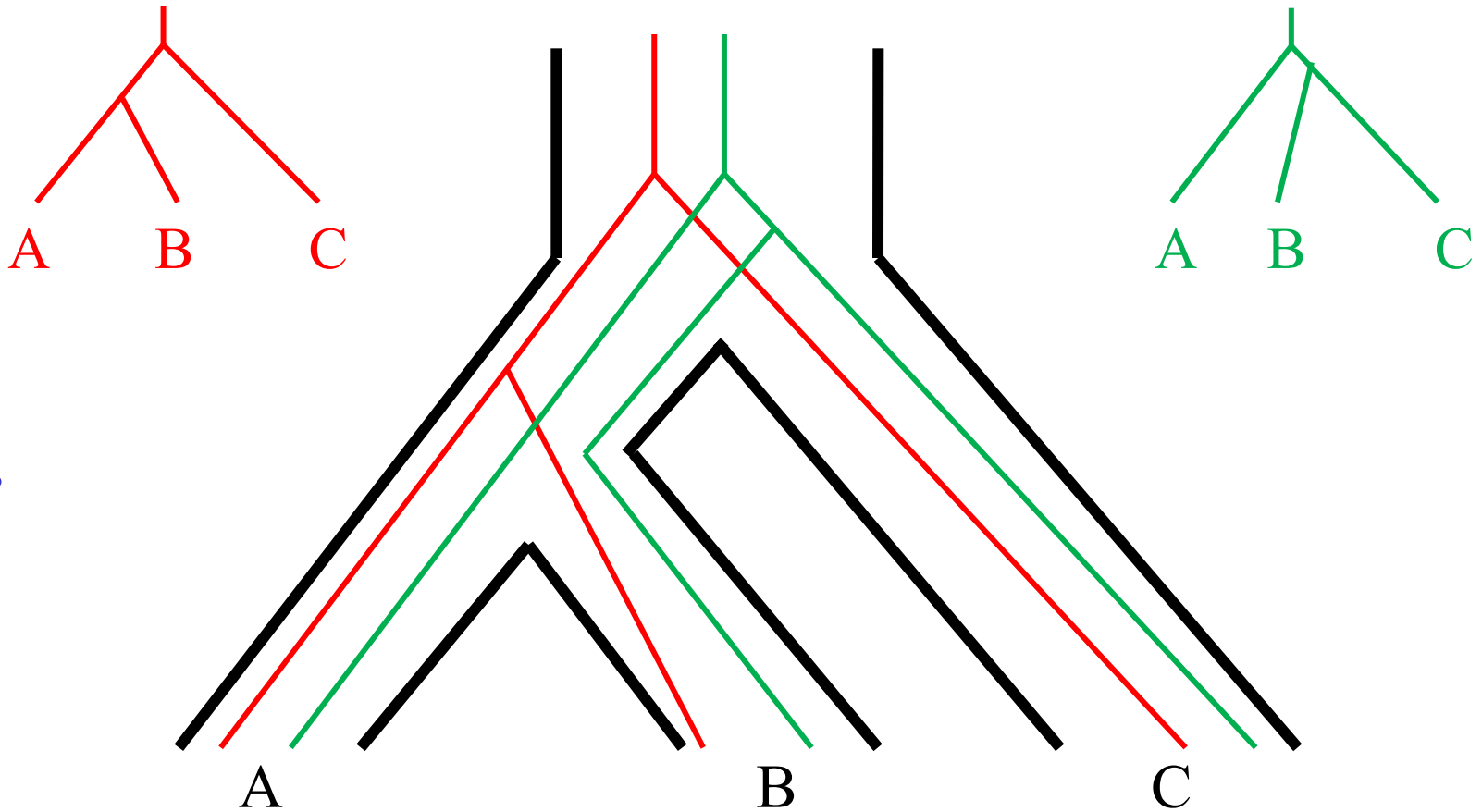
Studium selekce - fylogenetická analýza

- Gene-tree versus species tree



Species-trees

- Gene-tree versus species tree



Studium selekce - fylogenetická analýza

•Gene-trees & Selection: The case of C4 photosynthesis

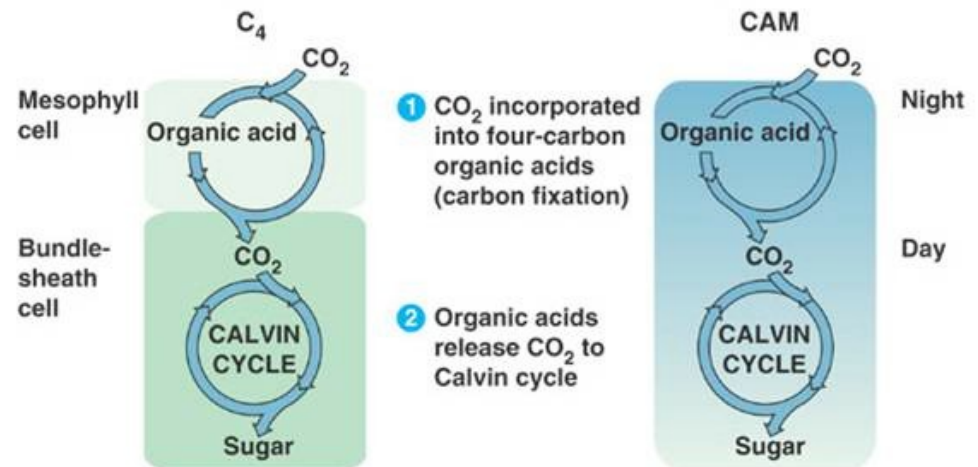
- Christin et al. 2007, Curr Biol
- PEPC* gene
- →C4 photosynthesis



Sugarcane



Pineapple

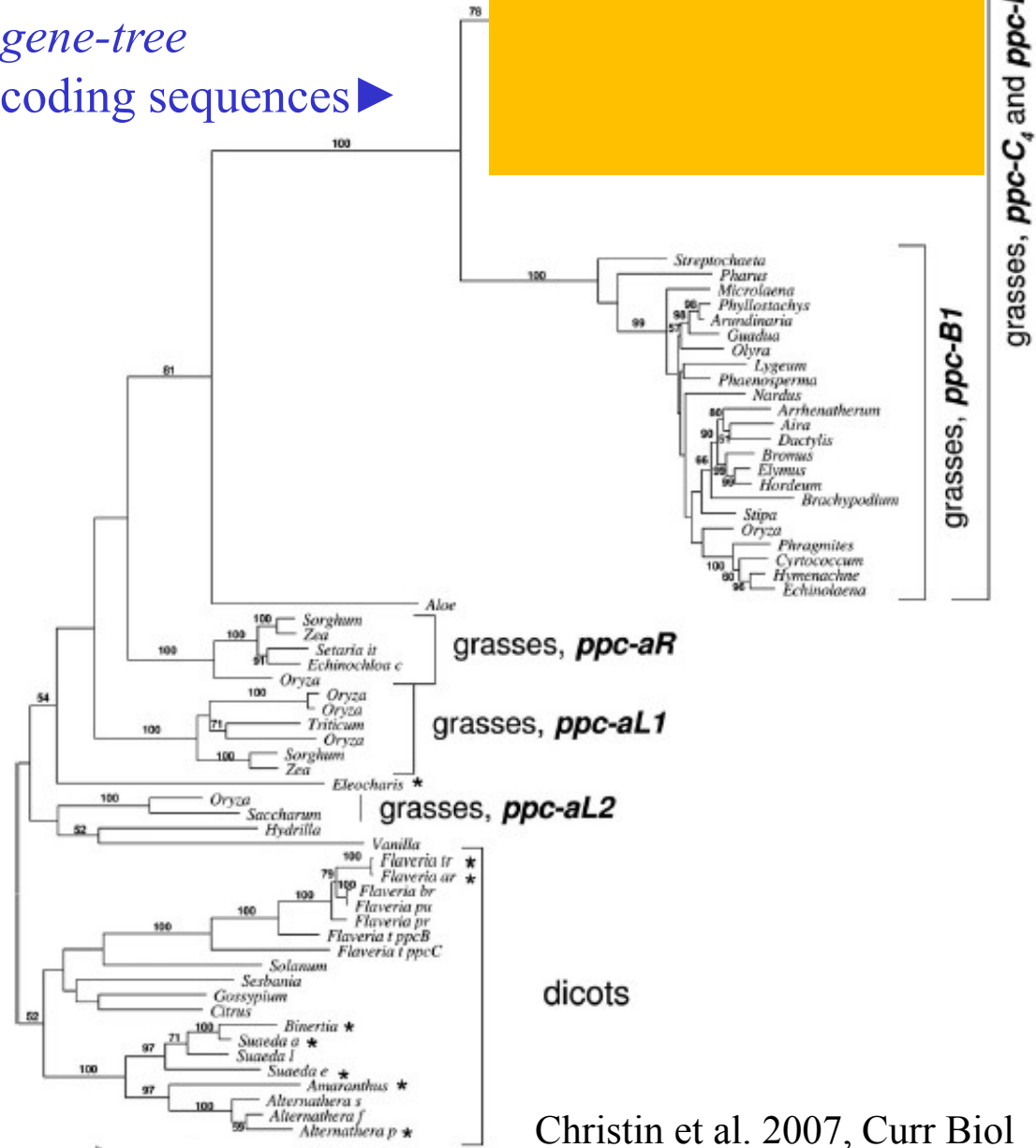


species-tree

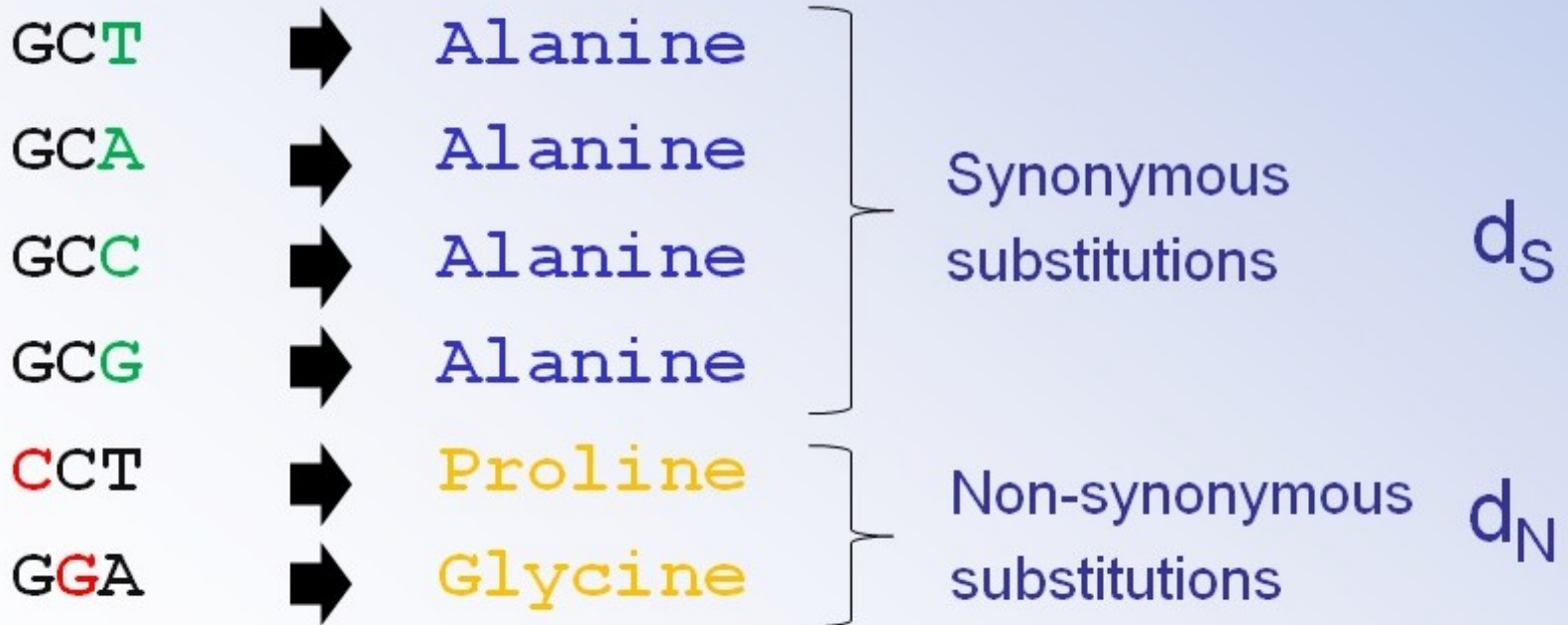
◀ intronic sequences

gene-tree

coding sequences ▶



Selekce na úrovni sekvencí



Selekcje na úrovni sekvencí

• Testing for selection: d_N/d_S

d_S Rate of synonymous substitutions, 'neutral' evolutionary rate

d_N Rate of non-synonymous substitutions

• $d_N/d_S = 1$ as many syn as non-syn substitutions \rightarrow neutral evolution

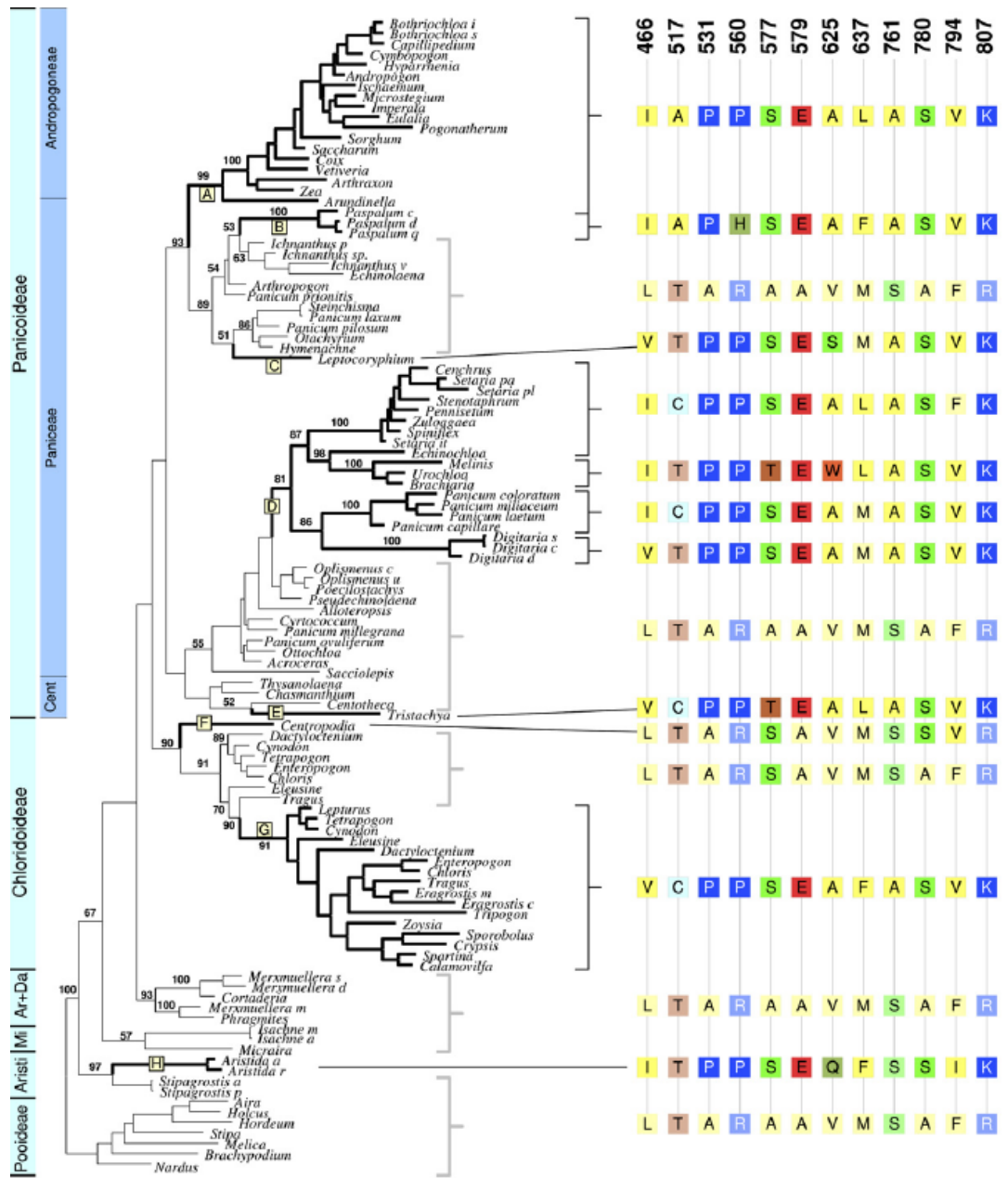
• $d_N/d_S < 1$ less non-syn than syn substitutions \rightarrow purifying selection

• $d_N/d_S > 1$ more non-syn than syn substitutions \rightarrow positive selection

◀ intronic sequences

coding sequences ▶
without positively
selected sites





PEPC gene

12 codons with $d_N/d_S > 1$

Sequences of unrelated but ecologically similar species more similar at these positions than they are in related species.

→ convergent evolution!

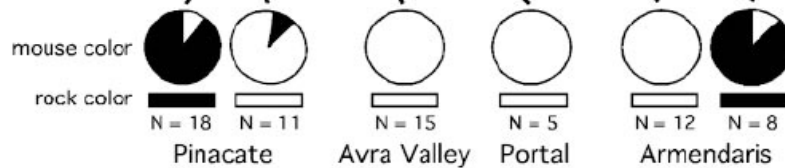
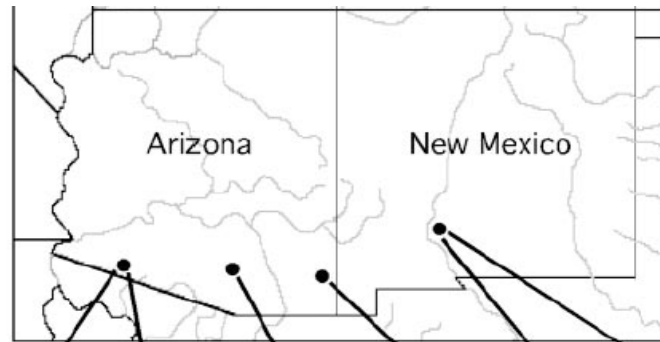
Metody studia funkční variability

1. Sledování kandidátních genů
2. Genomické přístupy (mnoho genů najednou)

pytlouš

Chaetodipus intermedius

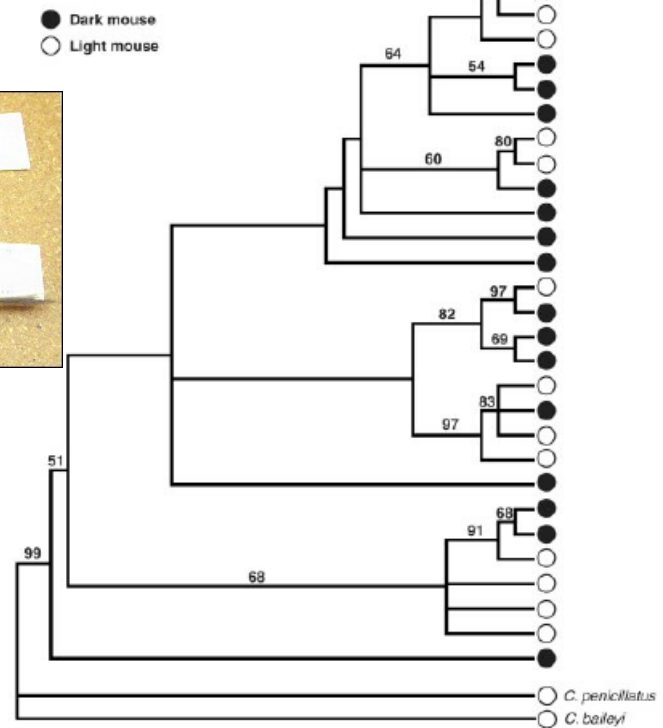
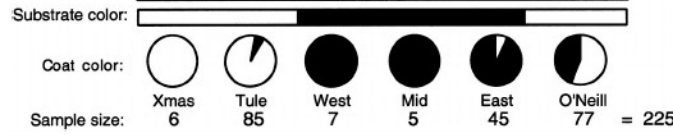
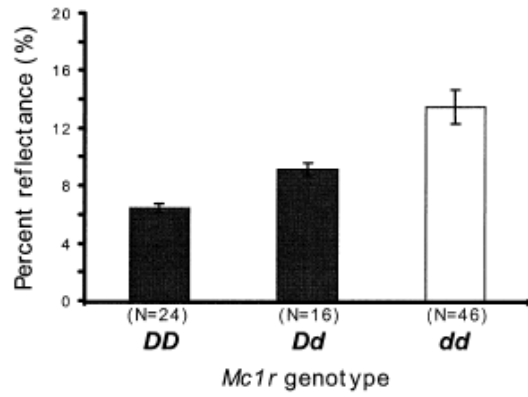
Hoekstra, Nachman et al.



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

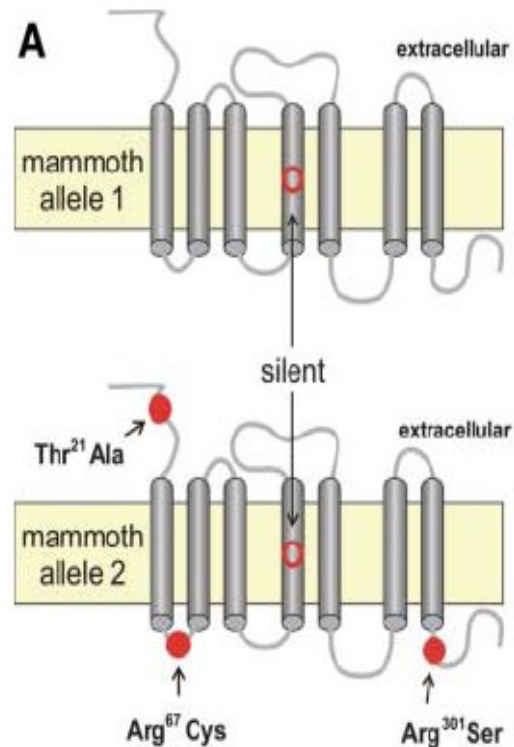
Arizona

- 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

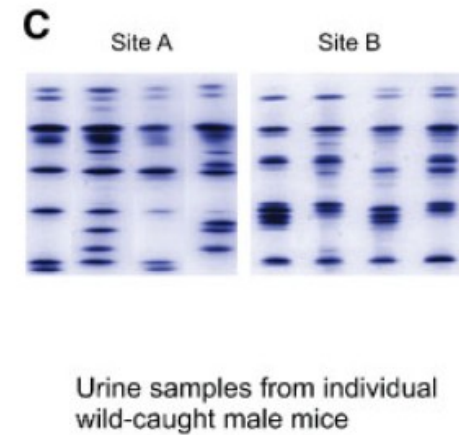
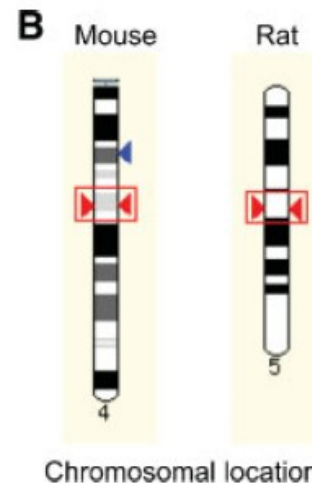


MC1R u člověka, mamuta a dalších

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

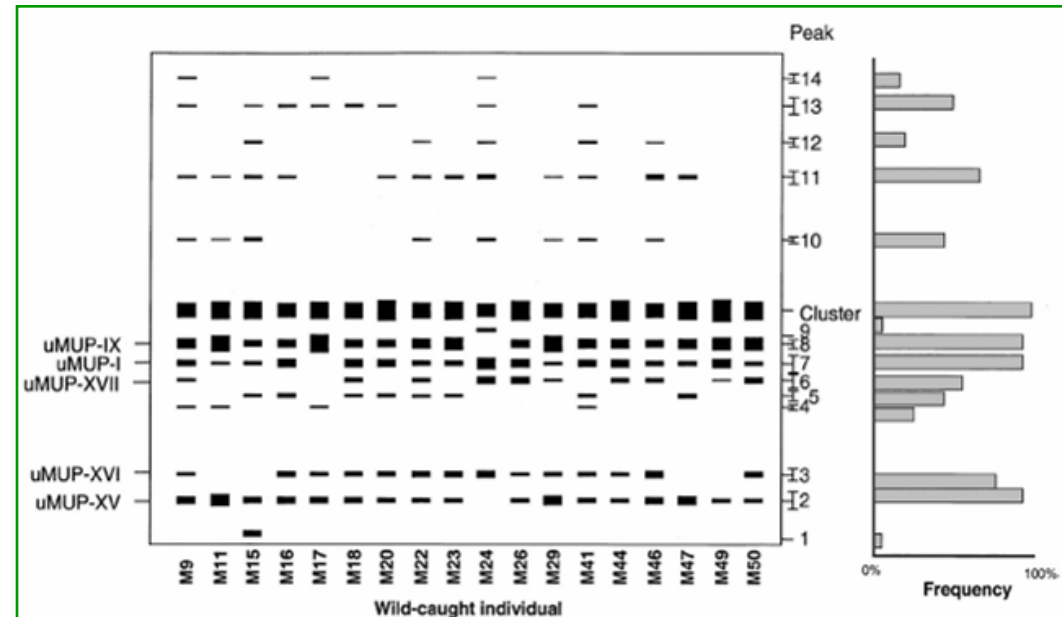


MUPs



Major Urinary Proteins - komplex velmi podobných genů

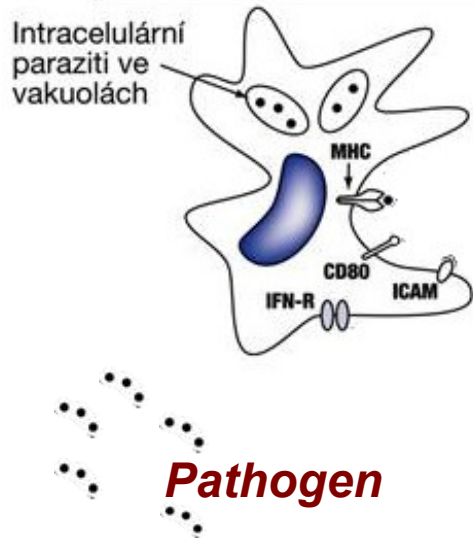
- Obtížně se studují (isoelektrická fokusace)
- Různé alely
- Navíc různá míra exprese
- → individuální profil
- Čárový kód jedince



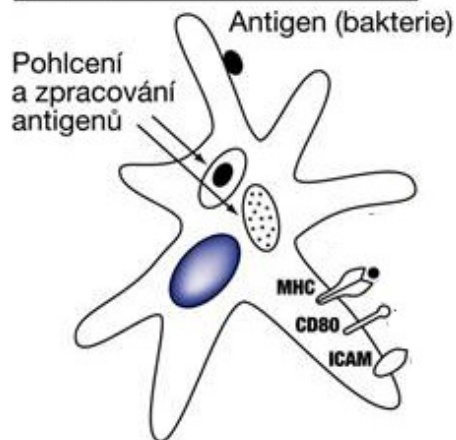
Major histocompatibility complex (MHC)

Antigen-specifická imunitní odpověď

INFIKOVANÝ MAKROFÁG

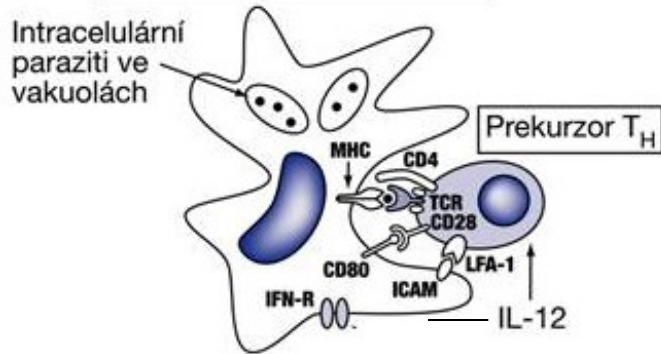


APC (DENDRITICKÁ BUŇKA)

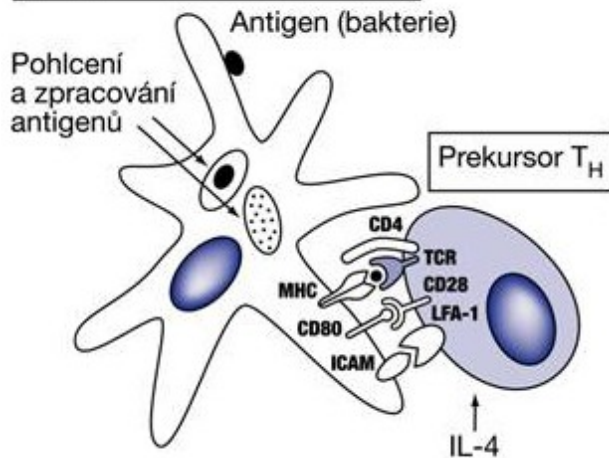


Antigen-specifická imunitní odpověď

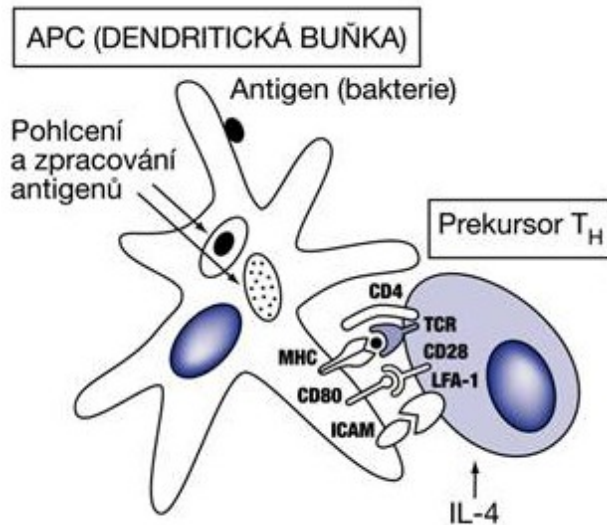
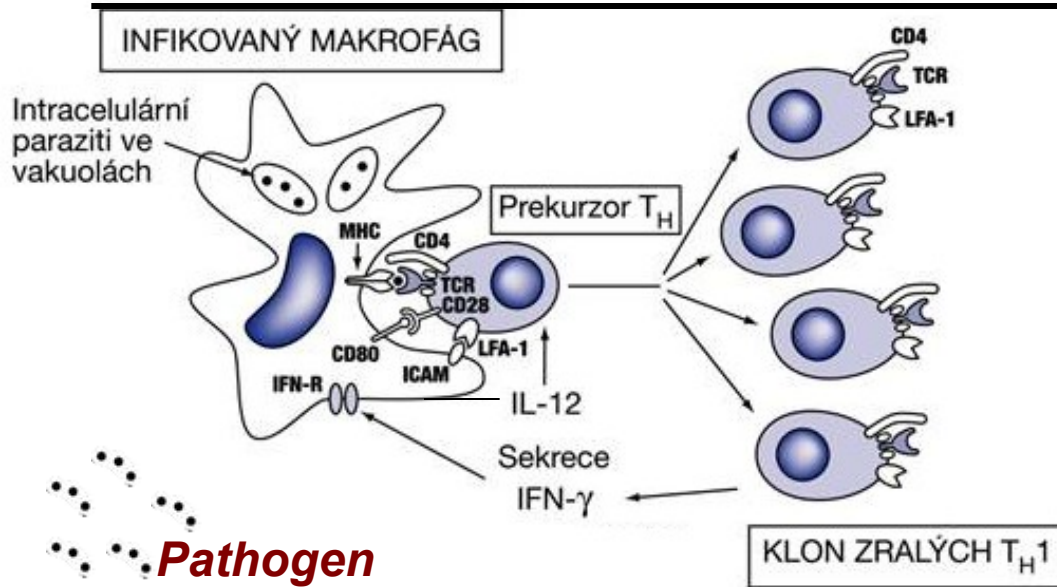
INFIKOVANÝ MAKROFÁG



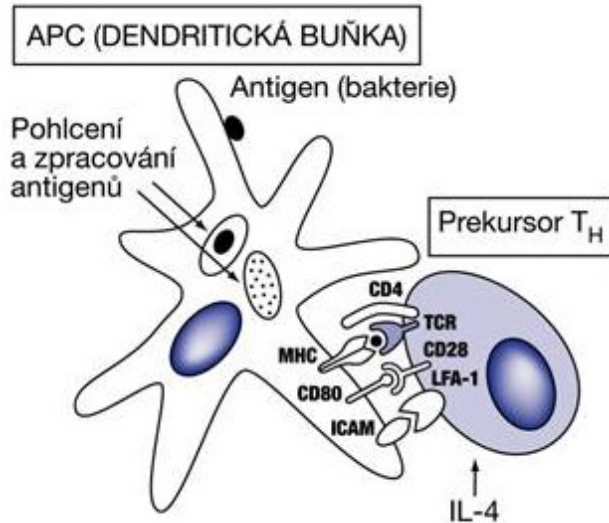
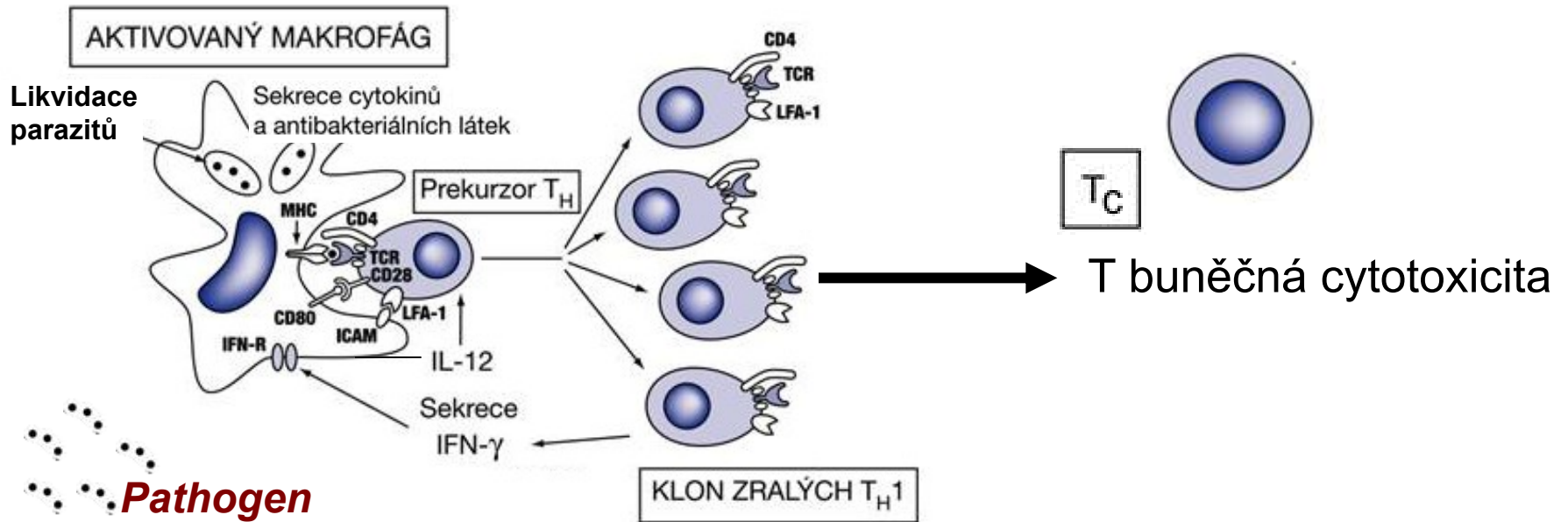
APC (DENDRITICKÁ BUŇKA)



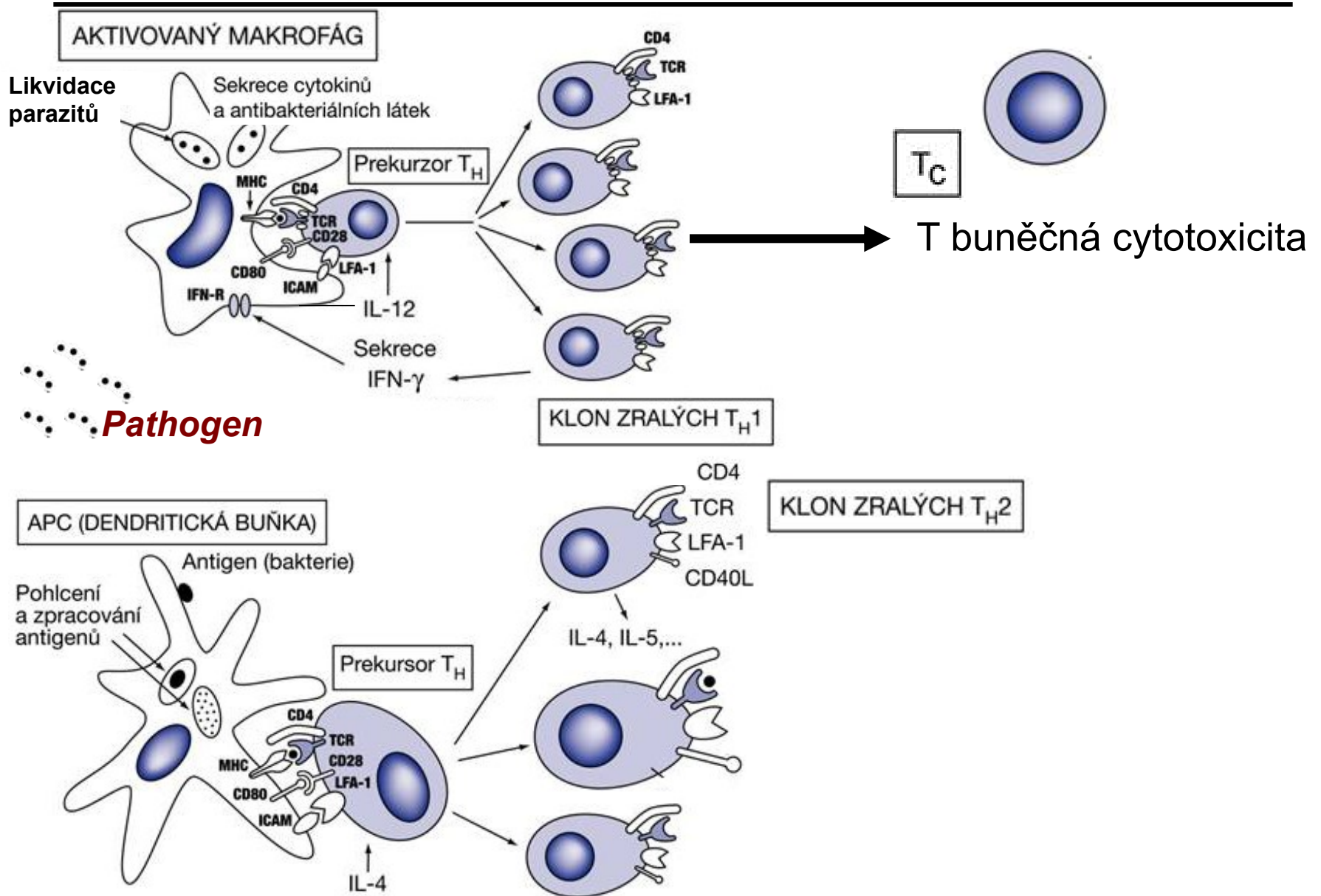
Antigen-specifická imunitní odpověď



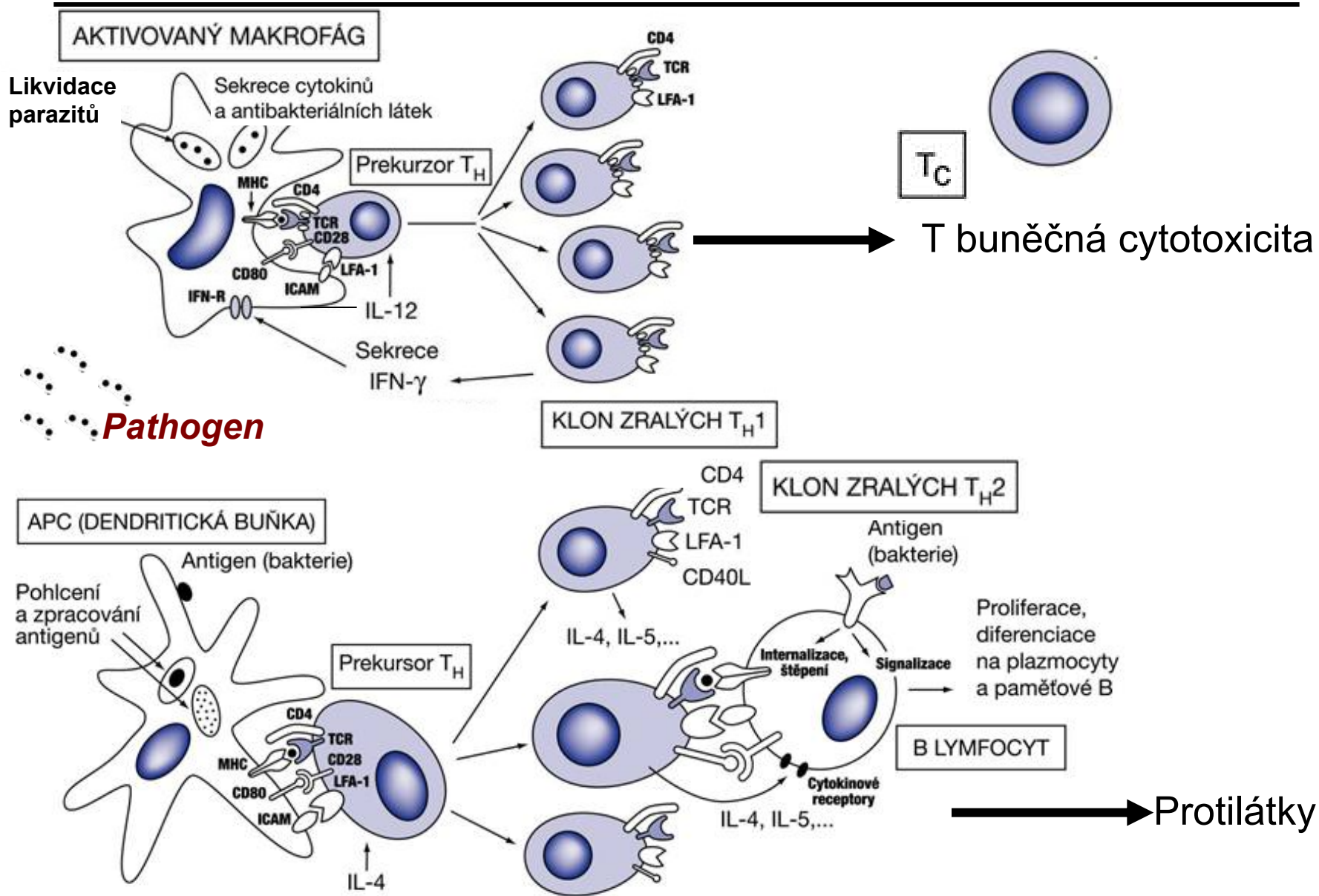
Antigen-specifická imunitní odpověď



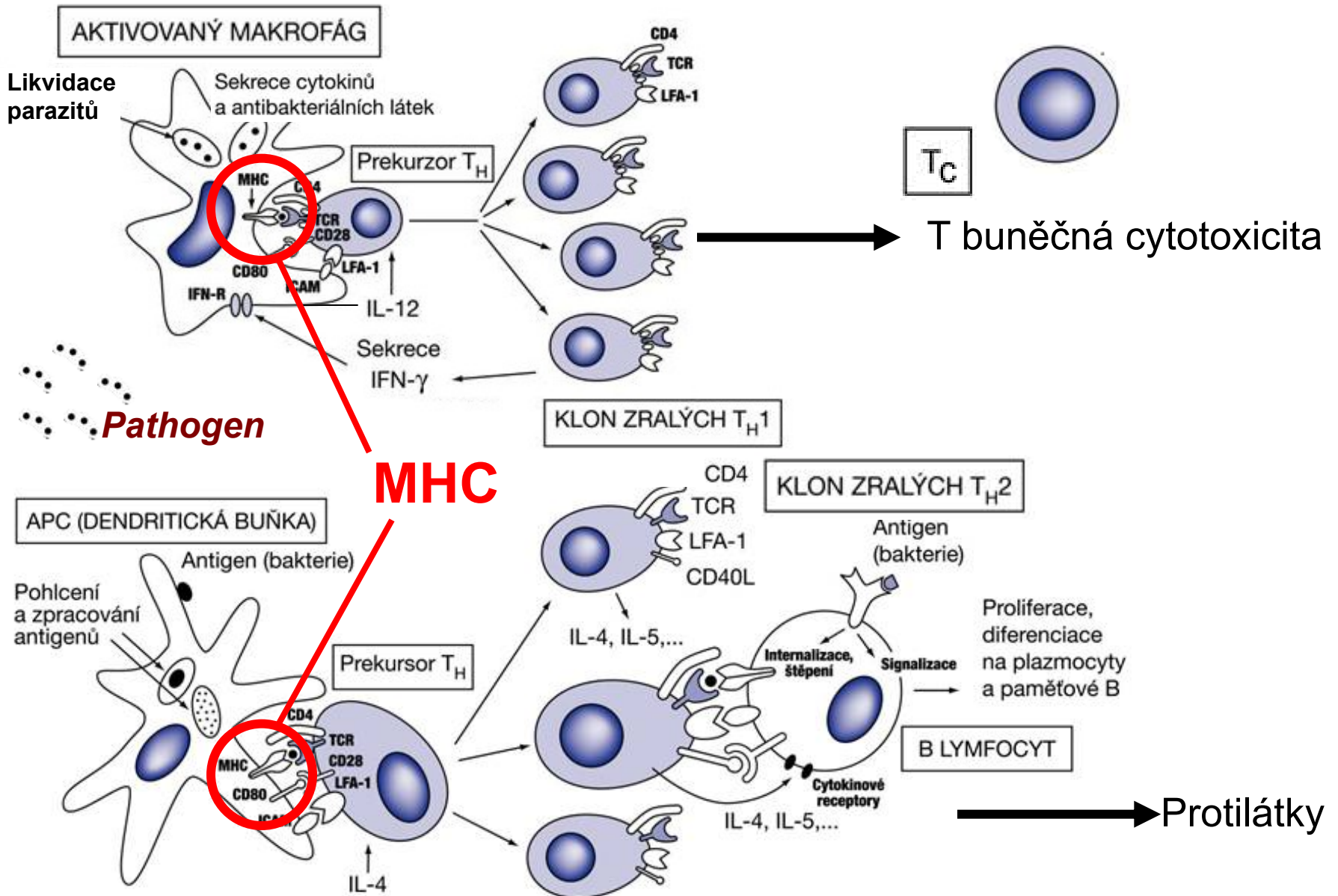
Antigen-specifická imunitní odpověď



Antigen-specifická imunitní odpověď

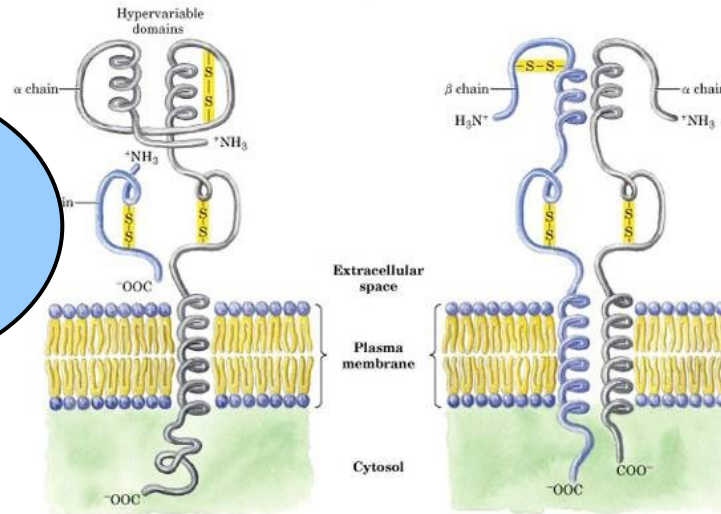


Evoluční ekologie: Kdo a jak rozpozná parazita ?



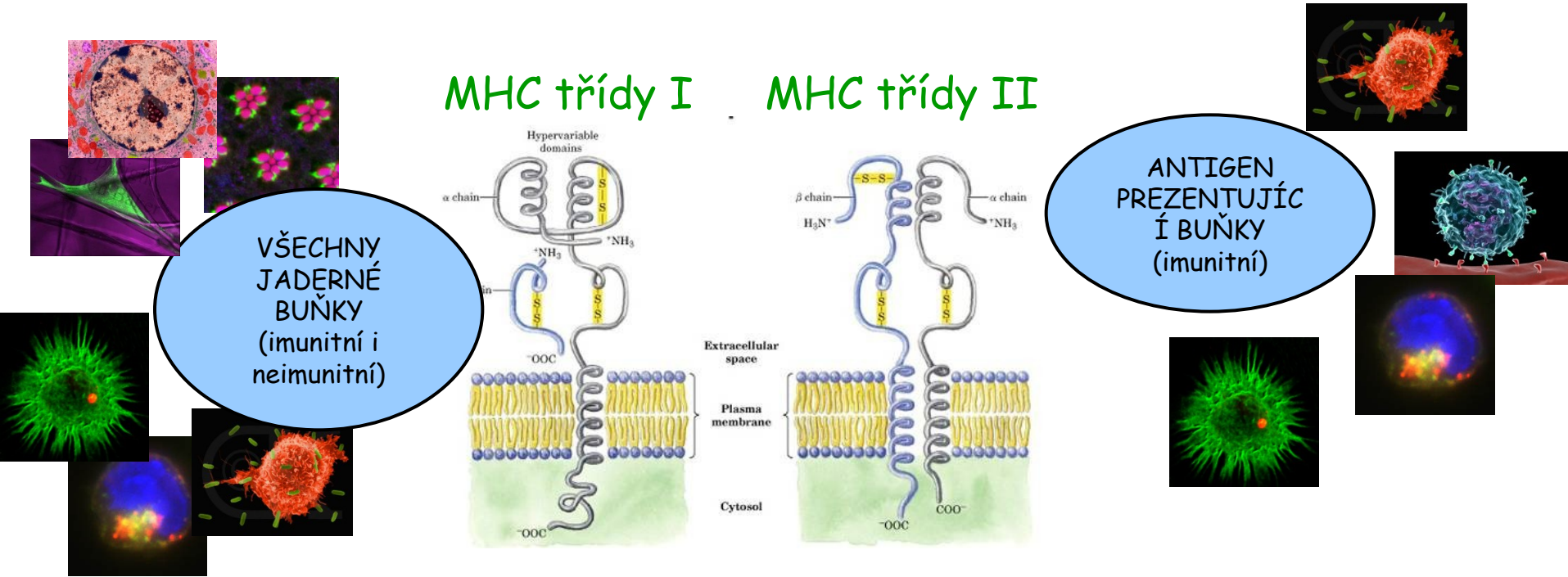
Major histocompatibility complex (MHC)

MHC třídy I MHC třídy II

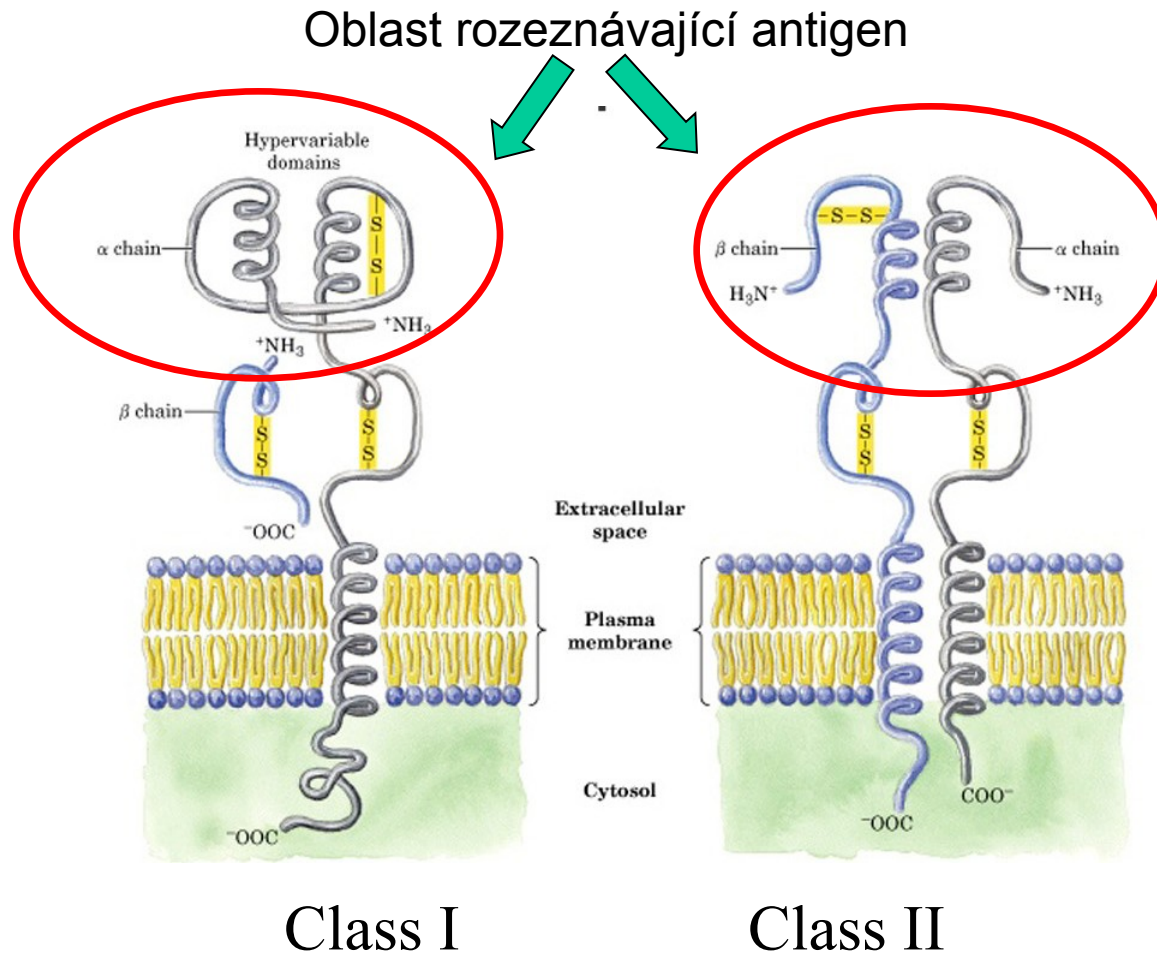


VŠECHNY
JADERNÉ
BUŇKY
(imunitní i
neimunitní)

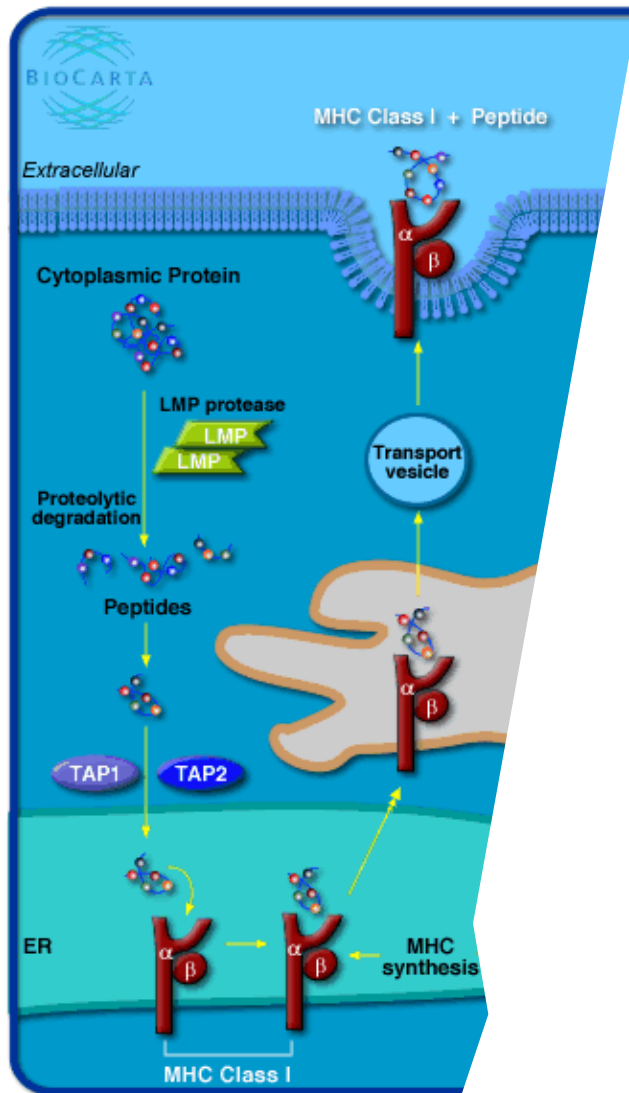
ANTIGEN
PREZENTUJÍCÍ
BUŇKY
(imunitní)



Major histocompatibility complex (MHC)



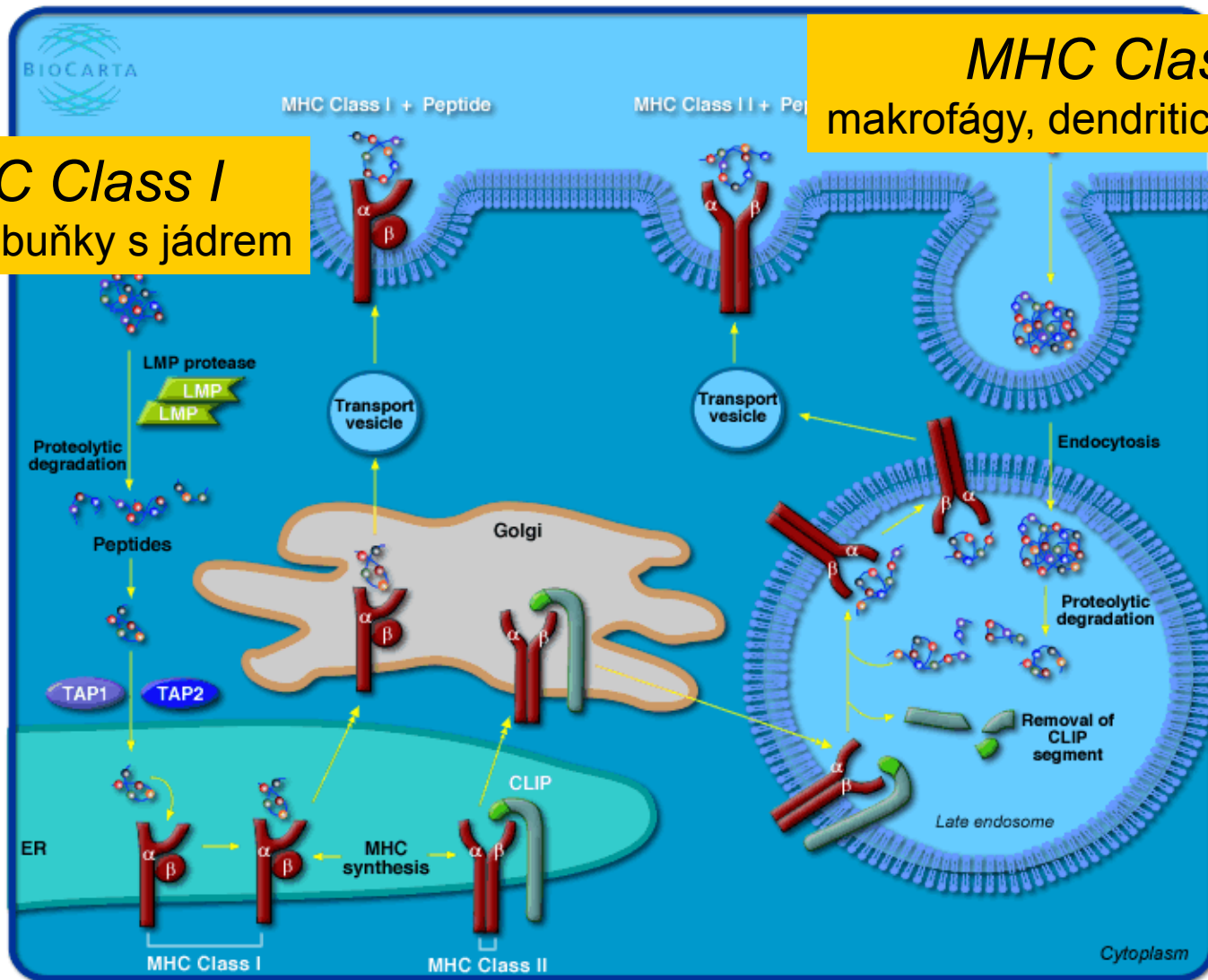
Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu



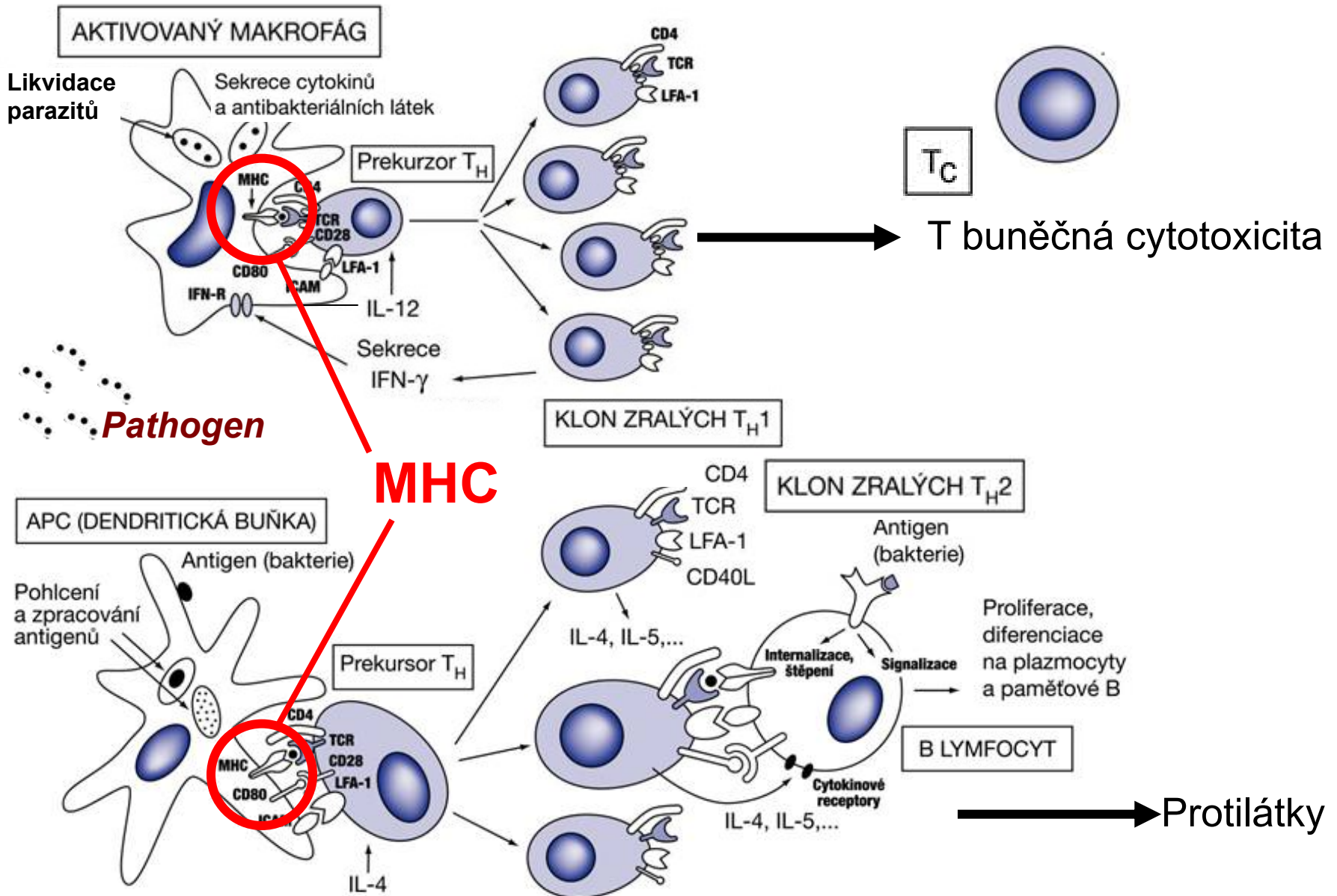
Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu

MHC Class I
všechny buňky s jádrem

MHC Class II
makrofágy, dendritické buňky aj.



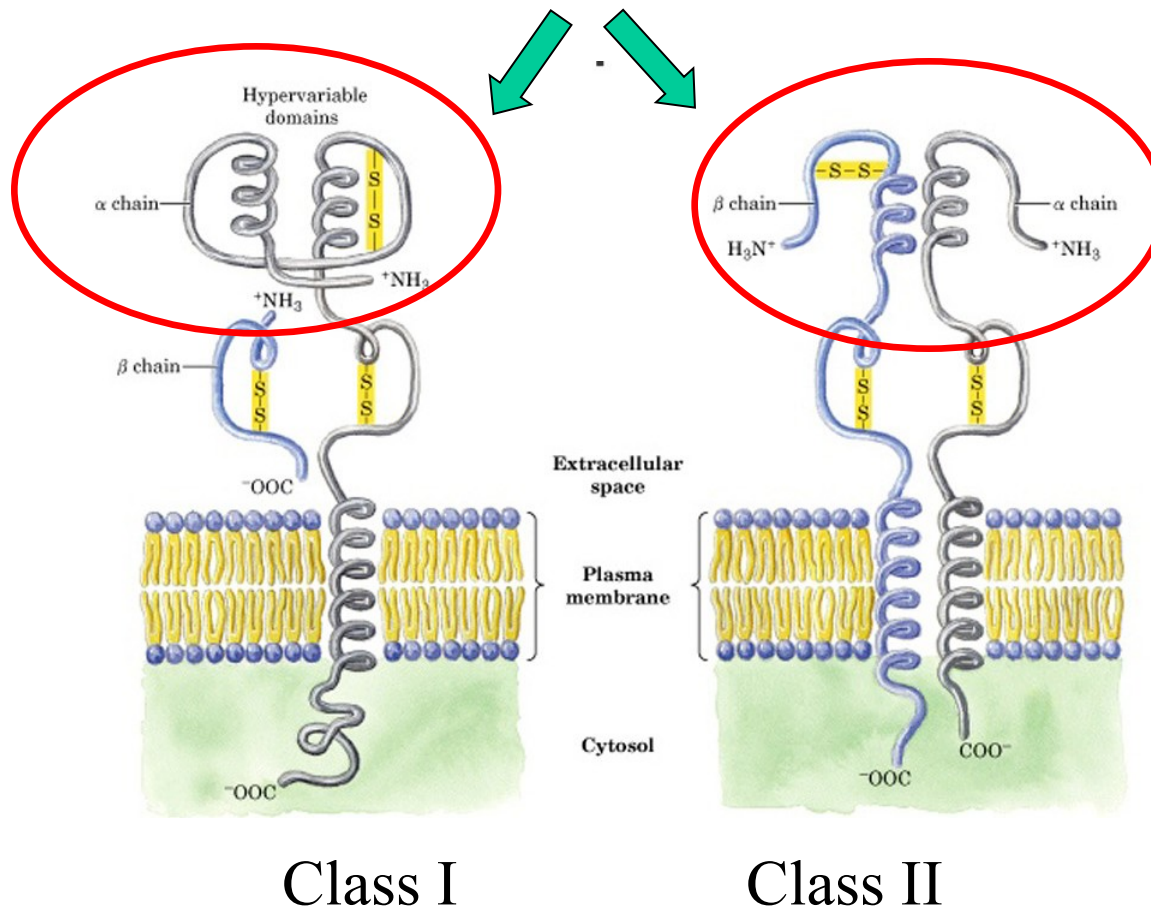
Buňka nabízející antigen spustí imunitní odpověď



Jak zjistit, že je MHC pod selekcí?

Major histocompatibility complex (MHC)

Oblast rozeznávající antigen (antigen-binding sites)



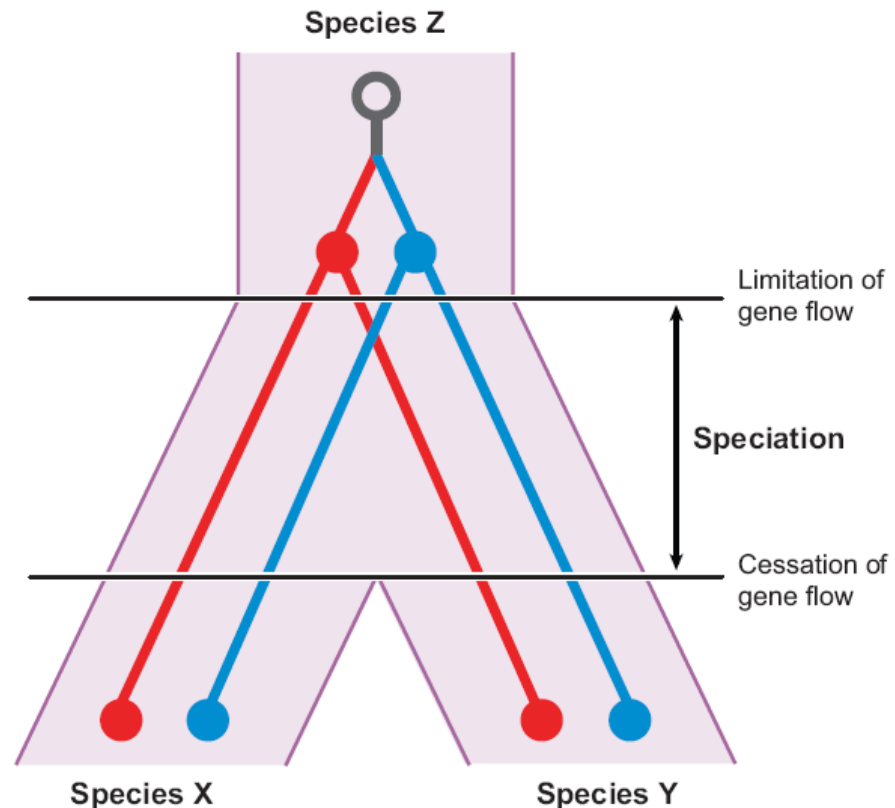
Je variabilita MHC důsledkem přírodního výběru?

Pozitivní selekce - vytvoření a udržení velkého množství funkčních variant

Trans-species polymorfismus

- výhodné alelické linie
přetrvávají i po oddělení druhů

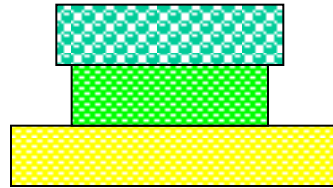
- „gene tree” vs. „species tree”



Fylogenetická analýza MHC sekvencí



MHC Class II, DQA gene, Exon 2
(Neighbour Joining Method)



Mus

Rattus



© - Libomir Hlasčák
www.hlascak.com
Clethrionomys glareolus 4162

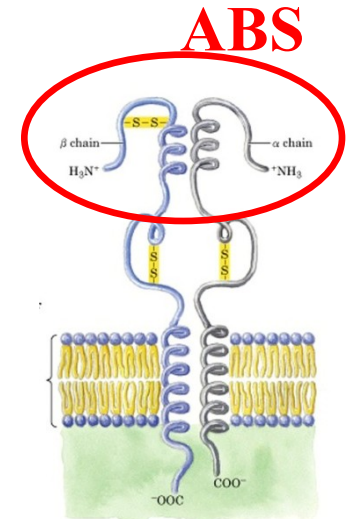
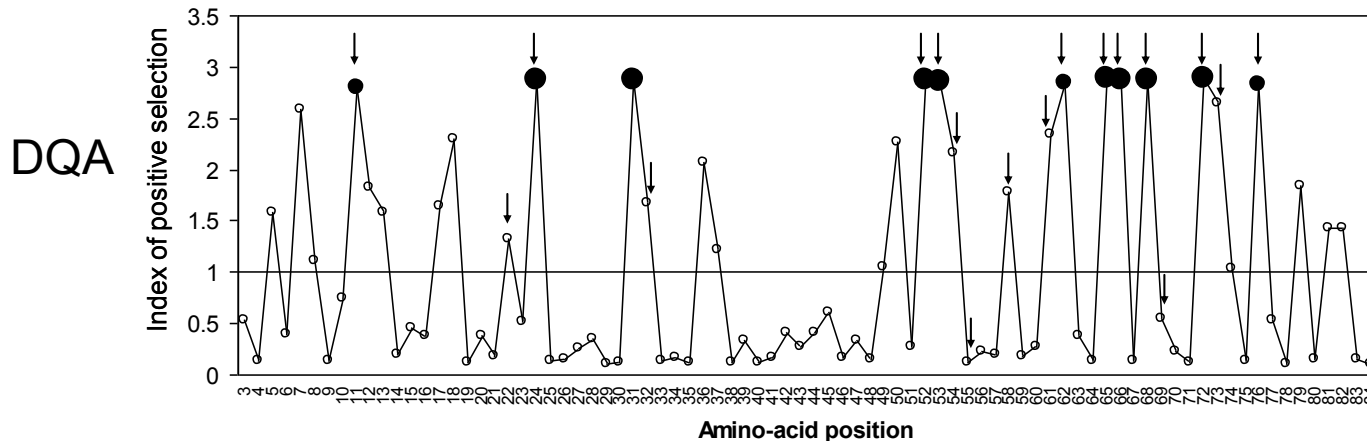
Pozitivní historická selekce na MHC Class II

- 1) Poměr nesynonymních a synonymních mutací (dN/dS) na různých pozicích MHC molekuly



dN/dS	antigen-binding sites	
	ABS	Non ABS
DRB	5.25	3.00
DQA	3.16	0.33

- 2) Detekce aminokyselin pod pozitivní selekcí - Bayesian modelling (CodeML)



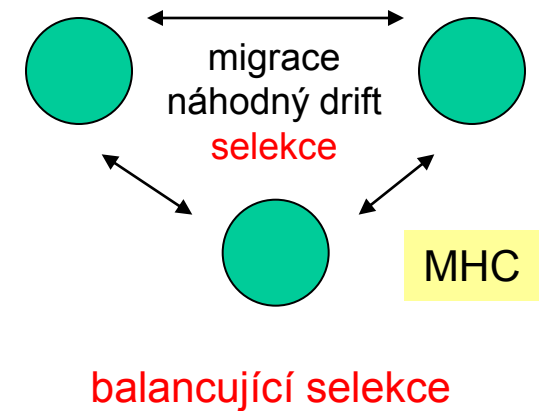
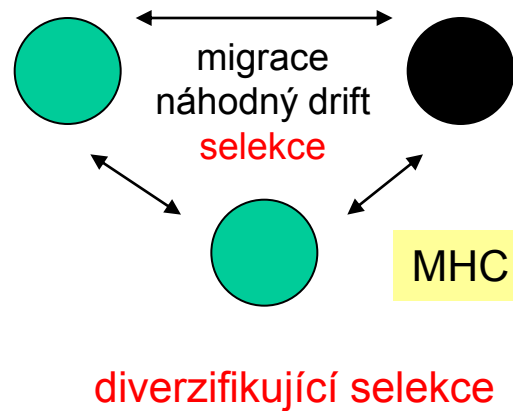
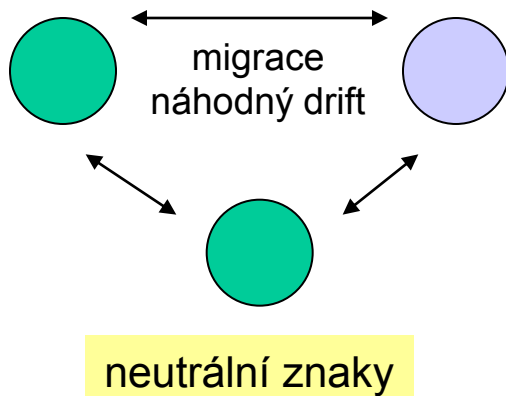
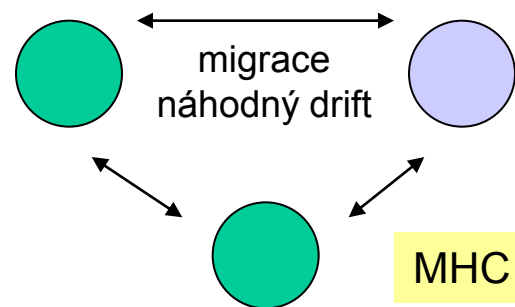
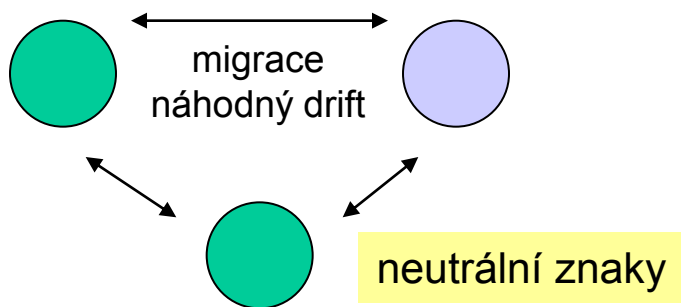
Šipky ukazují ABS místa identifikovaná na základě krystalografického modelu DQA proteinu u myši

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)

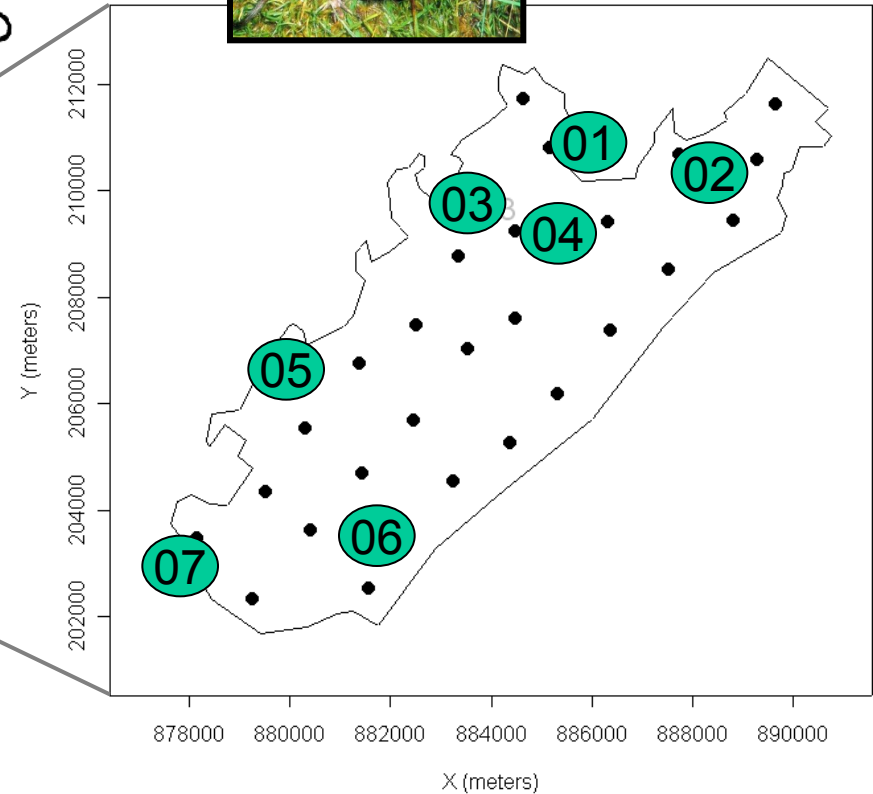
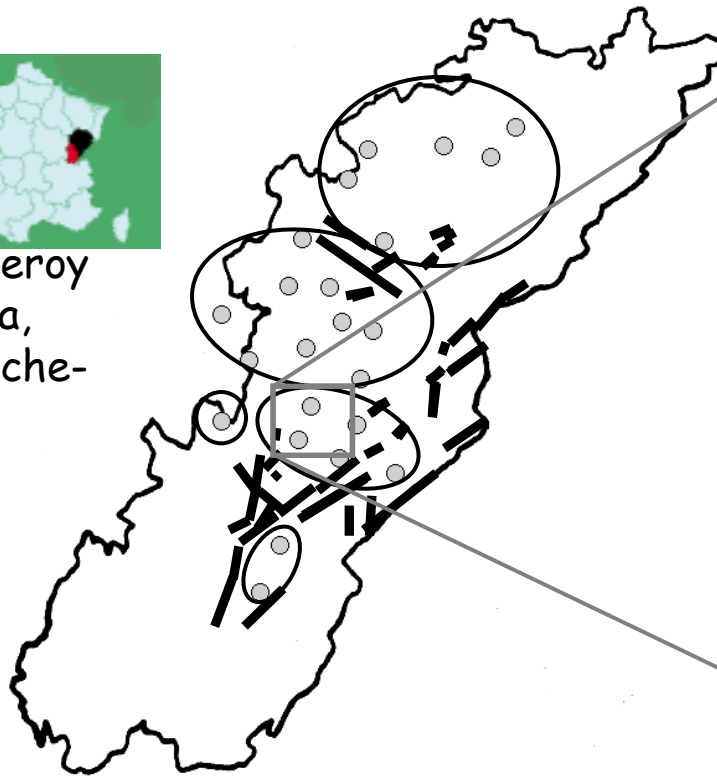


Důkaz přírodního výběru v současnosti: analýza populačně-genetické struktury

- Srovnání neutrálních znaků a MHC

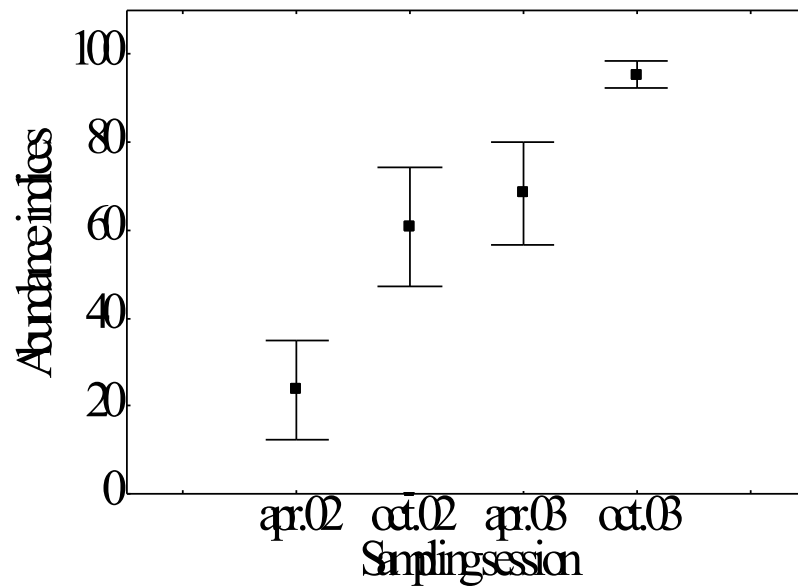
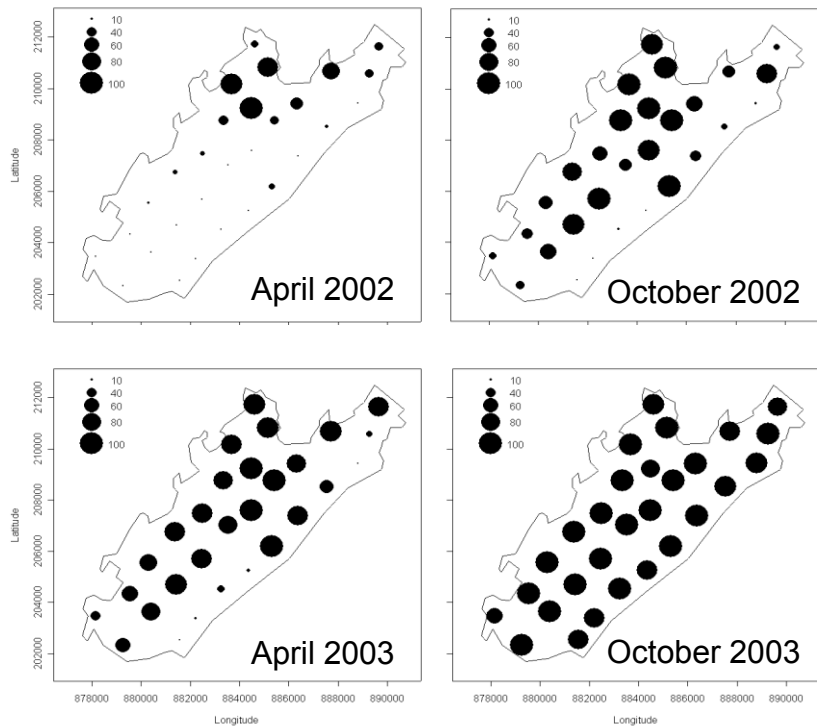


Canton Nozeroy
(pohoří Jura,
région Franche-
Comté)

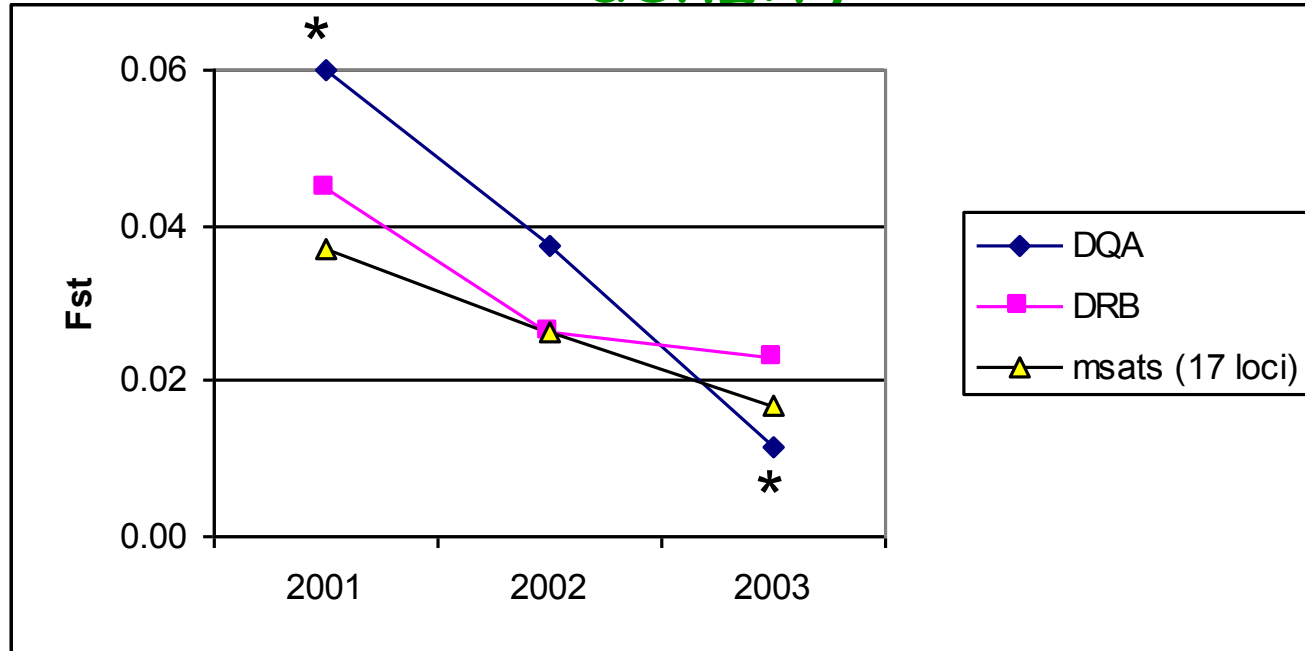


Studované lokality - 7 populací ve
stejně fázi populačního cyklu

→ 2001-2003: fáze růstu populační hustoty



Diferenciace populací v průběhu růstu denzity

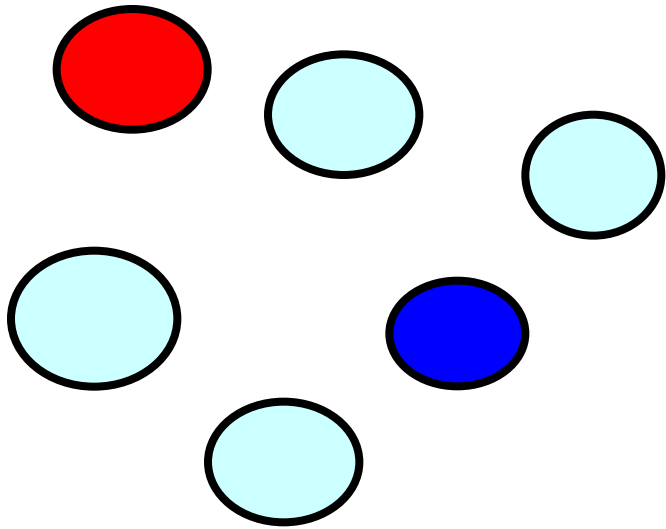


* Signifikantní rozdíl DQA1 vs. mikrosatelity

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

MHC (zejména DQA1) - signifikantně odlišné od mikrosatelitů

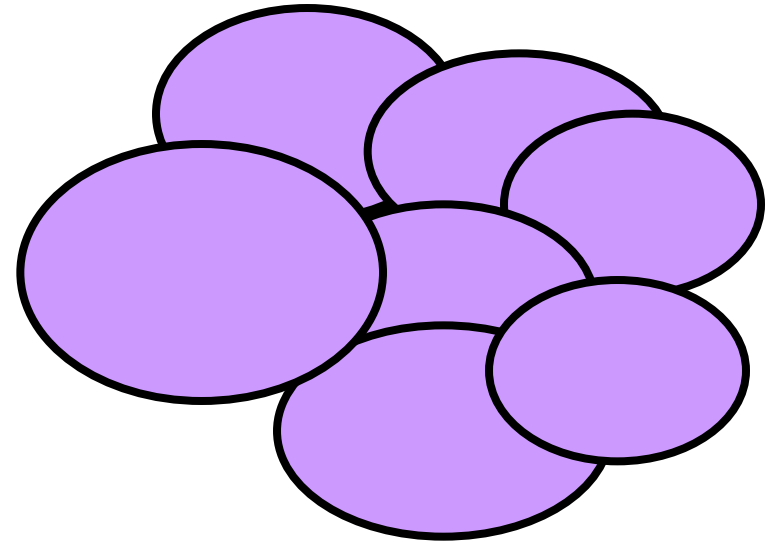
Závěr: Typ selekce na MHC závisí na početnosti populace



Nízká denzita

Lokální rozdíly ve
společenstvech patogenů

**Lokální diverzifikující
selekce**



Vysoká denzita

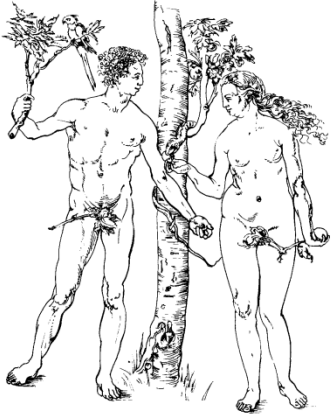
Nárůst diverzity
parazitů v důsledku
disperze

Balancující selekce

Jaké jsou mechanismy přírodního výběru pro udržení vysoké variability MHC?

- Hypotéza výhody heterozygotů (= „overdominance hypothesis“)
- Výhoda vzácné alely (= selekce negativně závislá na frekvenci)

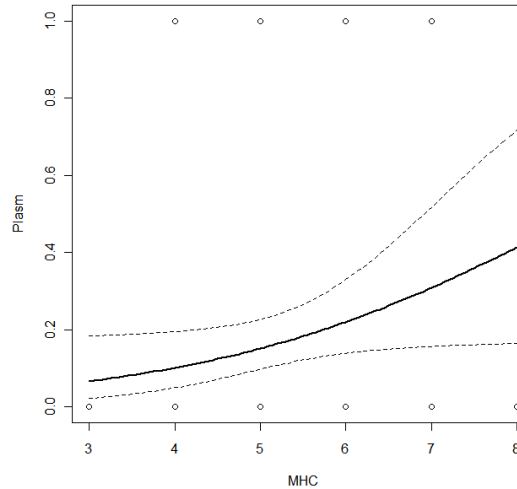
Výhoda heterozygotů - mají 2x více alel než homozygoti, tj. mohou rozeznávat 2x více patogenů



- Člověk - rychlost vývoje onemocnění HIV nebo hepatitidy B je asociována s MHC heterozygotností
- Dva druhy ryb - heterozygoti mají vyšší přežívání při umělém vystavení virům a helmintům



Pravděpodobnost výskytu ptačí malárie roste s počtem MHC alel - vysoká variabilita = vysoká pravděpodobnost přežití akutní fáze



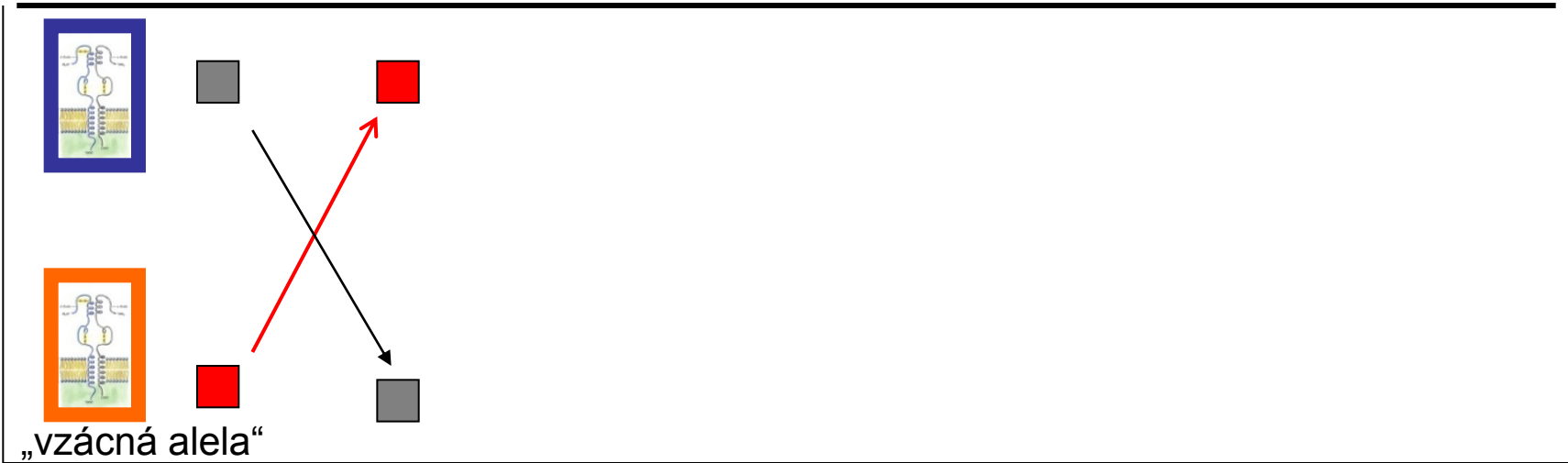
- Nejednoznačné výsledky v mnoha dalších příkladech
- Teoretické modely tuto hypotézu nepodporují ...

Výhoda vzácné (výhodné) alely

- Dynamická koevoluce mezi hostitelem a parazitem (= hypotéza „červené královny“) = **selekce negativně závislá na frekvenci**

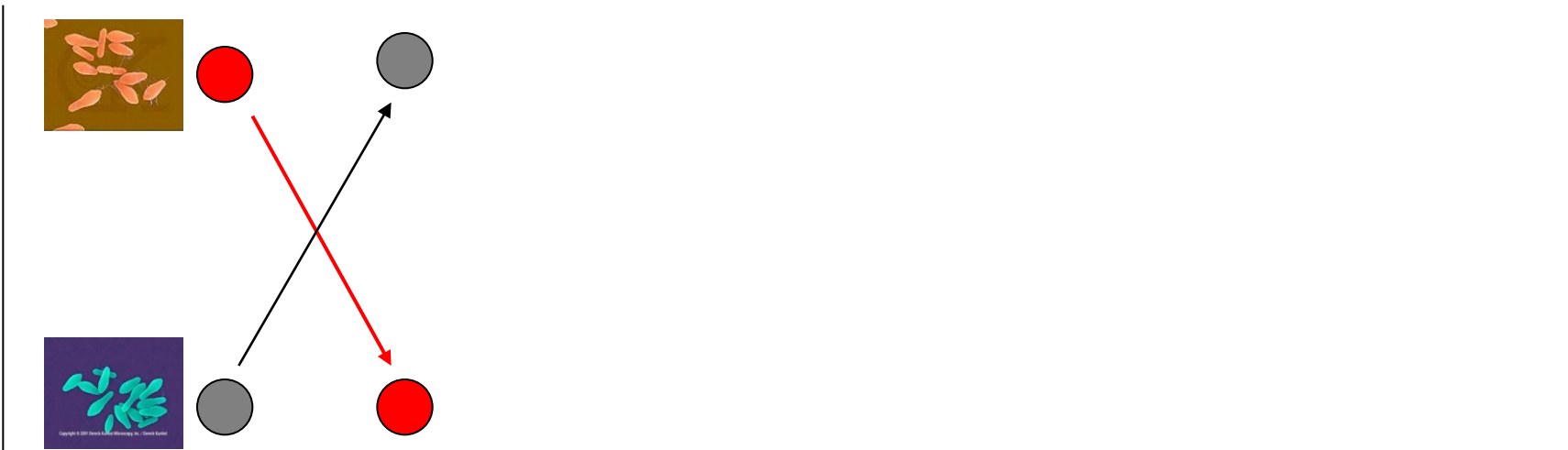
Výhoda vzácné (výhodné) alely

Frekvence alely



Čas

Frekvence parazita



Čas

Výhoda vzácné (výhodné) alely

Frekvence alely

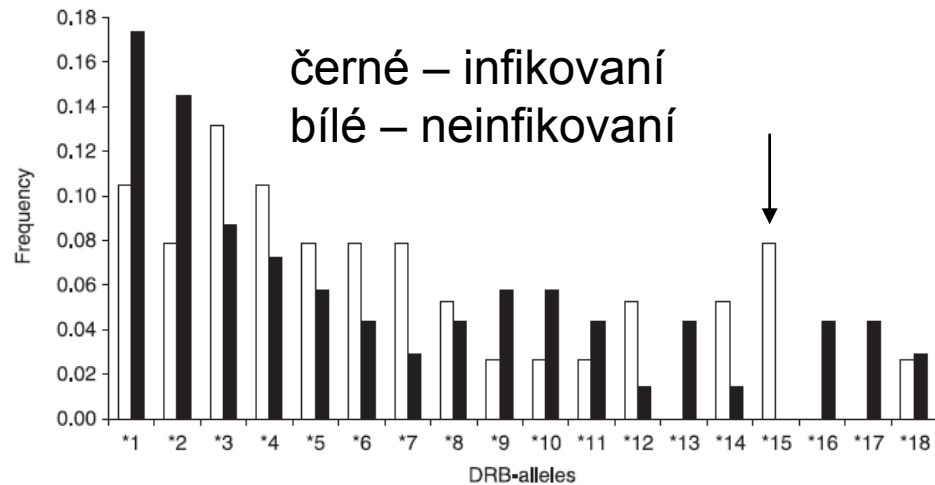
- Zdá se být pravděpodobnější než „výhoda heterozygotů“

- Nutno prokázat, že skutečně dochází k časovým změnám ve frekvenci alel a parazitů - **dlouhodobé studie neexistují !!!**

Frekvence parazita

Čas

Asociace MHC genů a parazitů



vajíčka Nematoda v trusu



Gerbillurus paeba
(Harf & Sommer, Mol. Ecol. 2005)



Microcebus murinus
(Schad et al., Evolution 2005)



Apodemus flavicollis
(Meyer-Lucht & Sommer, Mol. Ecol. 2005)

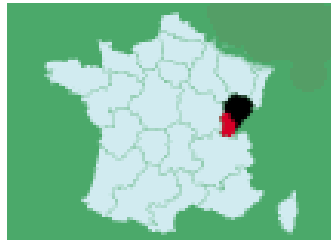


- Velké množství testů, riziko "false positives" → využití vícerozměrných metod

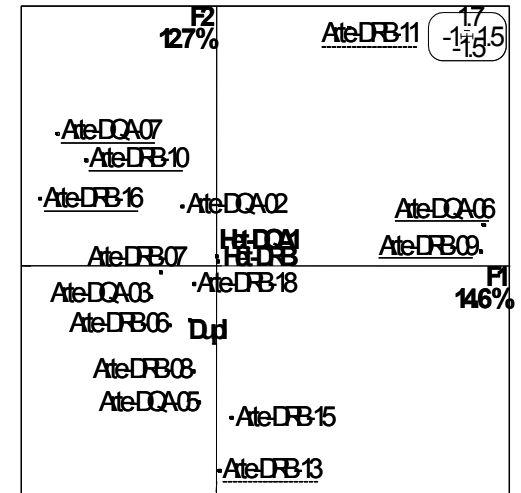
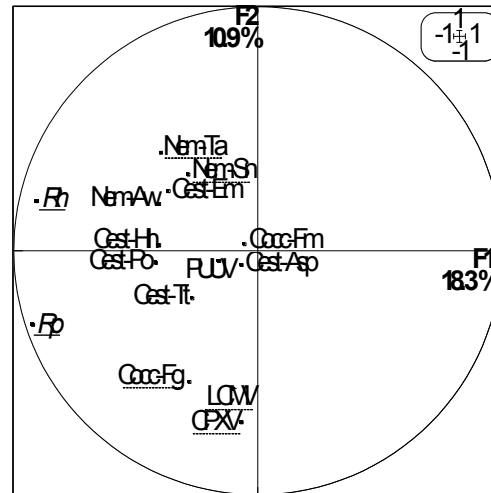
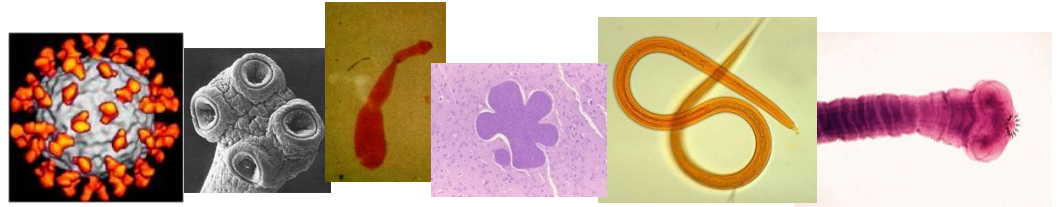
Př. *Arvicola terrestris* – hryzec vodní



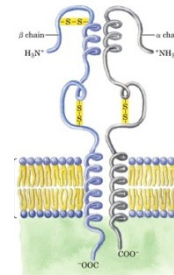
© Lubomir Hlasek
www.hlasek.com
Arvicola terrestris dal1698



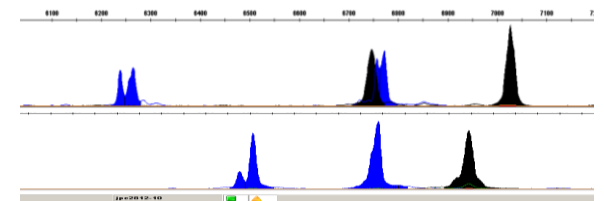
Canton Nozeroy (pohoří Jura, région Franche-Comté)



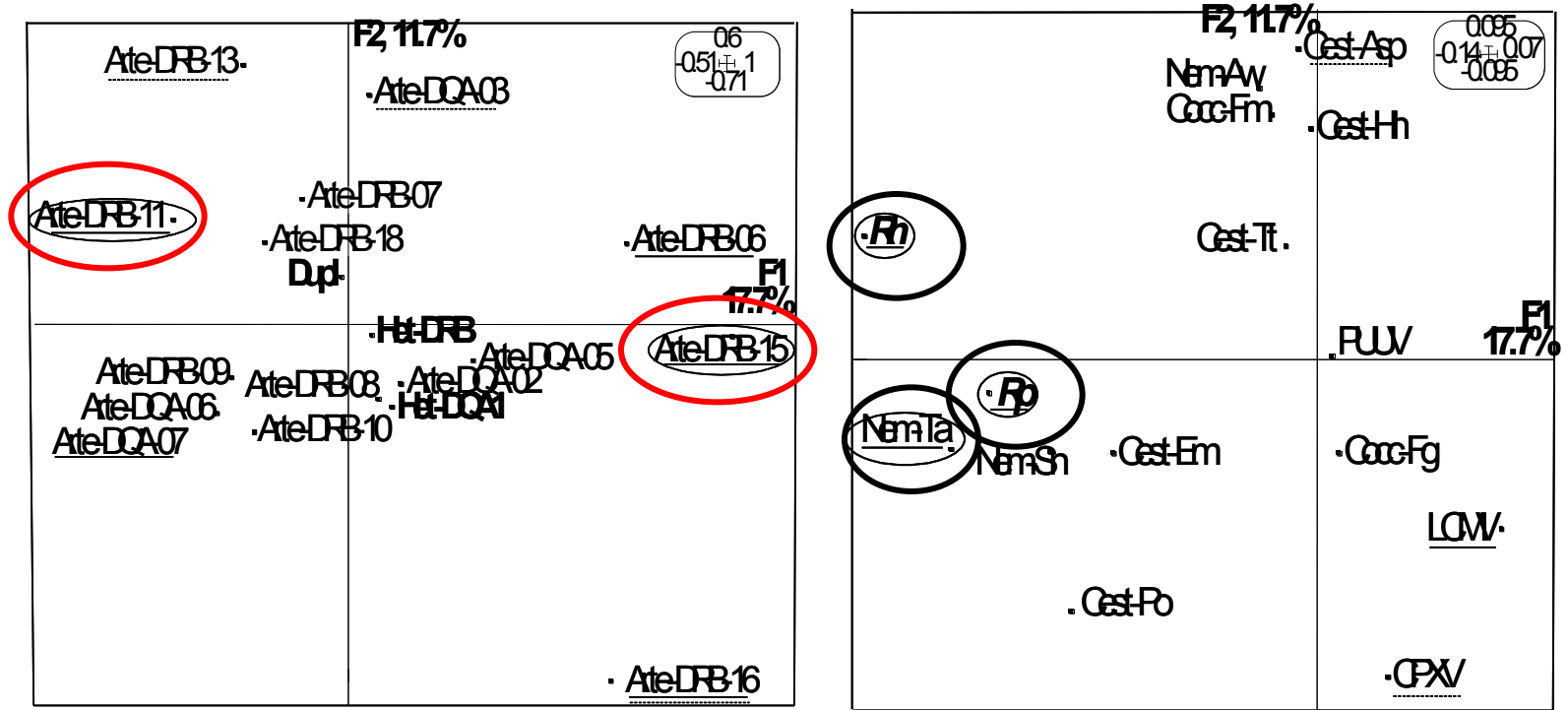
- 6 populací, 3 roky
- téměř kompletní parazitologická analýza (včetně některých virů)
- vícerozměrné analýzy



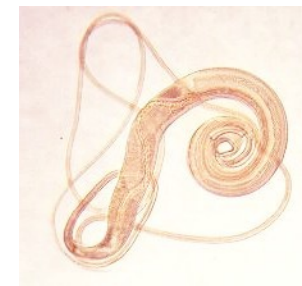
SSCP analýza



Analýza koinercie (co-inertia analysis)



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





Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics?

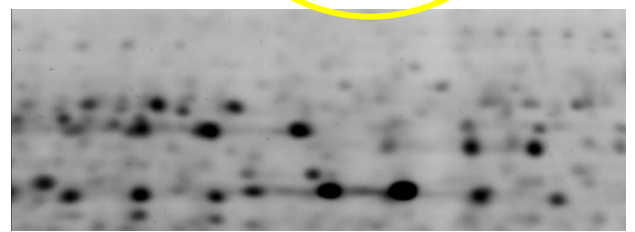
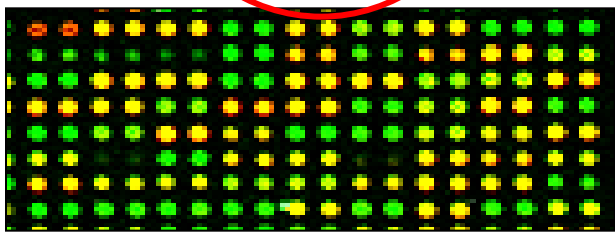
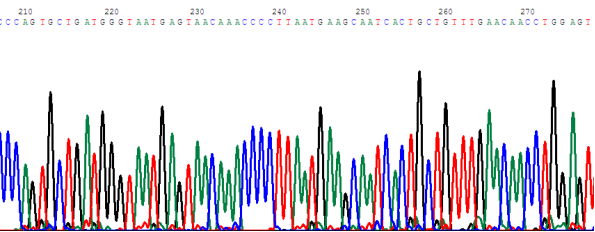
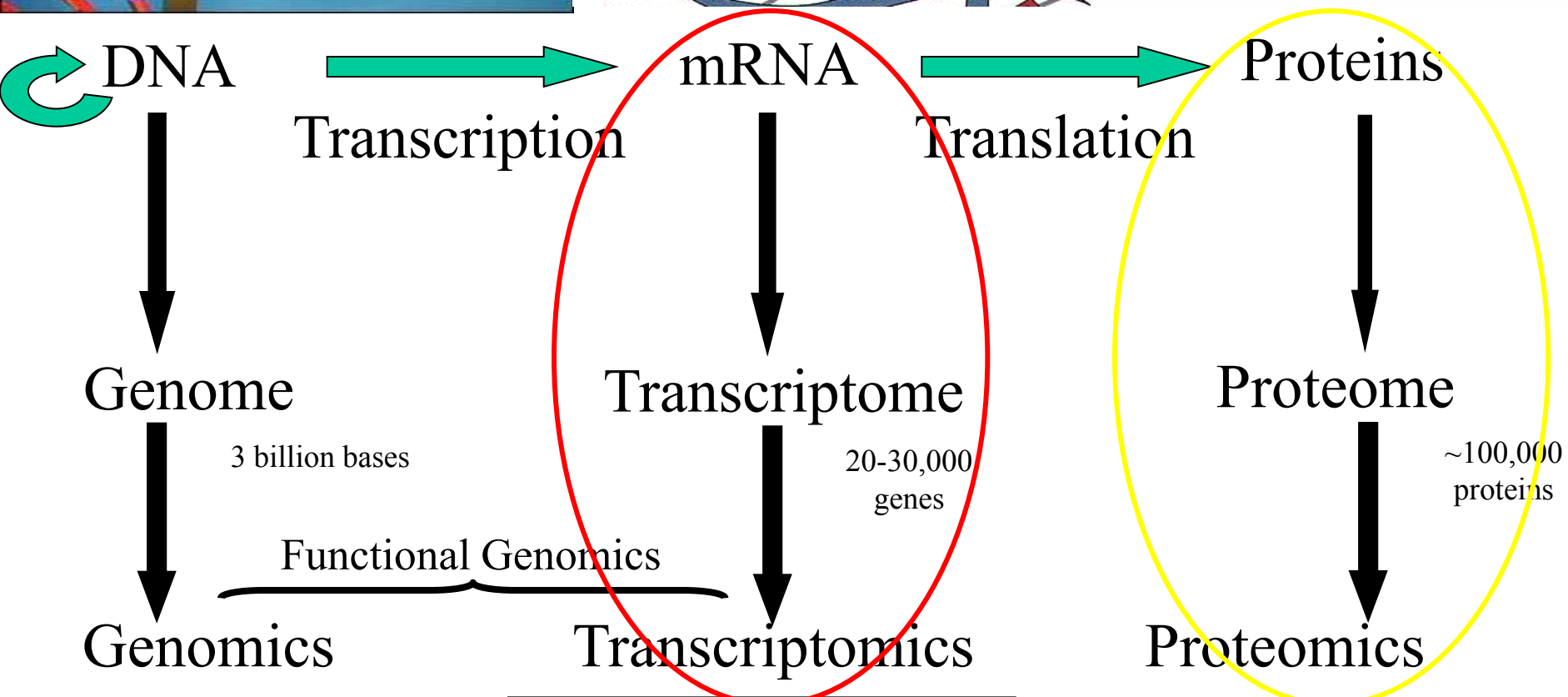
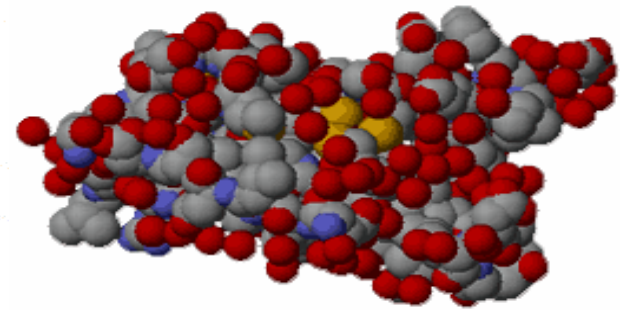
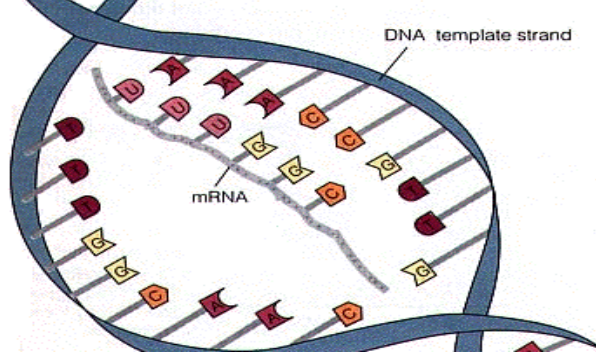
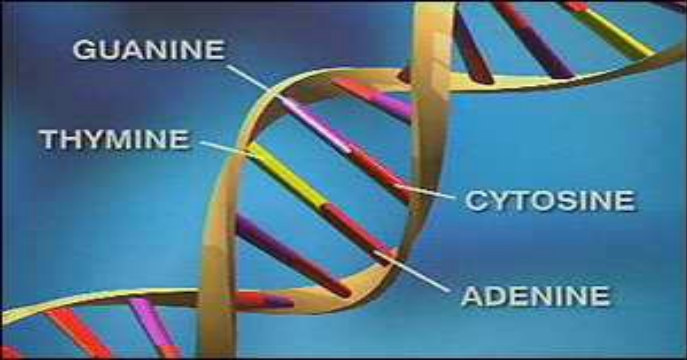
Karina Acevedo-Whitehouse and Andrew A. Cunningham

Institute of Zoology, Regent's Park, London, NW1 4RY, UK

„Mapping and association studies have revealed that approximately half of the genetic variability for resistance to infection is attributable to non-MHC genes, suggesting that MHC-independent immune responses also undergo host-pathogen coevolution.“

Acevedo-Whitehouse & Cunningham 2006

Sledování mnoha genů najednou



Budoucnost genetických metod v ekologickém výzkumu

1. Nové postupy při sekvenování DNA („genomics“)

Molecular Ecology Resources (2008) 8, 3–17

doi: 10.1111 /j.1471-8286.2007.02019.x

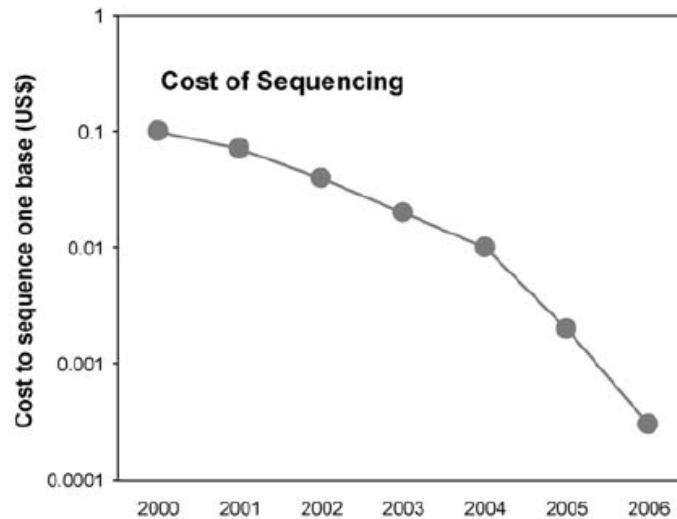
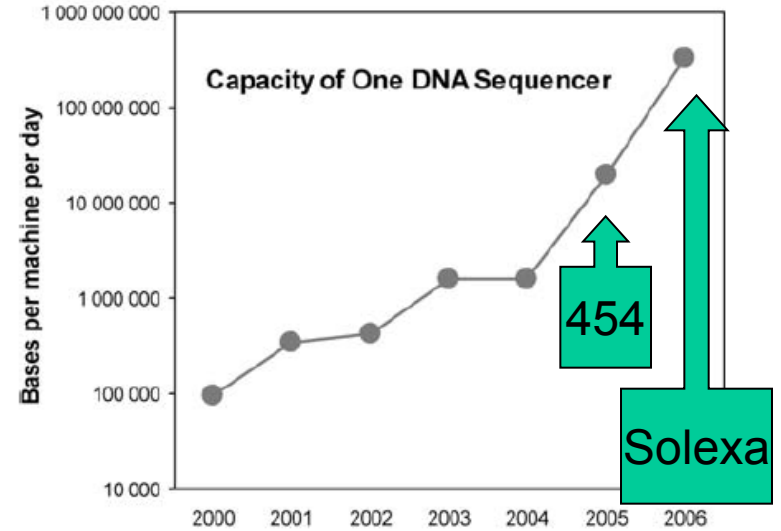
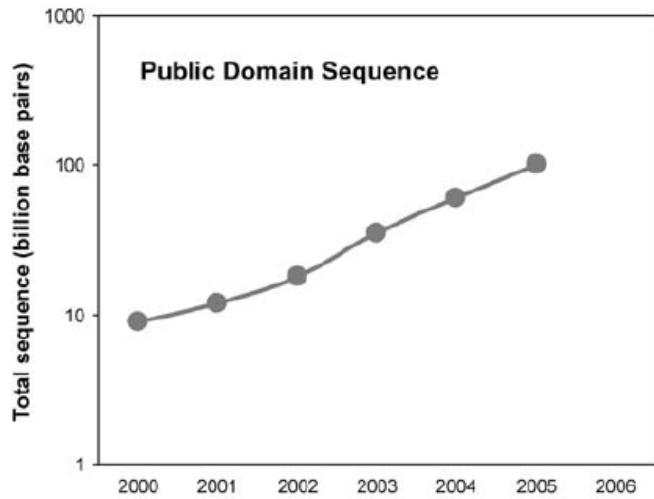
TECHNICAL REVIEW

**Sequencing breakthroughs for genomic ecology and
evolutionary biology**

MATTHEW E. HUDSON

Department of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana, 334 NSRC, 1101 W. Peabody Blvd., IL 61801, USA

„genomics era“

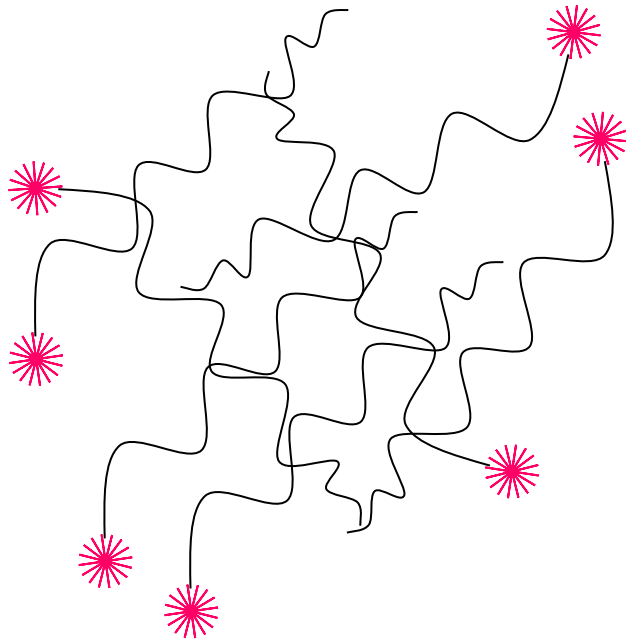


Budoucnost genetických metod v ekologickém výzkumu

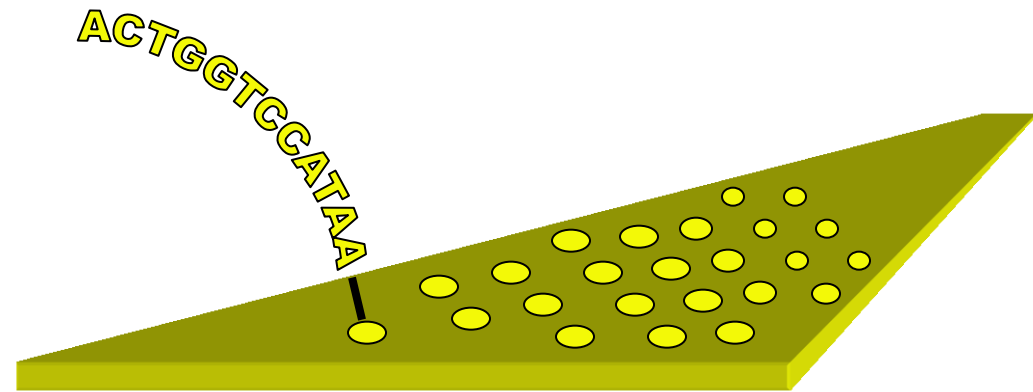
2. Analysis of expression by microarrays („transcriptomics“)

Ranz JM, Machado CA: Uncovering evolutionary patterns of gene expression using microarrays. TREE, 21(1): 29-37

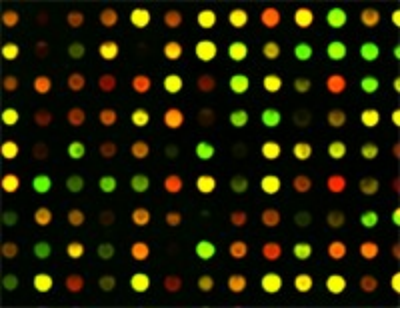
Microarray analysis of transcriptome (~ specific DNA hybridization)



Target (i.e. mix of transcripts in a form of cDNA = mRNA přepsaná do DNA reverzní transkriptázou, tj. neobsahuje introny)



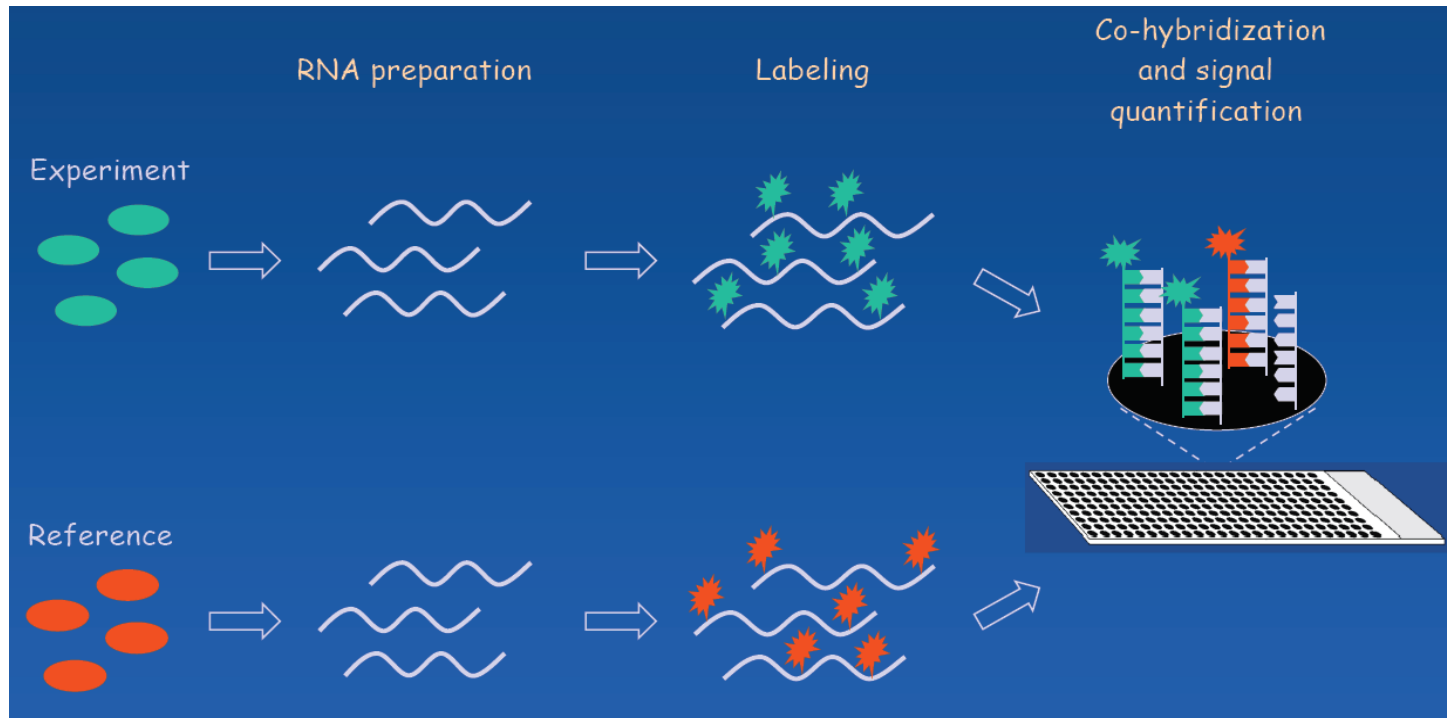
Probe (i.e. synthesized oligonucleotides complementary to particular genes)



Sledování exprese genů microarrays



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



Case study: Joop Ouborg et al.

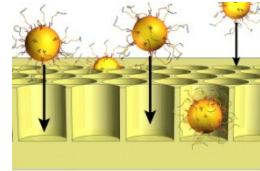
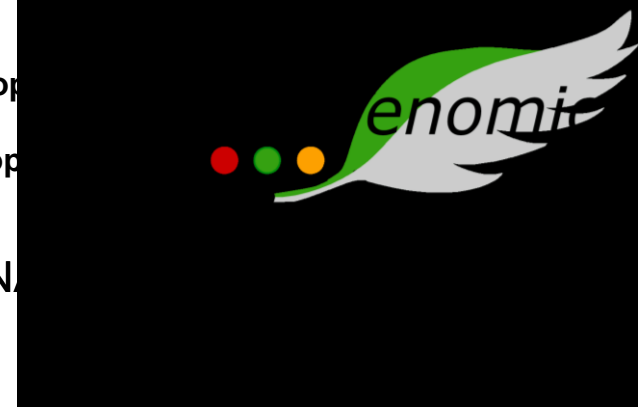
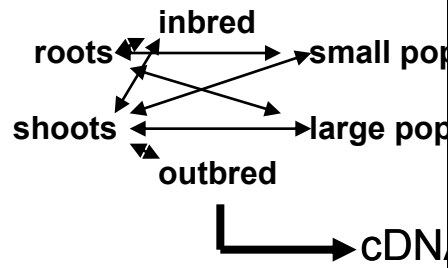
Transcriptional profiling of inbreeding depression and genetic erosion in *Scabiosa columbaria*: the balance between genetic drift and selection in the genetic erosion process.





Example:

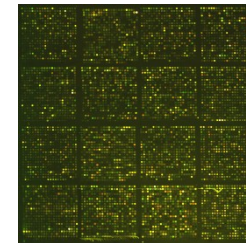
Scabiosa columbaria



530.000 sequences in one run, leading to ~ 40.000 ESTs



Agilent Technologies



15k – 30k 60-mer microarrays

Experiment: transcriptional profiling of inbreeding depression



Annotation of these 40.000+ ESTs („expressed

Automated programs available, like **BLAST2GO** (<http://www.blast2go.de/>).

just feed a file with the ESTs into the program, and turn it on.....

1 week later you will have the results, being:

- Homology with known sequences
- Known function

The sequences may also be searched for:

EST-associated SSR markers: MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)

SNP markers: SNP-mining software like PolyBayes

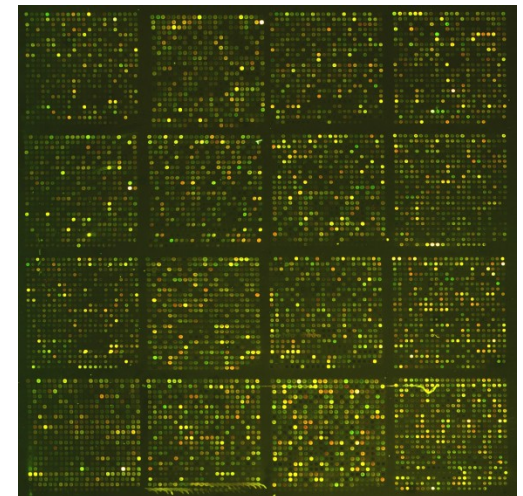
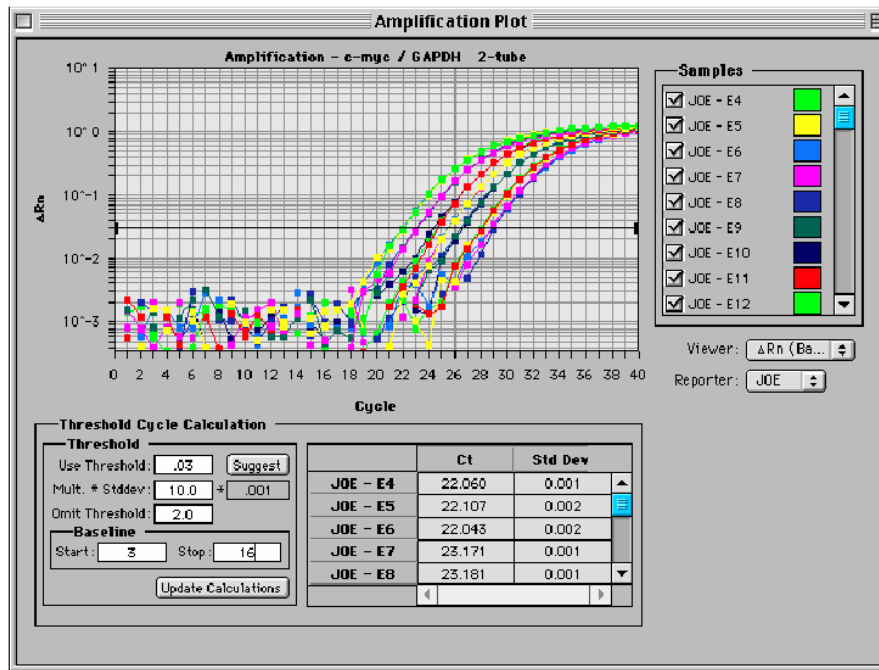
(<http://genome.wustl.edu/tools/software/polybayes.cgi>)

Again by using search software, freeware

ALMOST HALF OF GENES (ESTs) ARE UNKNOWN !!!

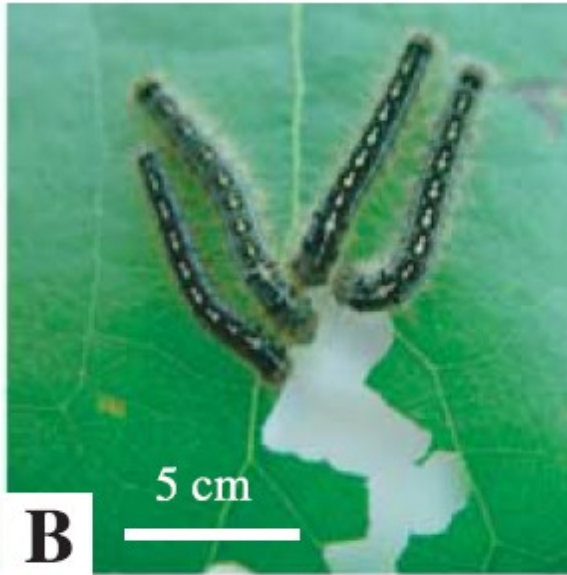
1. Design of quantitative RealTime-PCR methods, based on primer sequences

2. Design of a Scabiosa specific microarray





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

Jaká je úroveň exprese v různých tkáních?



- srdeční, červená a bílá svalovina
- rozdíly v expresi 113, 81 a 196 genů
- rozdíly jsou způsobeny tkáňově specifickým stupněm endotermie

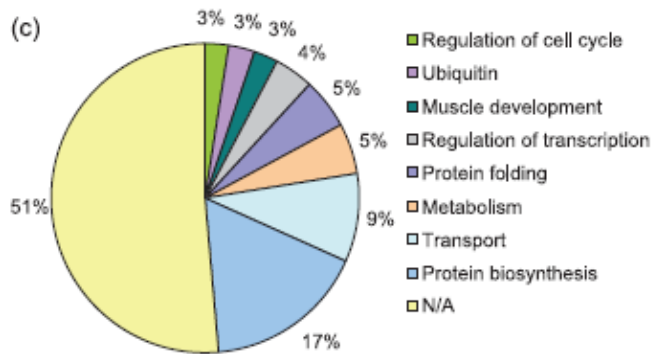
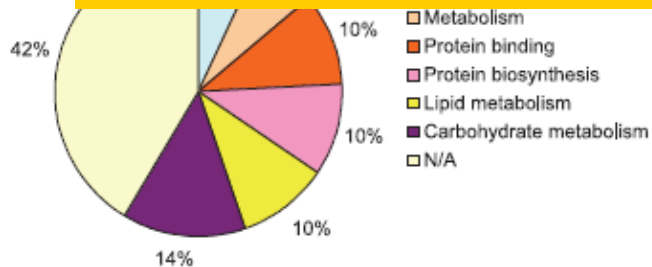


Fig. 1 Percentage of total up-regulated genes identified in the Gene Ontologies (Biological Process) of ventricle (a), red muscle (b) and white muscle (c).

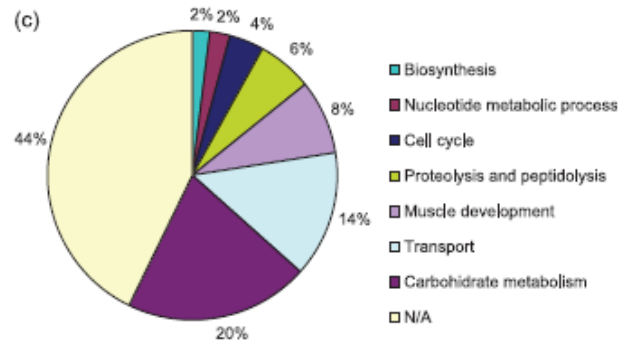
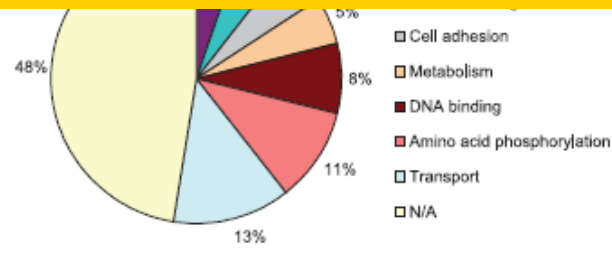
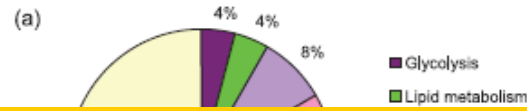
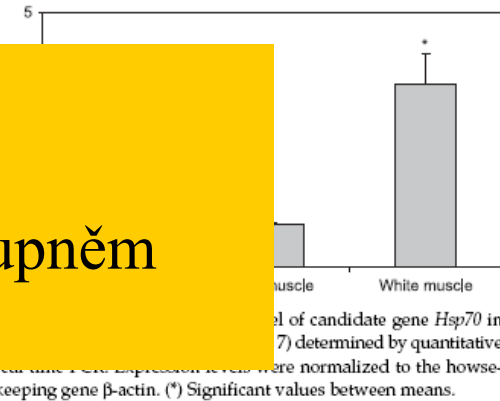


Fig. 2 Percentage of total down-regulated genes identified in the Gene Ontologies (Biological Process) of ventricle (a), red muscle (b) and white muscle (c).

quantitative real-time PCR



vliv aklimatizace k chladu (20° vs 15°C)

Závěr

- Molekulární ekologie se rychle vyvíjí
- Metody se zásadně vylepšují a mění
- Co platilo dnes, nemusí platit zítra
- Těšme se tedy na zítřek!