

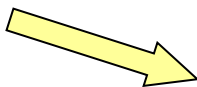
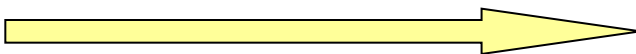
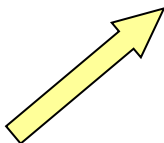
# Exprimované geny a přírodní selekce

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 (vs. fenotypová plasticita)
- např. interakce s abiotickým prostředím



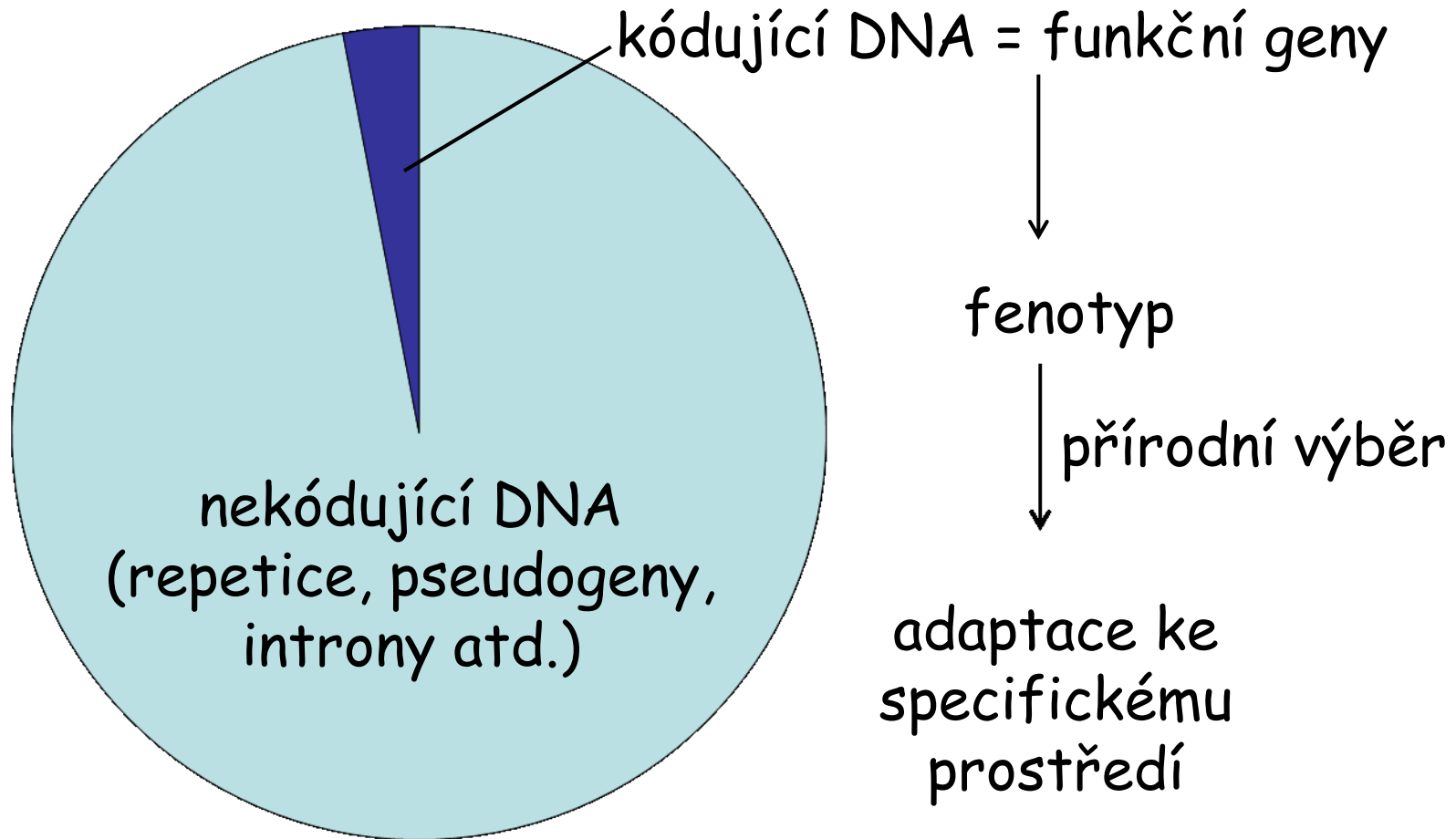
# Proč geny v molekulární ekologii?

- 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
- **proximální vysvětlení** - protože karotenoidy získané z potravy ukládá více do peří a méně je používá v imunitní odpovědi (protože má dobré geny)

# *Funkční vs. neutrální genetická variabilita*



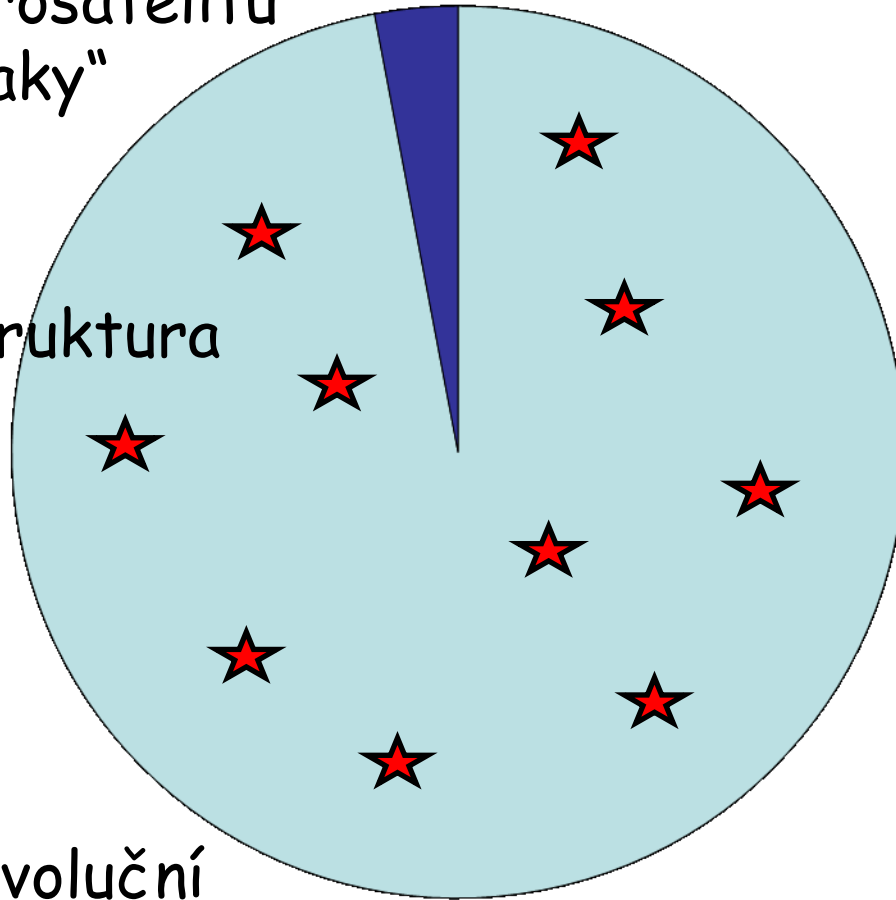
97% lidské DNA nic nekóduje!!!

# Jak relevantní je informace získaná z genetických dat

Příklad: 10 microsatelitů  
= „neutrální znaky“

- ✓ populačně-genetická struktura
- ✓ inbreeding
- ✓ bottleneck

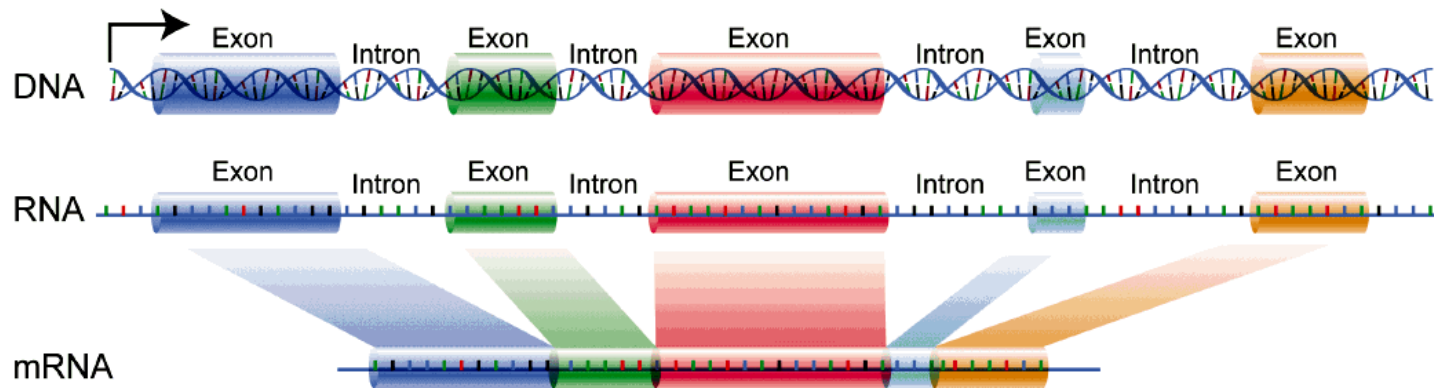
- ✗ adaptace
- ✗ proximální evoluční mechanismy



↓  
*a priori*  
neutrální k  
působení  
přírodního  
výběru

# Struktura genů

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



# Degenerovaný genetický kód

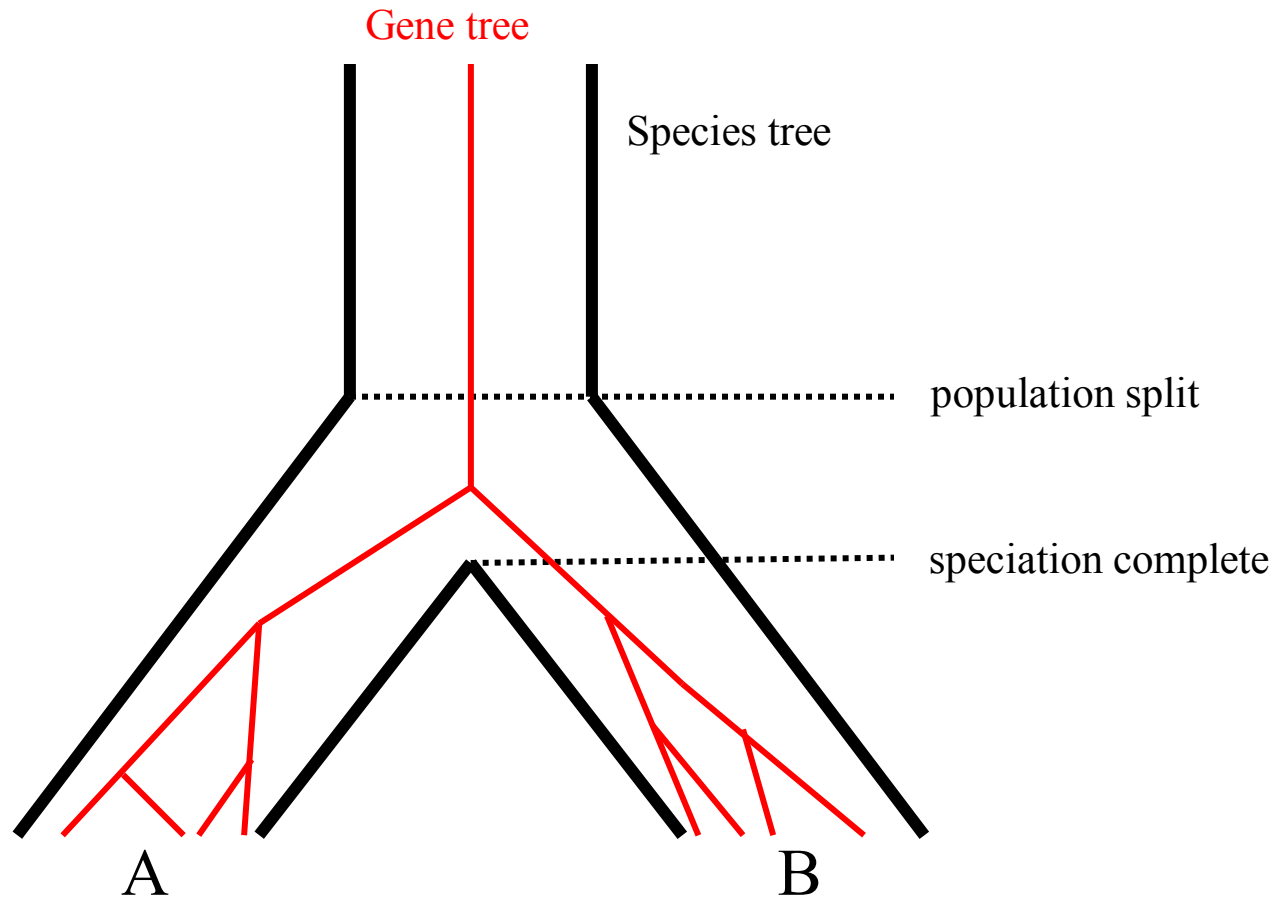
GCT	➔	Alanine
GCA	➔	Alanine
GCC	➔	Alanine
GCG	➔	Alanine
CCT	➔	Proline
GGA	➔	Glycine

→ 3rd position evolves neutrally

→ 1st and 2nd position under selection

# Jak poznat, že na daný gen působí selekce?

- Gene-tree versus species tree

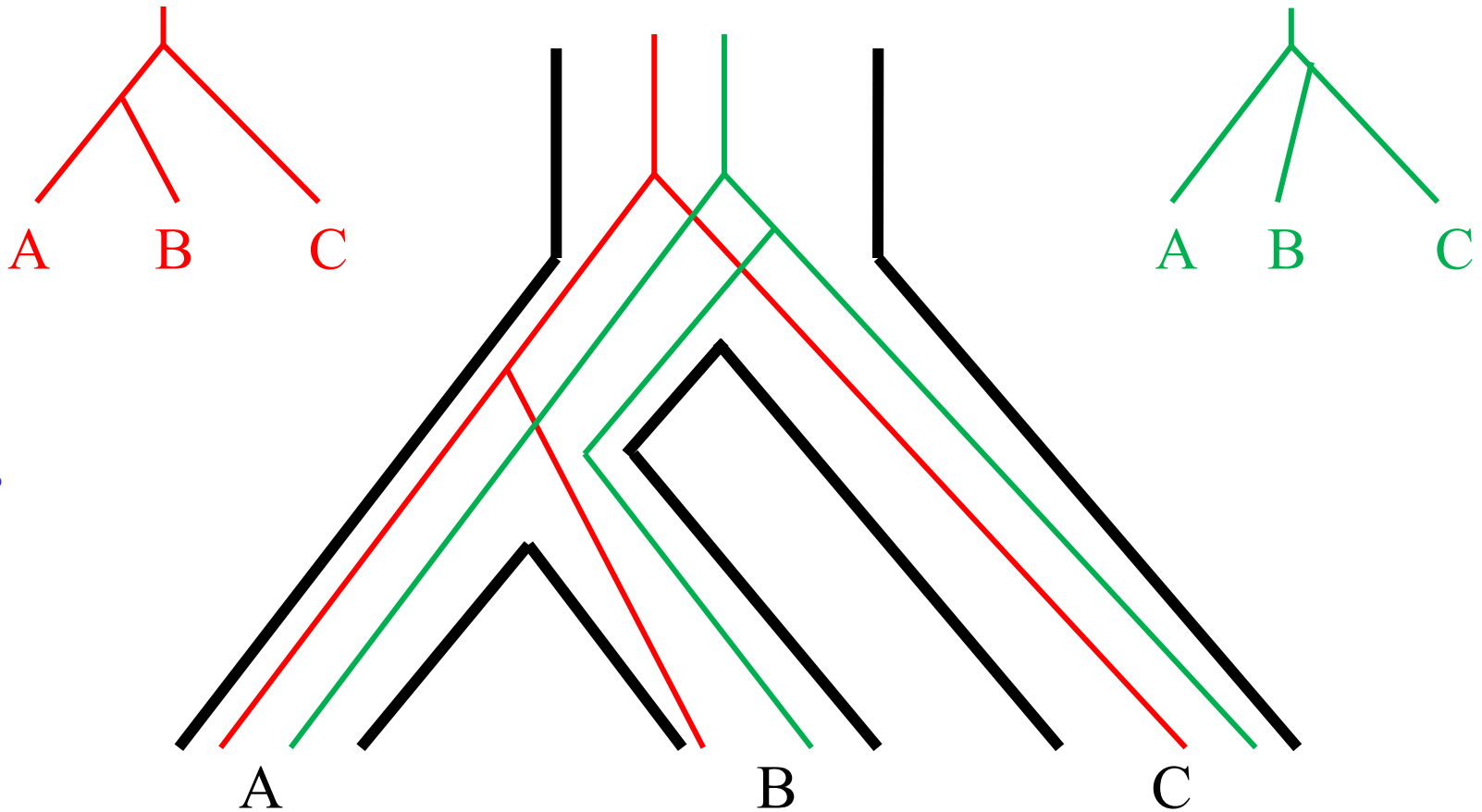


Studium selekce - fylogenetická analýza



# Studium selekce - fylogenetická analýza

- Gene-tree versus species tree



# Studium selekce - fylogenetická analýza

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

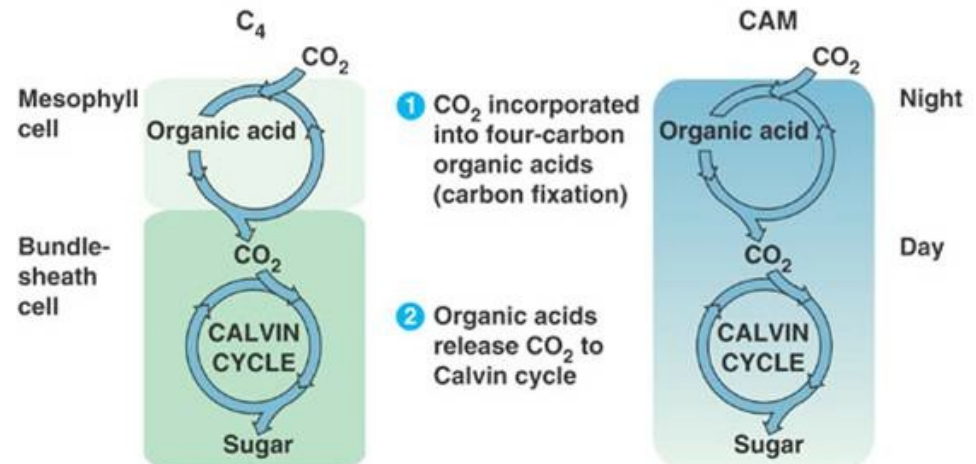
- Christin et al. 2007, Curr Biol
- *PEPC* gene
- →C4 photosynthesis



Sugarcane

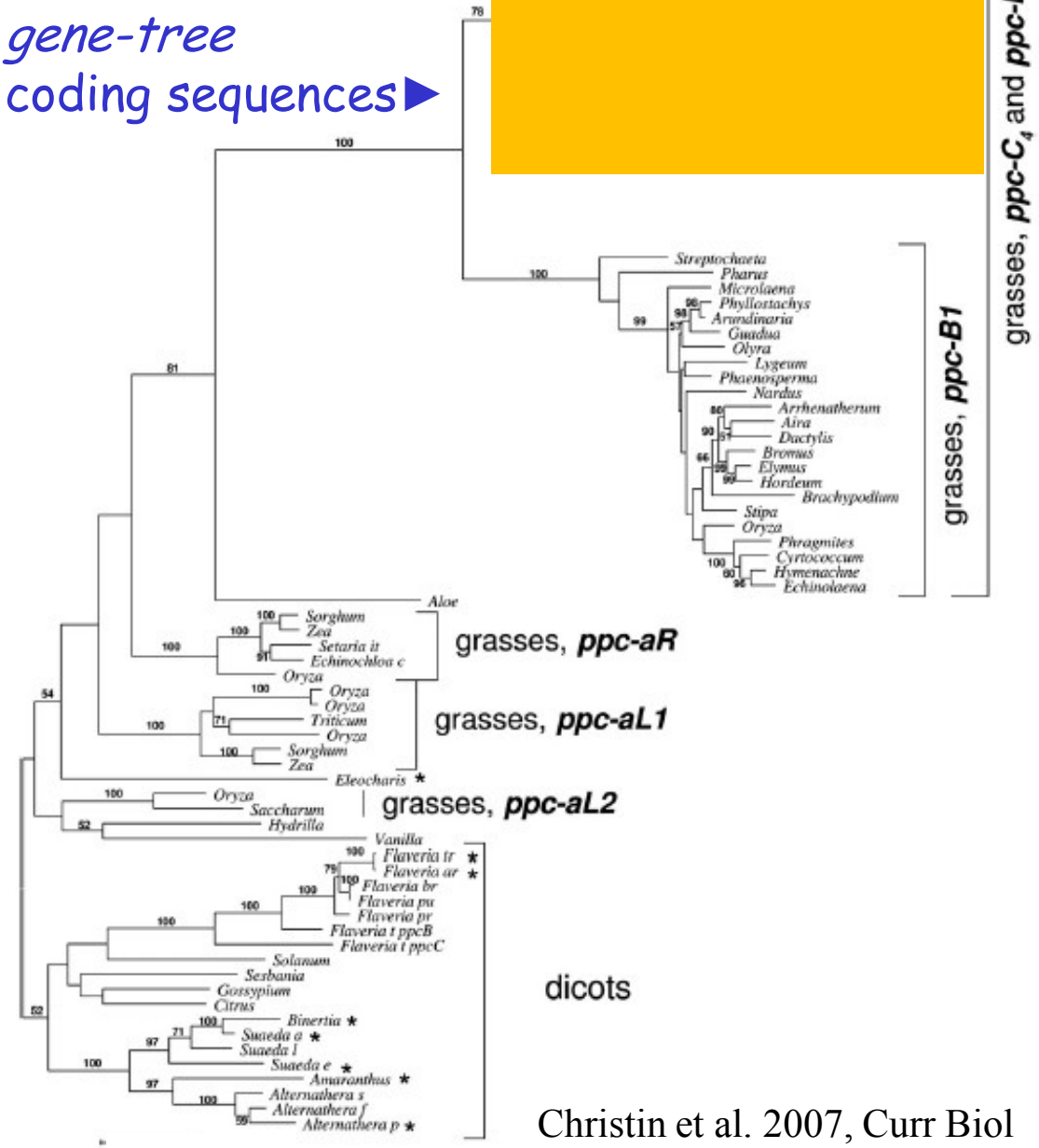


Pineapple

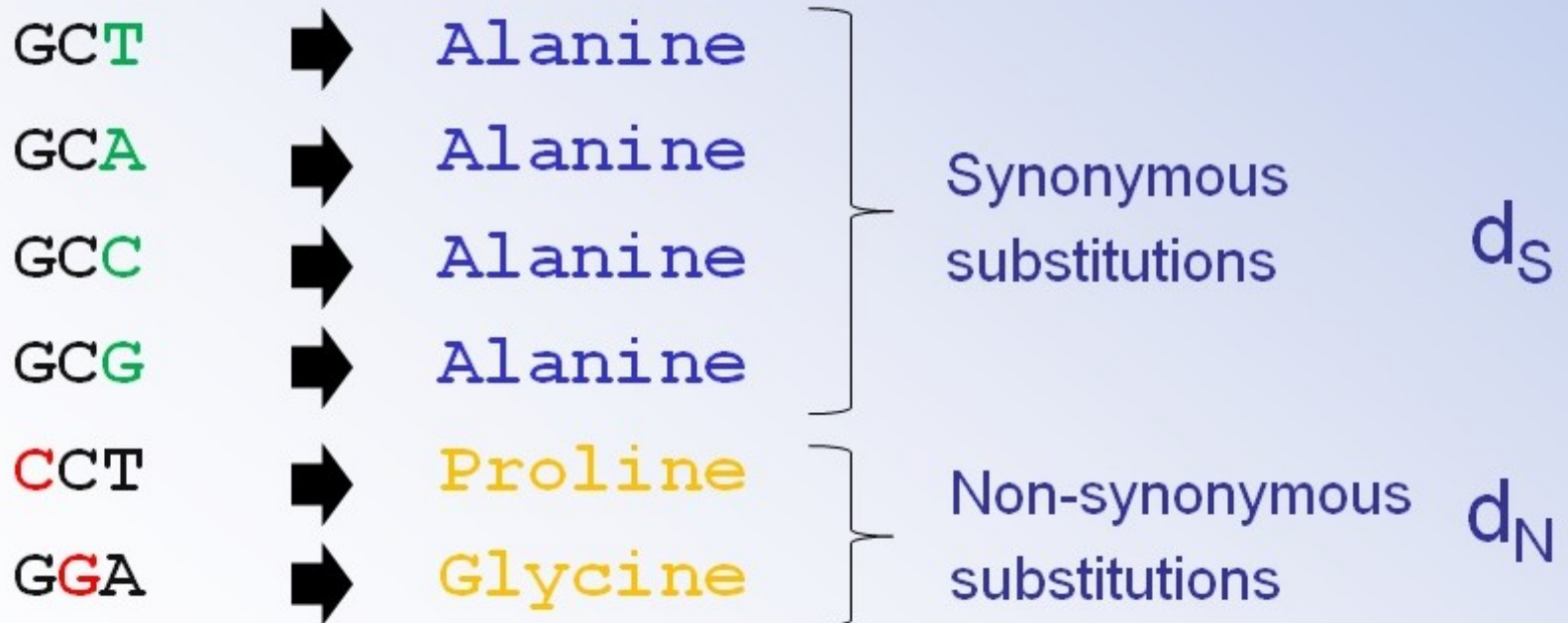


species-tree  
 ◀ intronic sequences

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

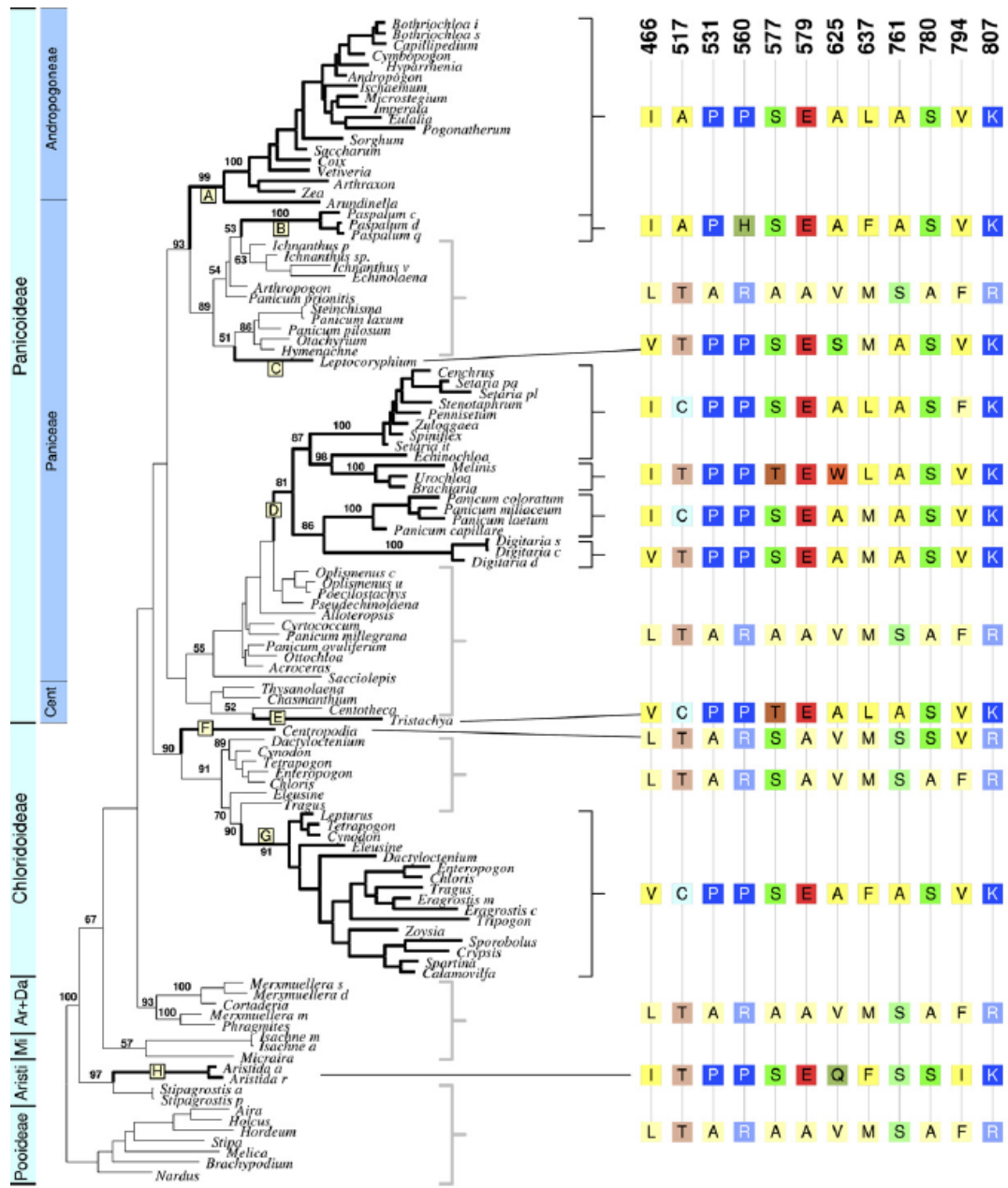
•  $d_N/d_S < 1$  less non-syn than syn substitutions  $\rightarrow$  purifying selection

•  $d_N/d_S > 1$  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

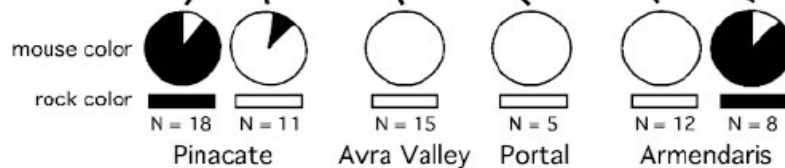
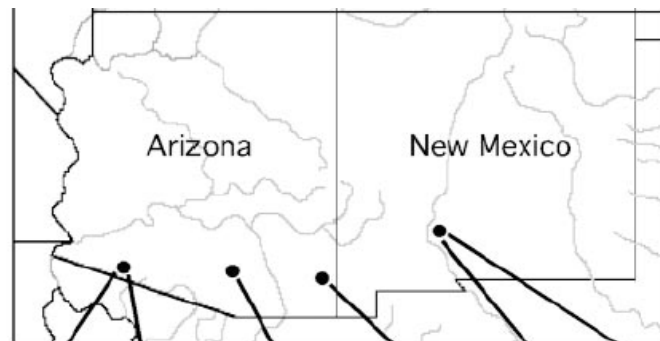
1. Sledování kandidátních genů
2. Genomické přístupy (mnoho genů najednou)



pytlouš

# *Chaetodipus intermedius*

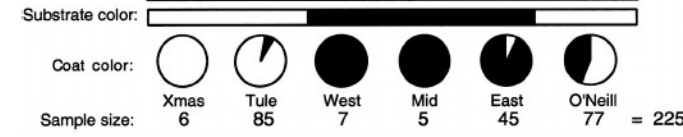
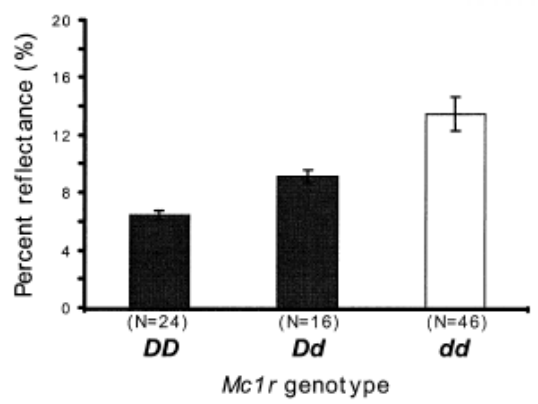
Hoekstra, Nachman et al.



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

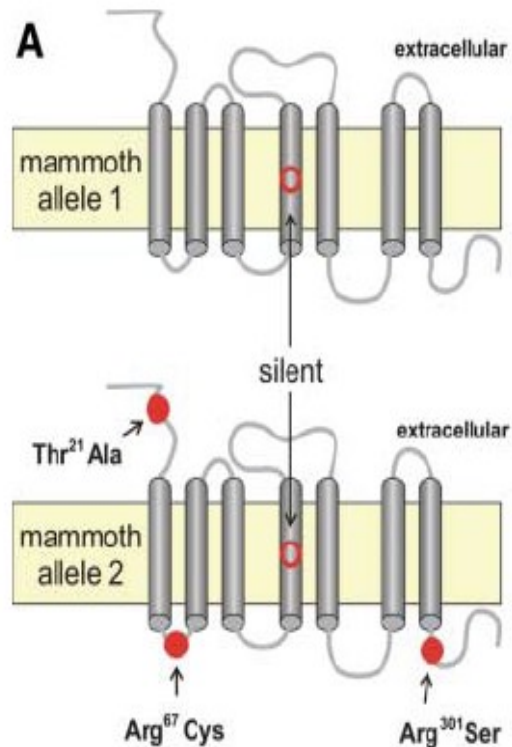
- **Arizona**

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

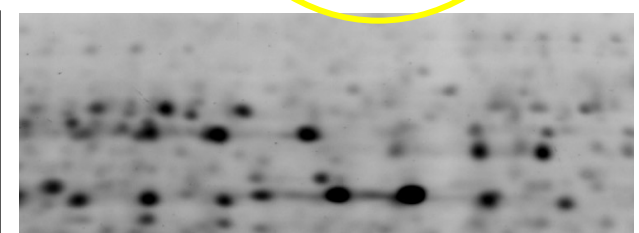
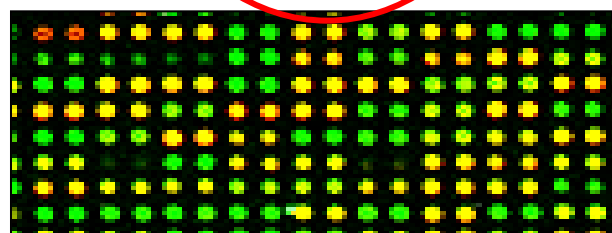
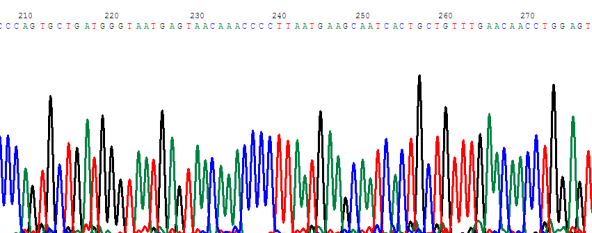
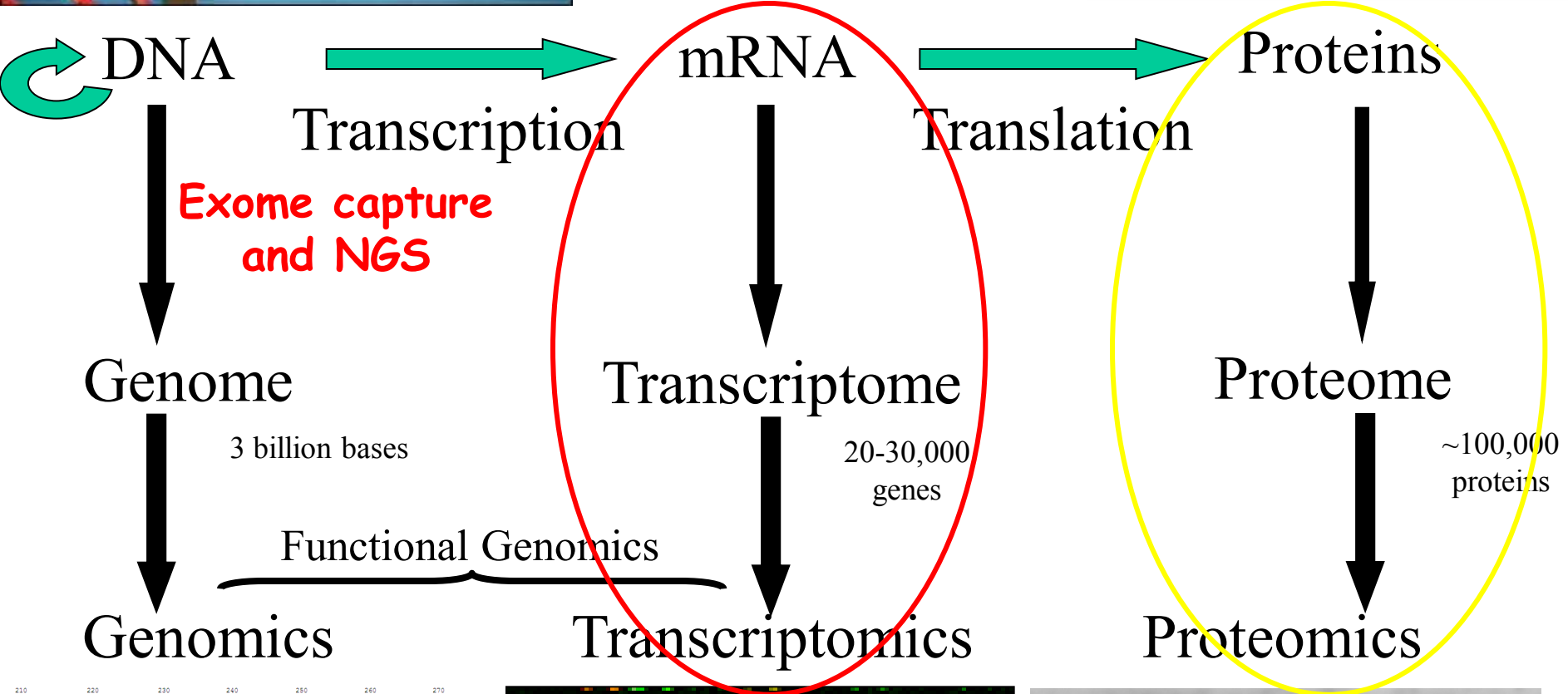
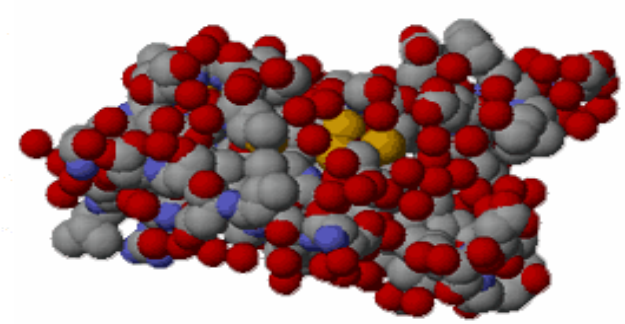
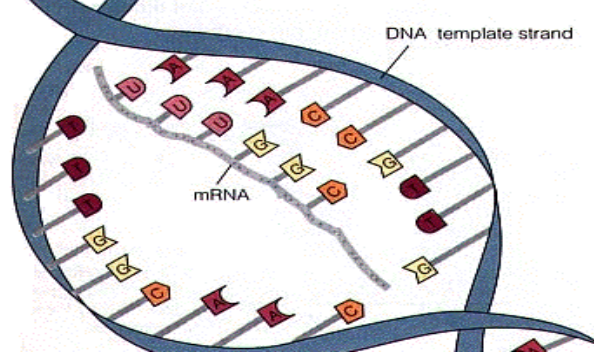
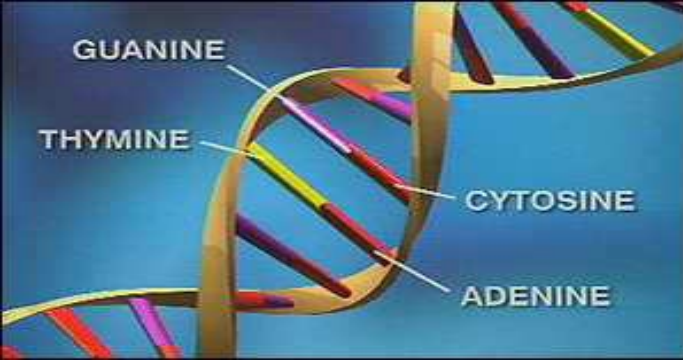


# MC1R u člověka, mamuta a dalších

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



Sledování mnoha genů najednou



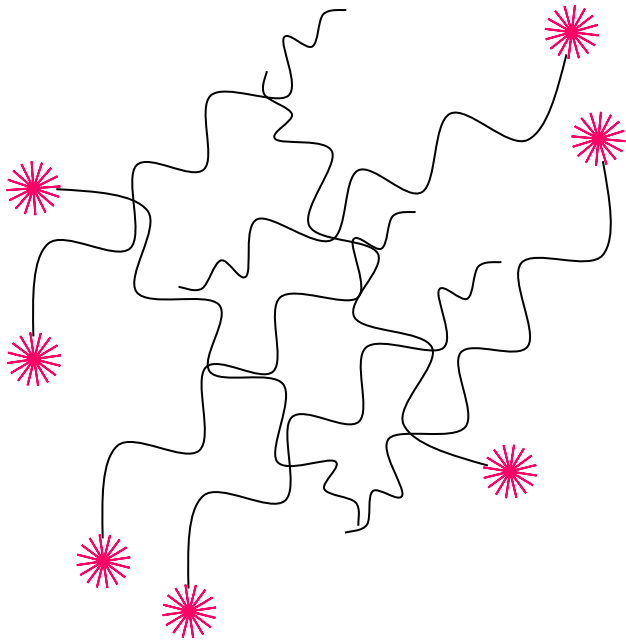
# Transkriptomika

1. microarrays
2. RNA seq (NGS)

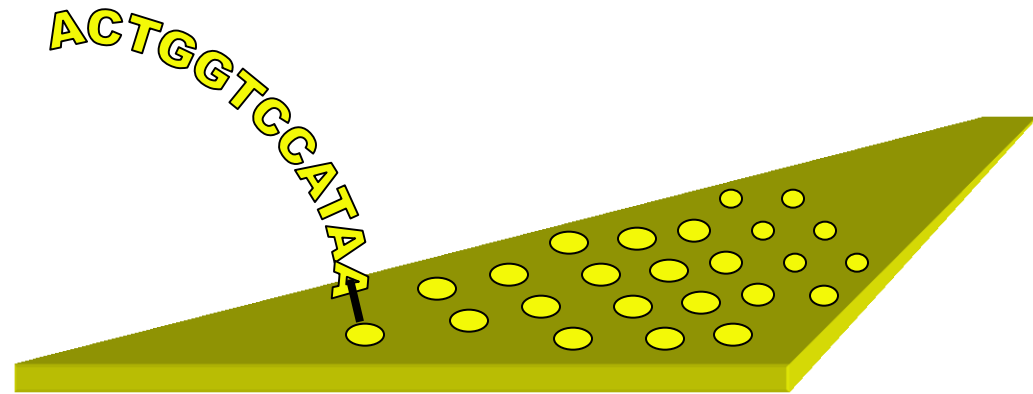
# 1. Analysis of gene expression by microarrays

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

# Microarray analysis of transcriptome (~ specific DNA hybridization)

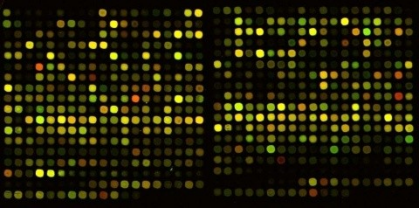


**Target** (i.e. mix of transcripts in a form of cDNA = mRNA přešpaná do DNA reverzní transkriptázou, tj. neobsahuje introny)



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



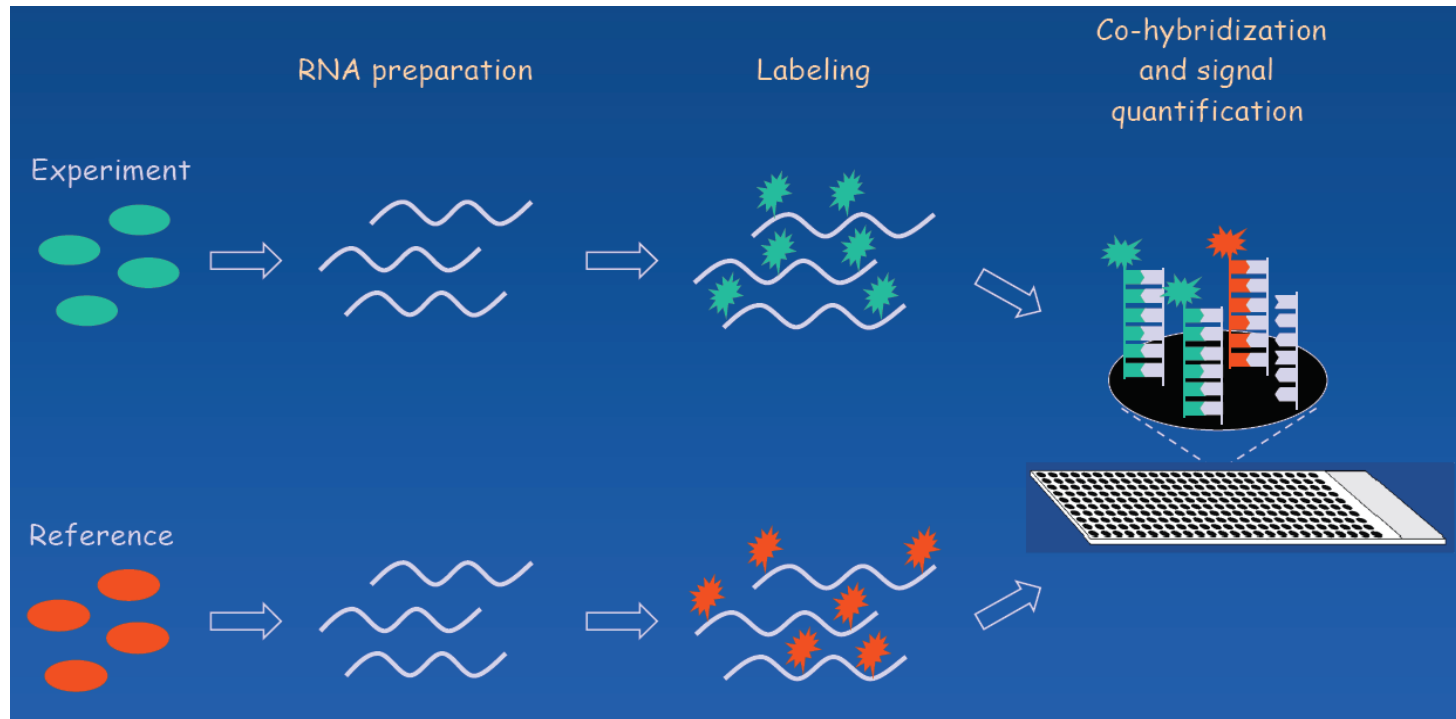


# Sledování exprese genů microarrays

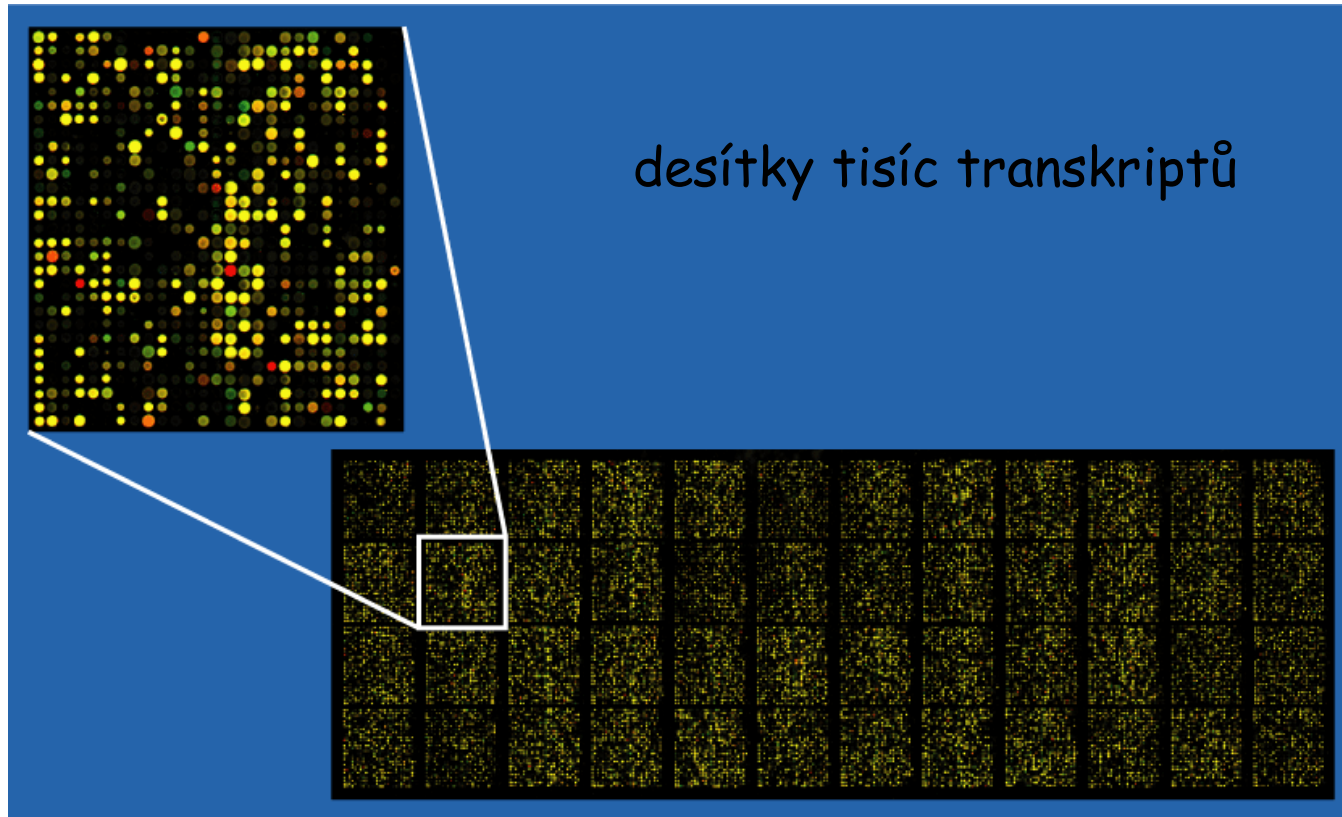
- Sledování exprese mnoha (tisíce) genů najednou
- Založeno na hybridizaci
- Sleduje se rozdíl vůči kontrole ("heterologous hybridization") = dvoukanálový experiment



Affymetrix  
Agilent Technologies



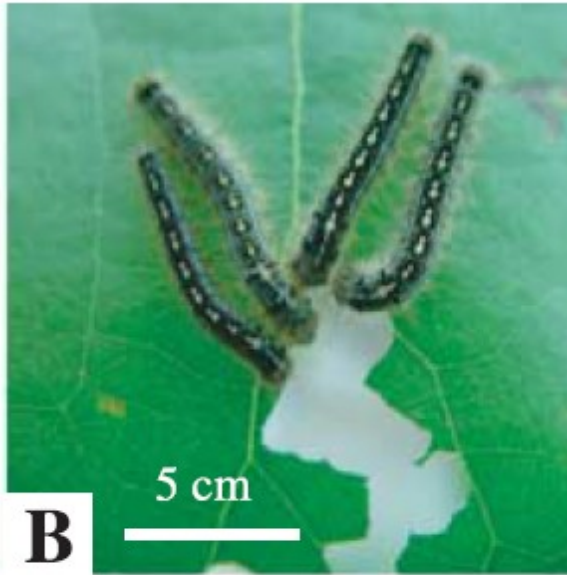
# Vyhodnocení chipu – analýza obrazu (srovnání úrovně exprese mezi kontrolou a experimentem)



- komerčně dostupné pro kompletní transkriptom cca 25 druhů (Affymetrix)  
(další jsou rychle vyvíjeny, i na zakázku)
- celkově ale microarrays ustupují před RNAseq



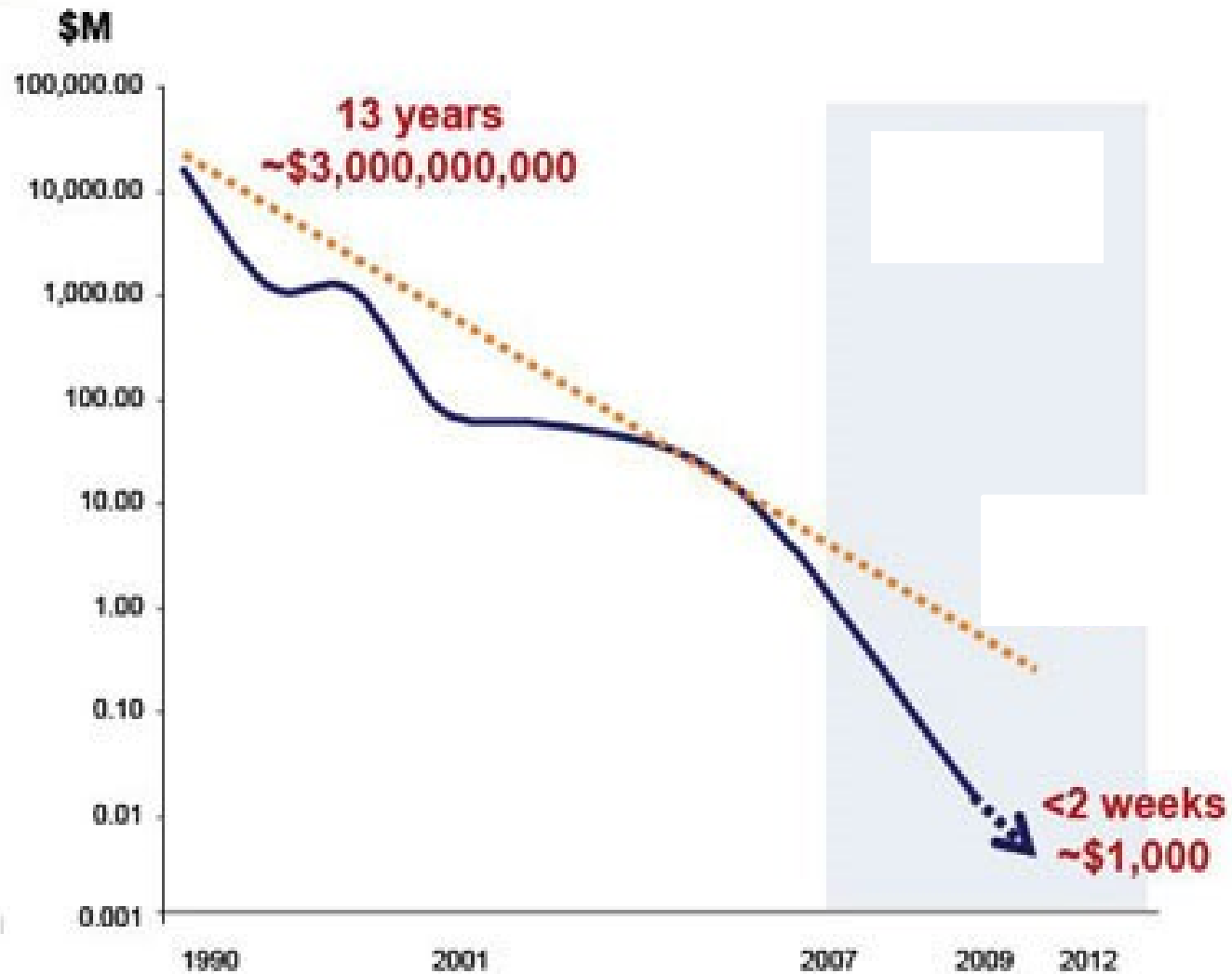
*Populus trichocarpa* x *deltoides*  
a *Malacosoma disstria* bourovec  
Ralph et al. 2006



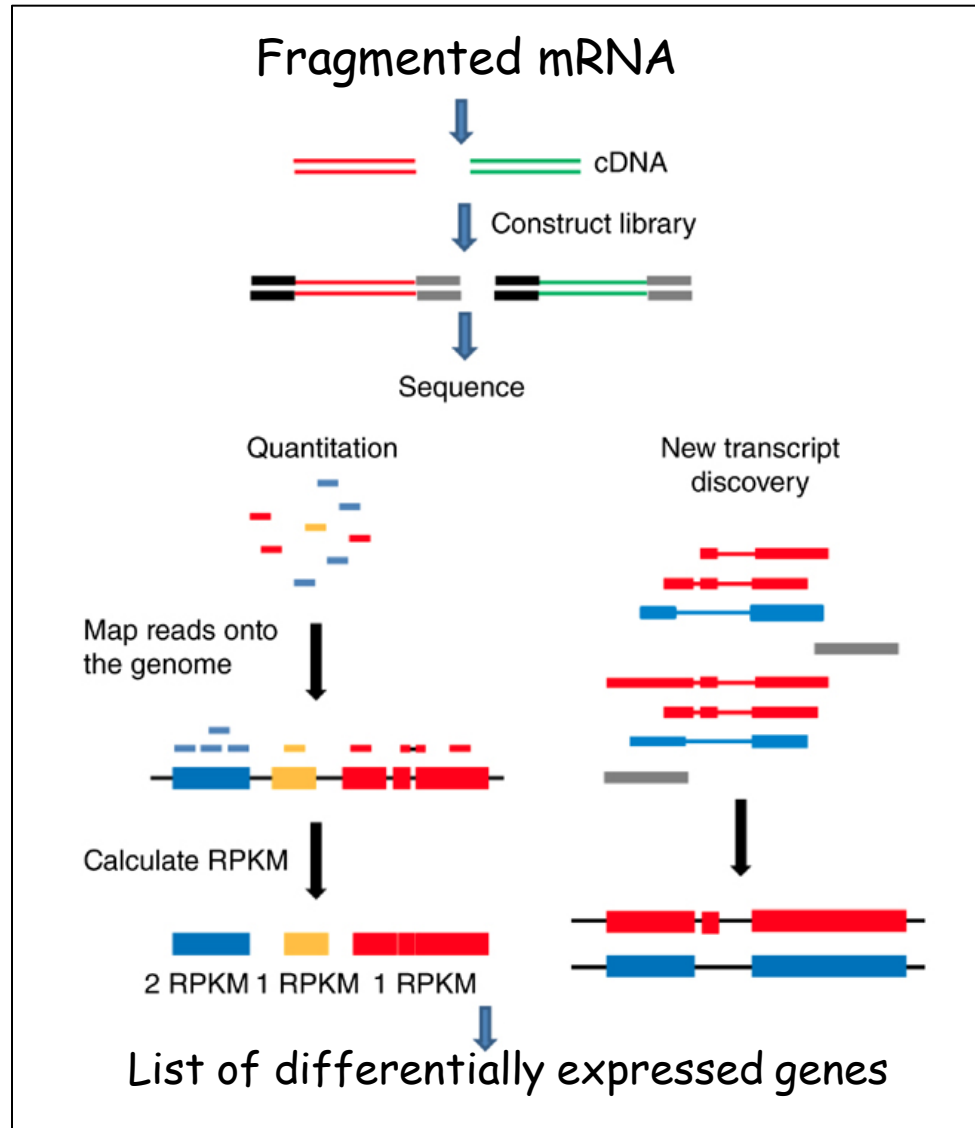
- cDNA microarray
- 15496 genů > 3/4 genomu
- Po 24 hodinách  
1191 genů up-regulated  
537 down-regulated
- Obrana: endochitinázy, inhibitory proteáz
- Signální funkce
- Transport, metabolismus, regulace transkripce

## 2. RNAseq („next-generation sequencing“)

# Cost per Human Genome



# RNA-Seq workflow for gene expression analysis



# RNA-Seq quantification

(RPKM = reads per kilobase per million reads)

Gene 1



Gene 2



## Actual Read Alignment to Alternative Splice Variants

Transcript 1



Transcript 2



Transcript 3



Transcript 4



The reference transcriptome is required

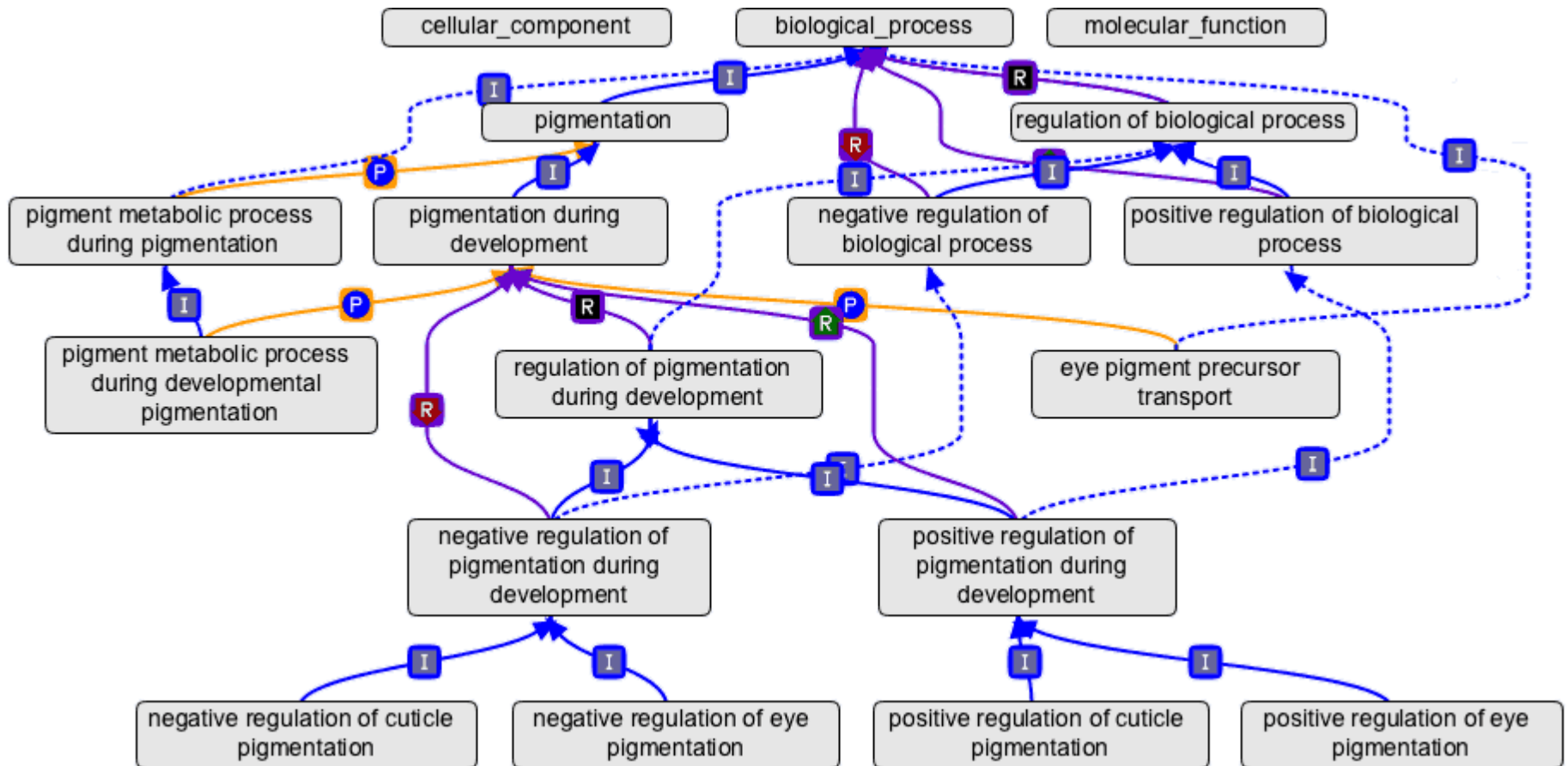
# Gene ontology (<http://geneontology.org/>)

= functional annotation analysis

- založena na databázích dostupných anotovaných genů u modelových organismů
- **Cellular Component** - the parts of a cell or its extracellular environment
- **Molecular Function** - the elemental activities of a gene product at the molecular level, such as binding or catalysis
- **Biological Process** - operations or sets of molecular events with a defined beginning and end, pertinent to the functioning of integrated living units: cells, tissues, organs, and organisms.



# Gene ontology as a graph

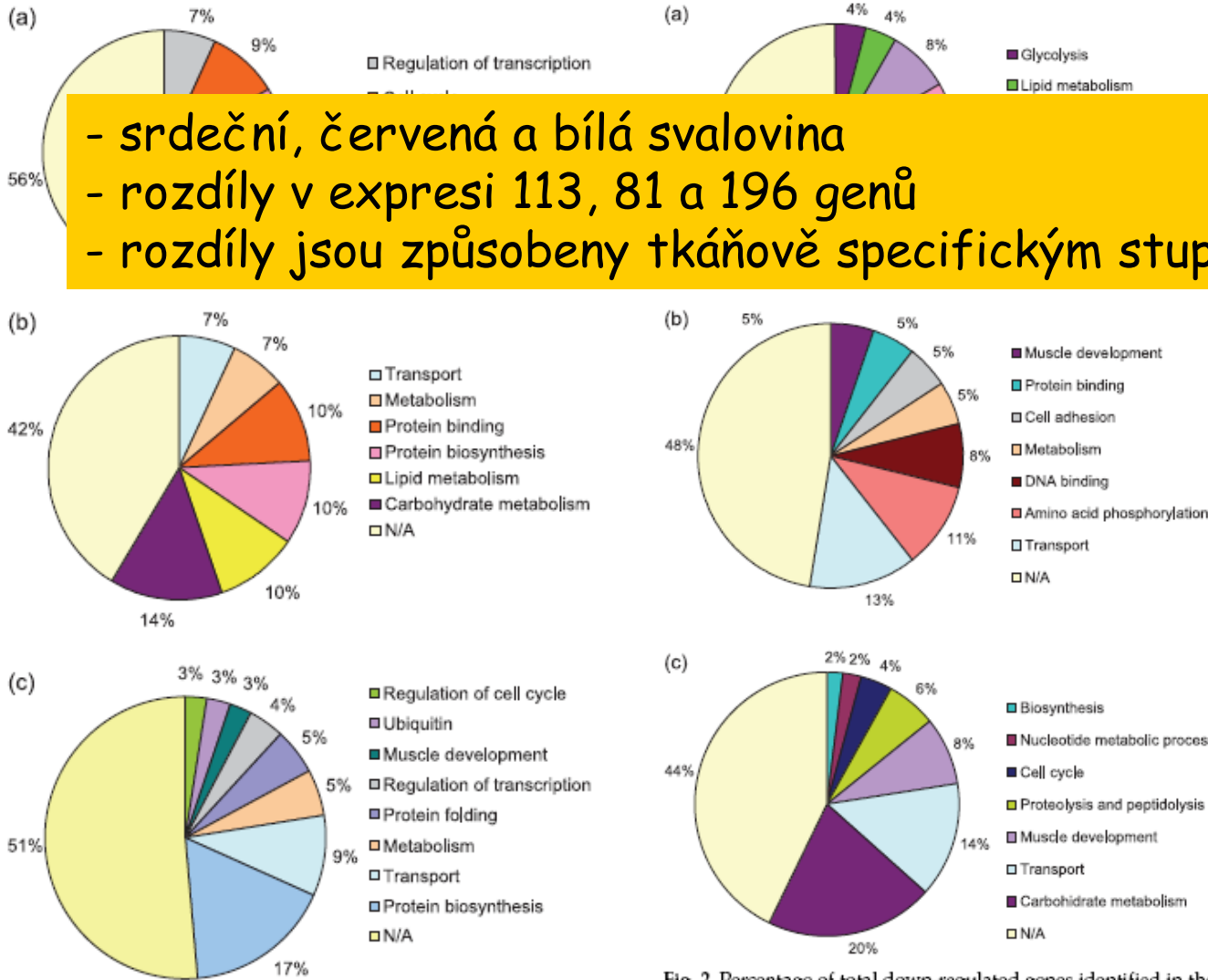


Example: A set of terms under the biological process node pigmentation.

# Příklady

# Jaká je úroveň exprese v různých tkáních?

quantitative real-time PCR



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

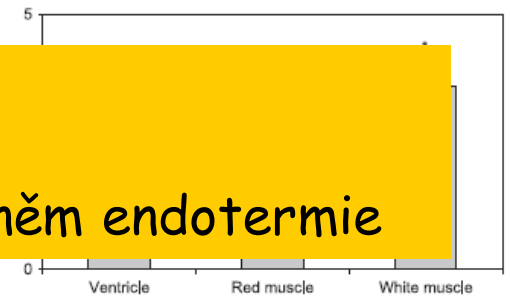


Fig. 1 Percentage of total up-regulated genes identified in the Gene Ontologies (Biological Process) of ventricle (a), red muscle (b) and white muscle (c).

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).

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

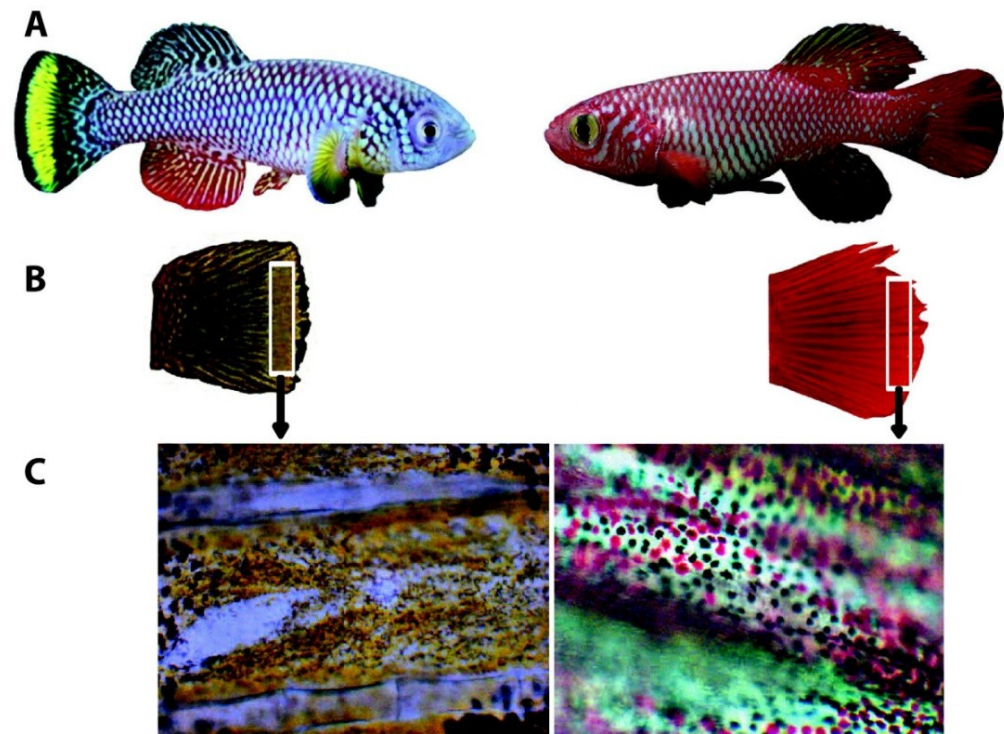
RESEARCH ARTICLE

Open Access

Transcriptome profiling of natural dichromatism  
in the annual fishes *Nothobranchius furzeri* and  
*Nothobranchius kadleci*

Enoch Ng'oma<sup>1</sup>, Marco Groth<sup>1</sup>, Roberto Ripa<sup>2</sup>, Matthias Platzer<sup>1</sup> and Alessandro Cellerino<sup>1,2\*</sup>

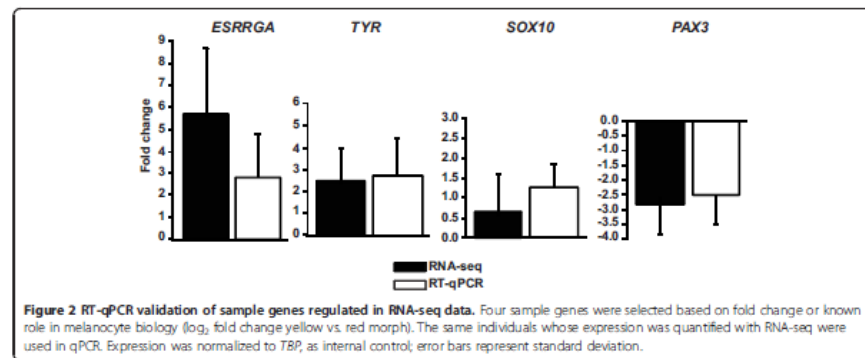
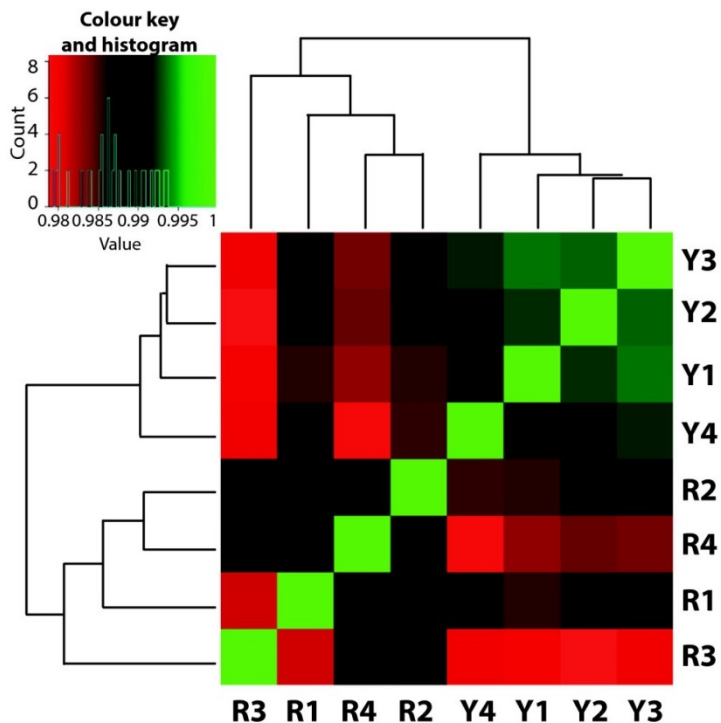
- cca 334 miliónů sekvencí („reads“); 42 mil./sample
- 210 DEGs („differentially expressed genes“) - 119 up-regulated, 91 down-regulated u žlutých jedinců



xanthophory

melanophory  
erythrophory

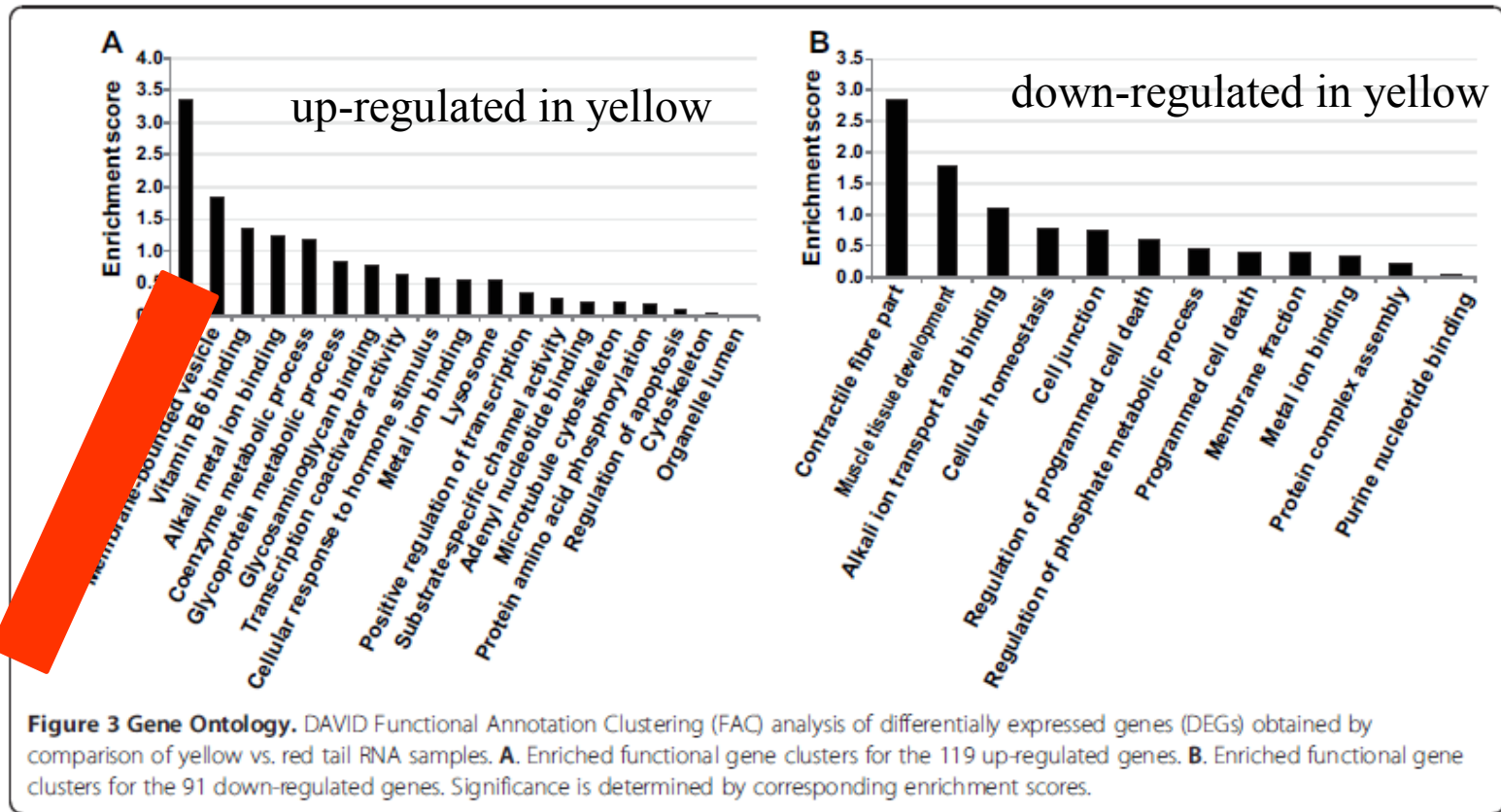
# Konzistence výsledků



- hierarchical clustering of expression level
- „žlutí“ a „červení“ jsou si navzájem podobní

- změny v expresi jdou stejným směrem u RNA-seq i RT-qPCR vybraných genů

# Functional annotation clustering (= gene ontology)



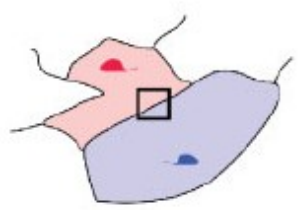
- xanthophory u žlutých jedinců jsou asociovány s melanogenezí
- v dalším kroku je možné studovat roli jednotlivých kandidátních genů

# Závěr

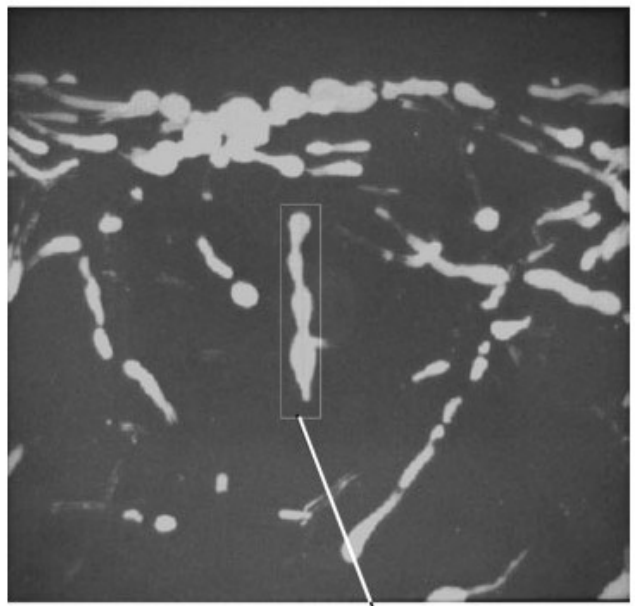
- Molekulární ekologie se rychle vyvíjí
- Metody se zásadně vylepšují a mění
- Co platilo dnes, nemusí platit zítra - těšme se tedy na zítřek



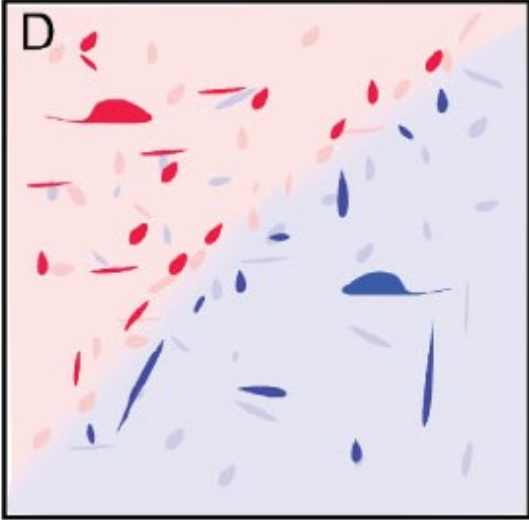
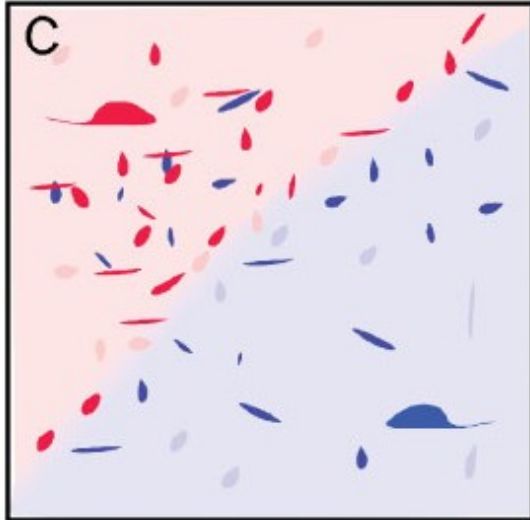
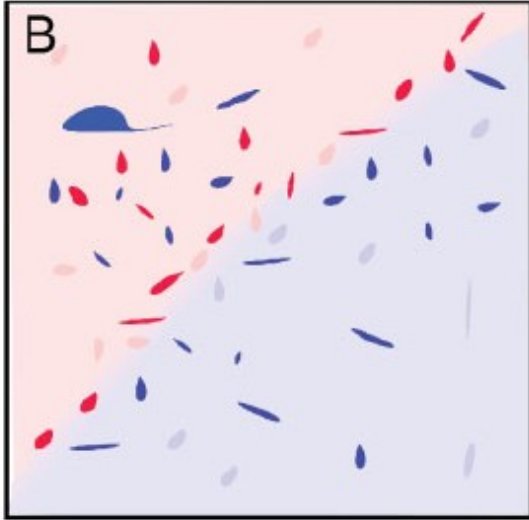
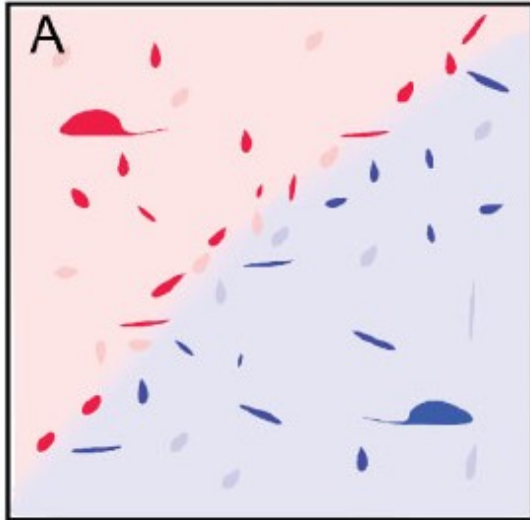




15cm



Urine streak presented as stimulus



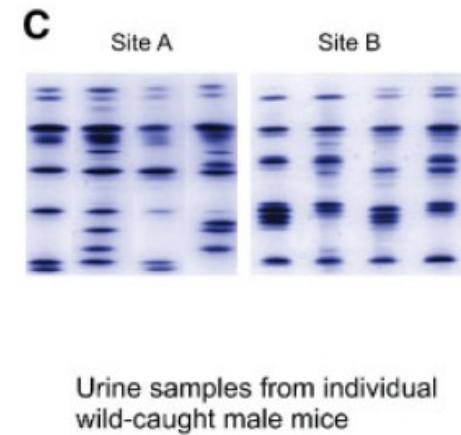
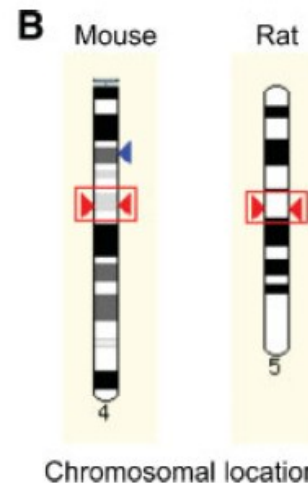
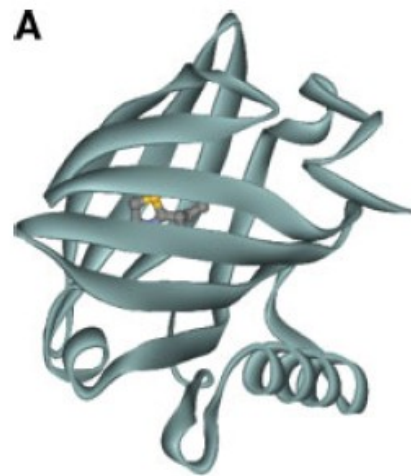
*Mus musculus*

Značení teritorií pachovými značkami (kapky moči)

Přeznačkování

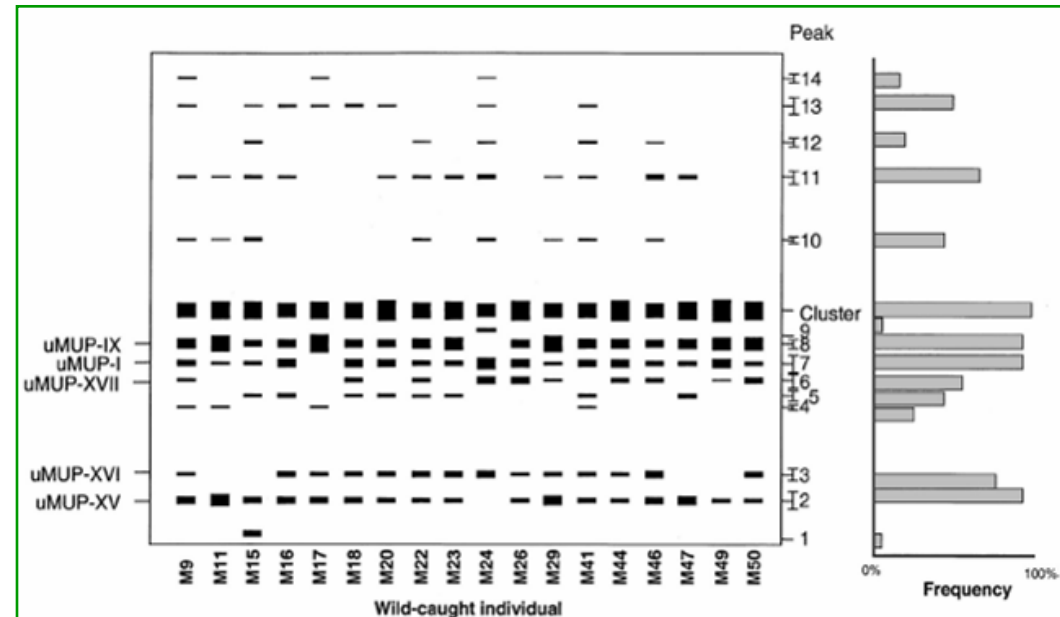
V moči proteiny vážící volatilní molekuly

# MUPs



## Major Urinary Proteins - komplex velmi podobných genů

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

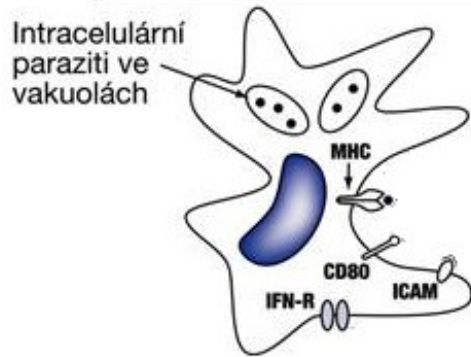


# Major histocompatibility complex (MHC)

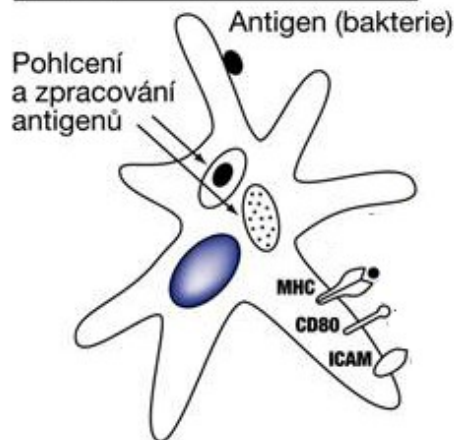
= adaptivní imunitní odpověď u čelistnatých obratlovců

# Antigen-specifická imunitní odpověď

## INFIKOVANÝ MAKROFÁG

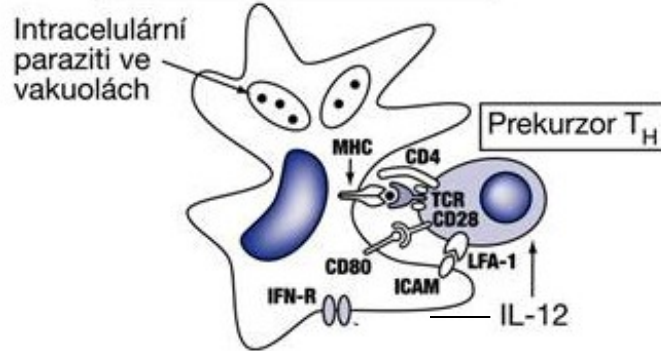


## APC (DENDRITICKÁ BUŇKA)

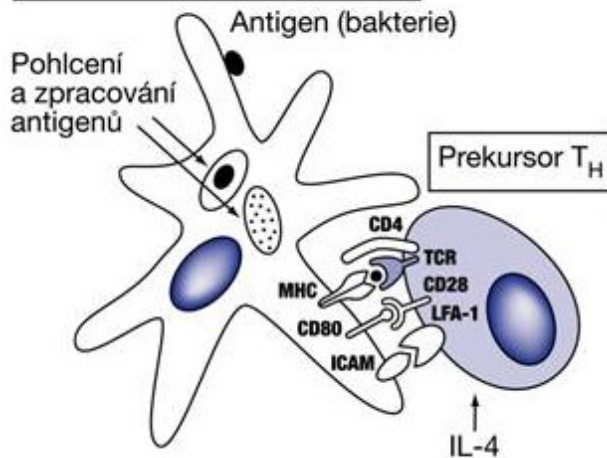


# Antigen-specifická imunitní odpověď

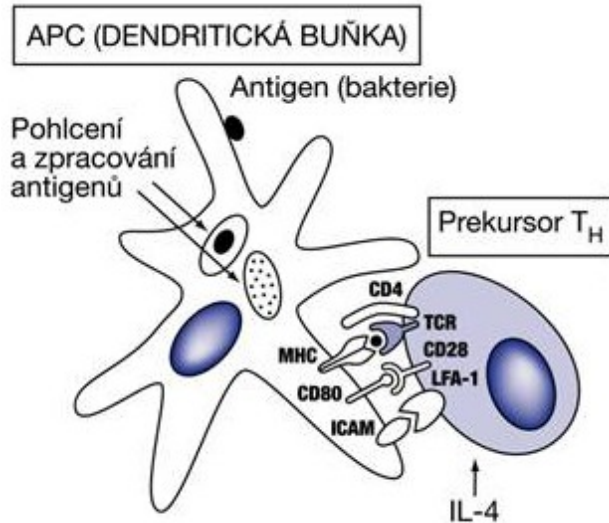
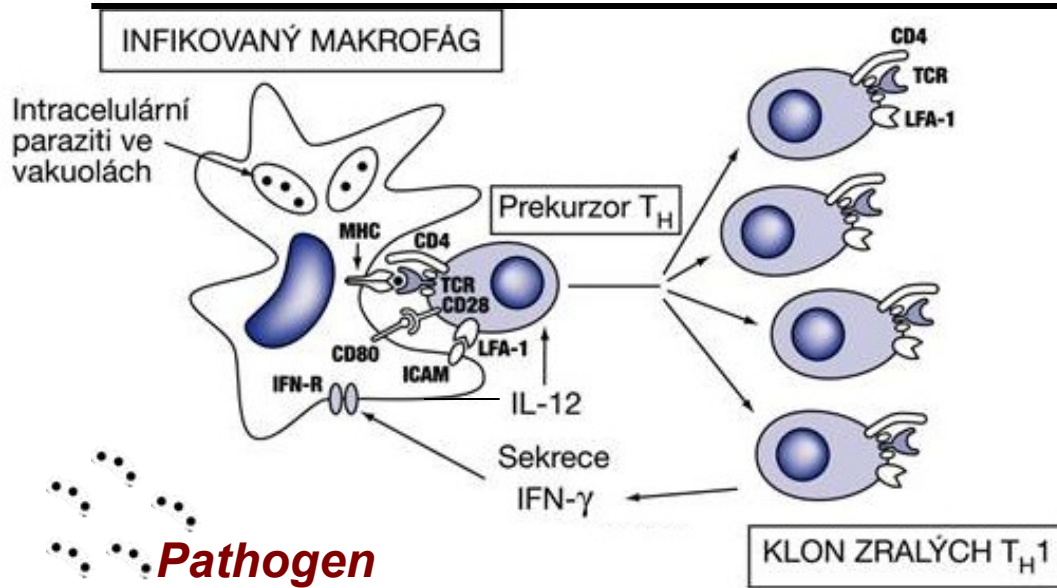
INFIKOVANÝ MAKROFÁG



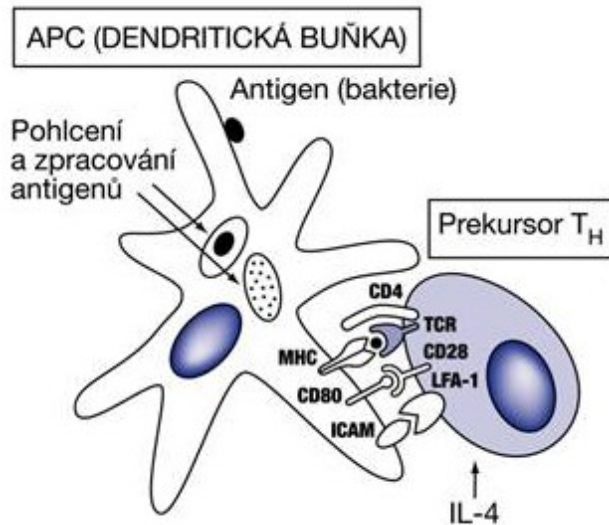
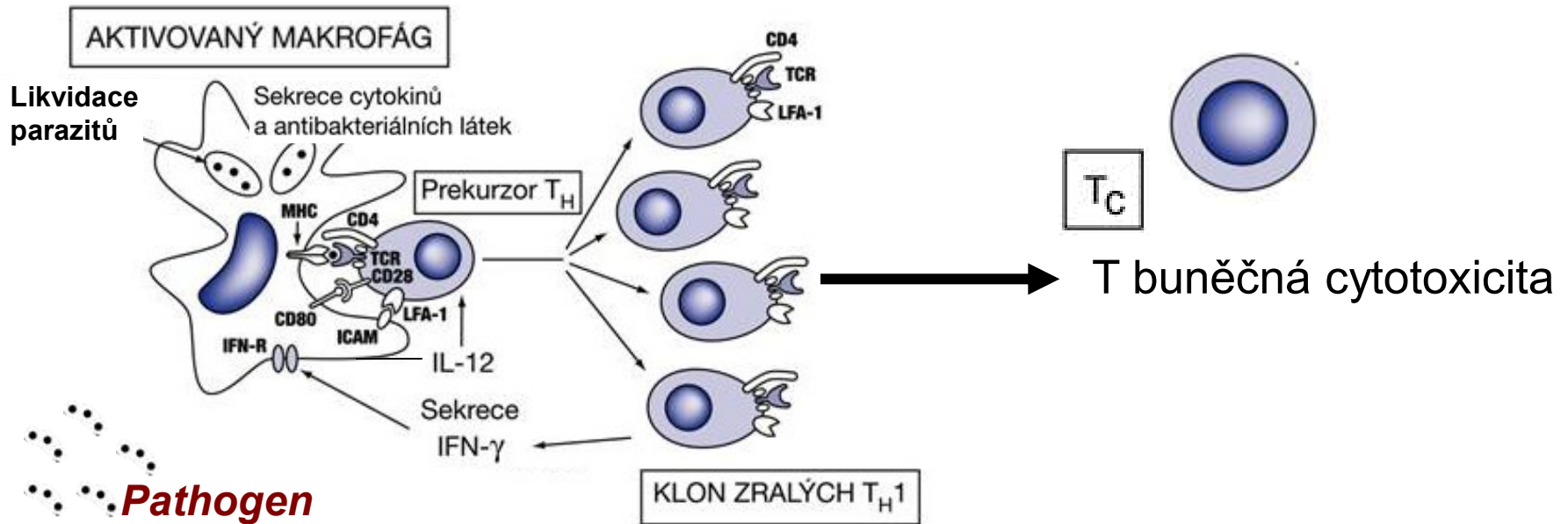
APC (DENDRITICKÁ BUŇKA)



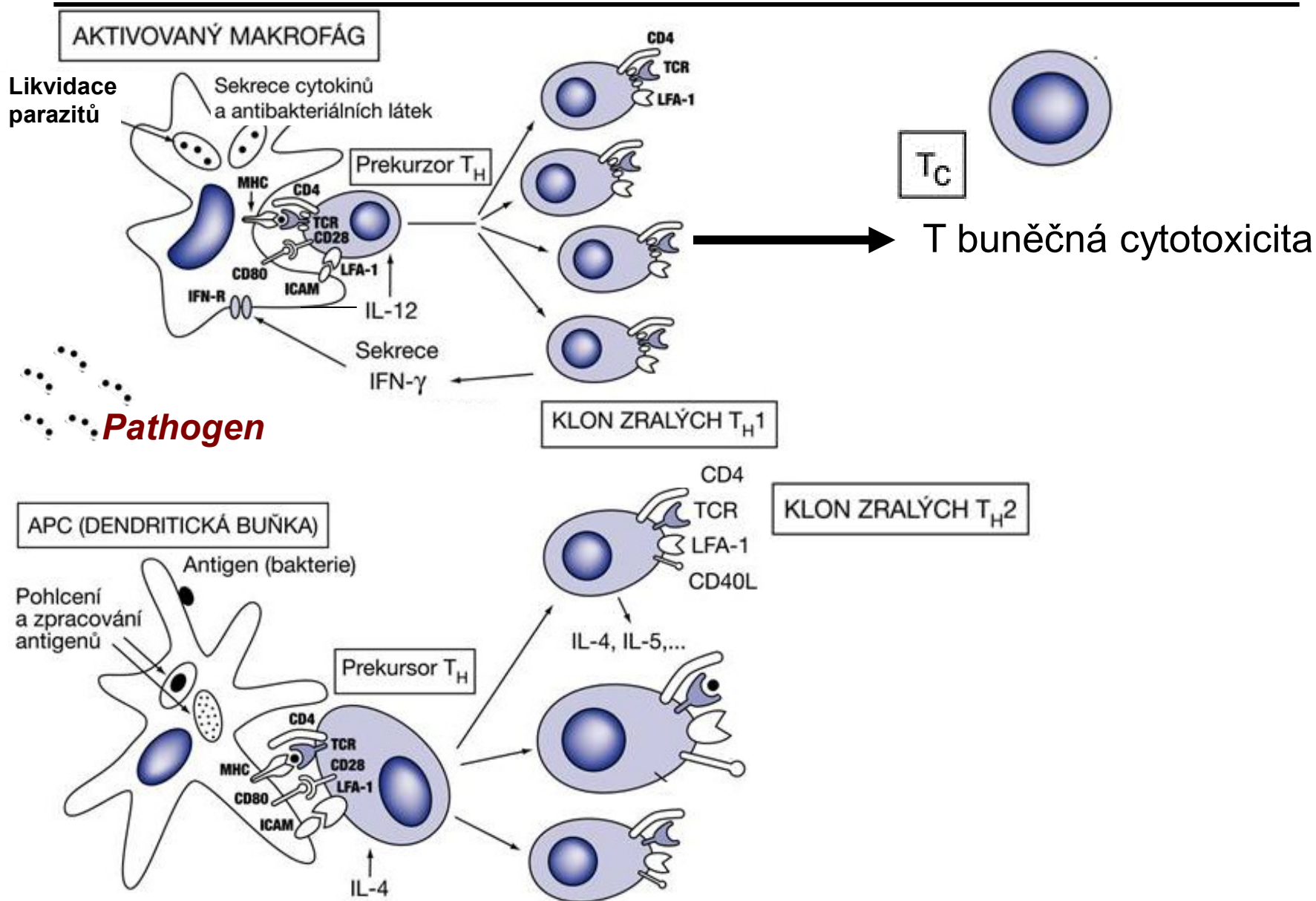
# Antigen-specifická imunitní odpověď



# Antigen-specifická imunitní odpověď

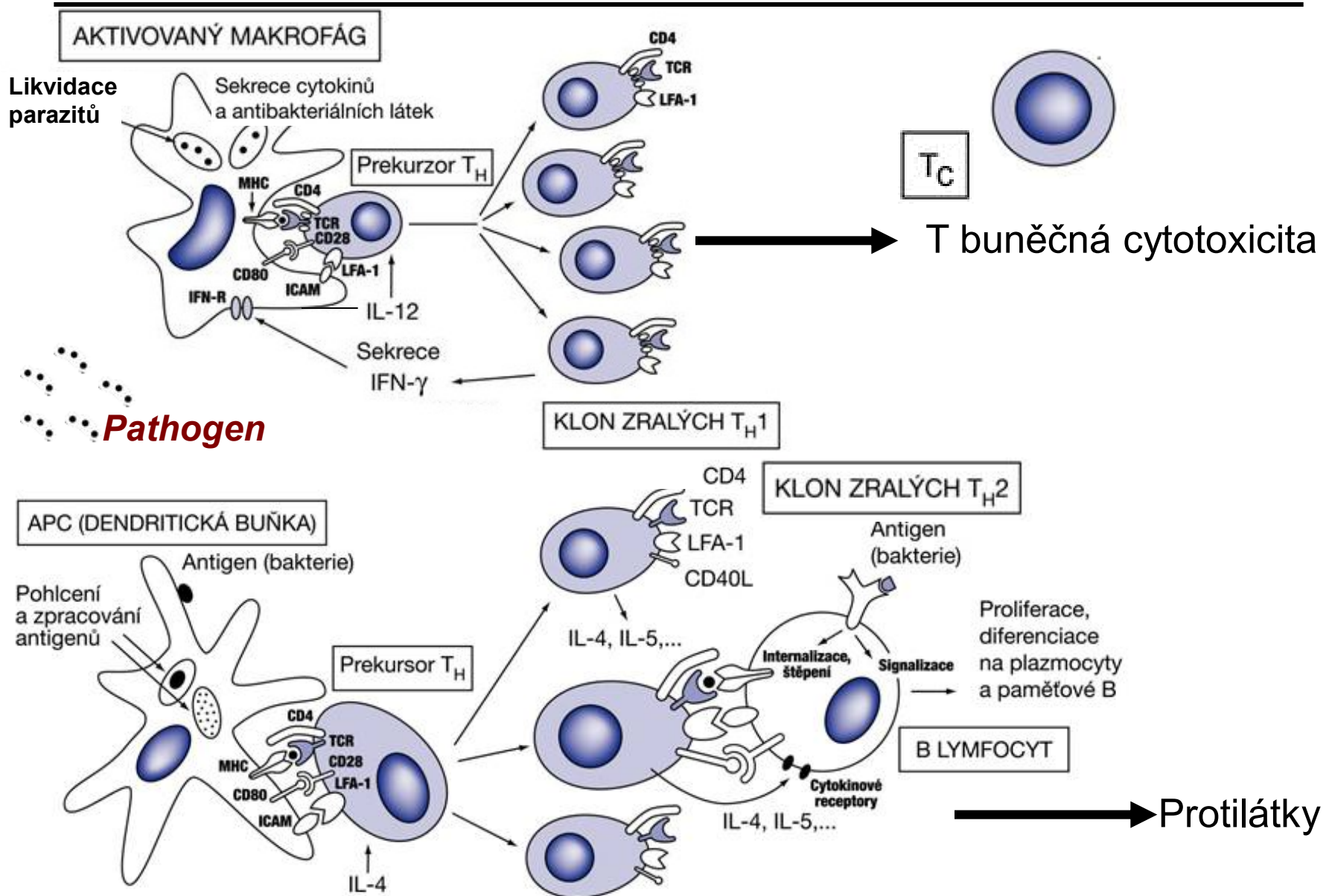


# Antigen-specifická imunitní odpověď

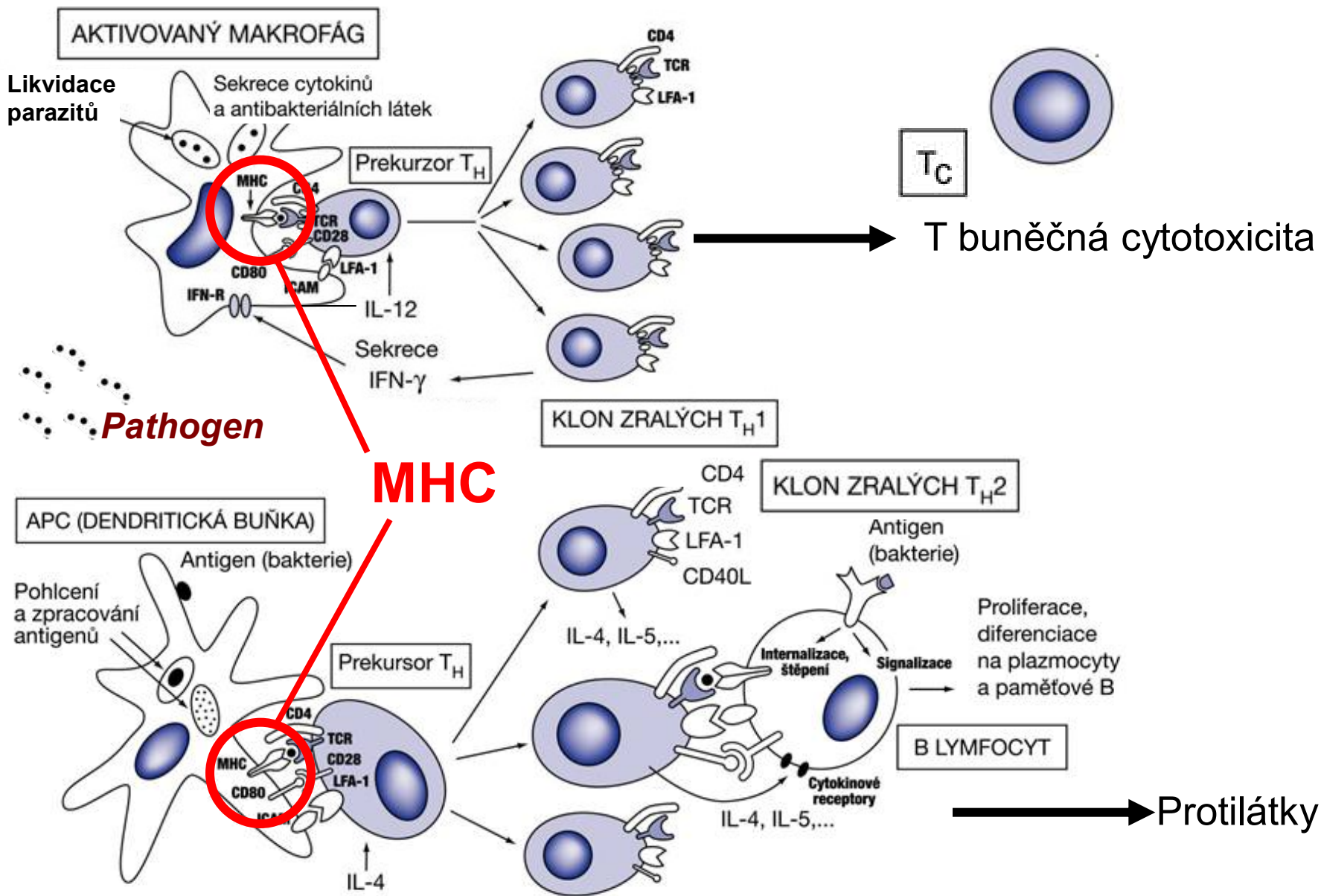




# Antigen-specifická imunitní odpověď

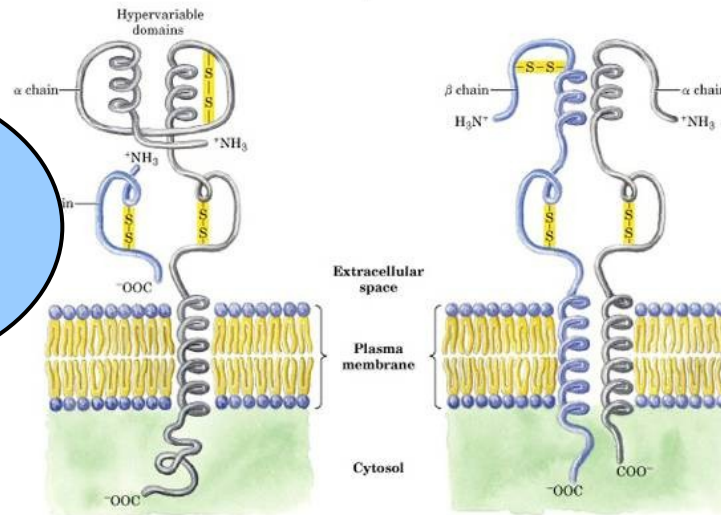


# Molekulární ekologie: Kdo a jak rozpozná parazita ?



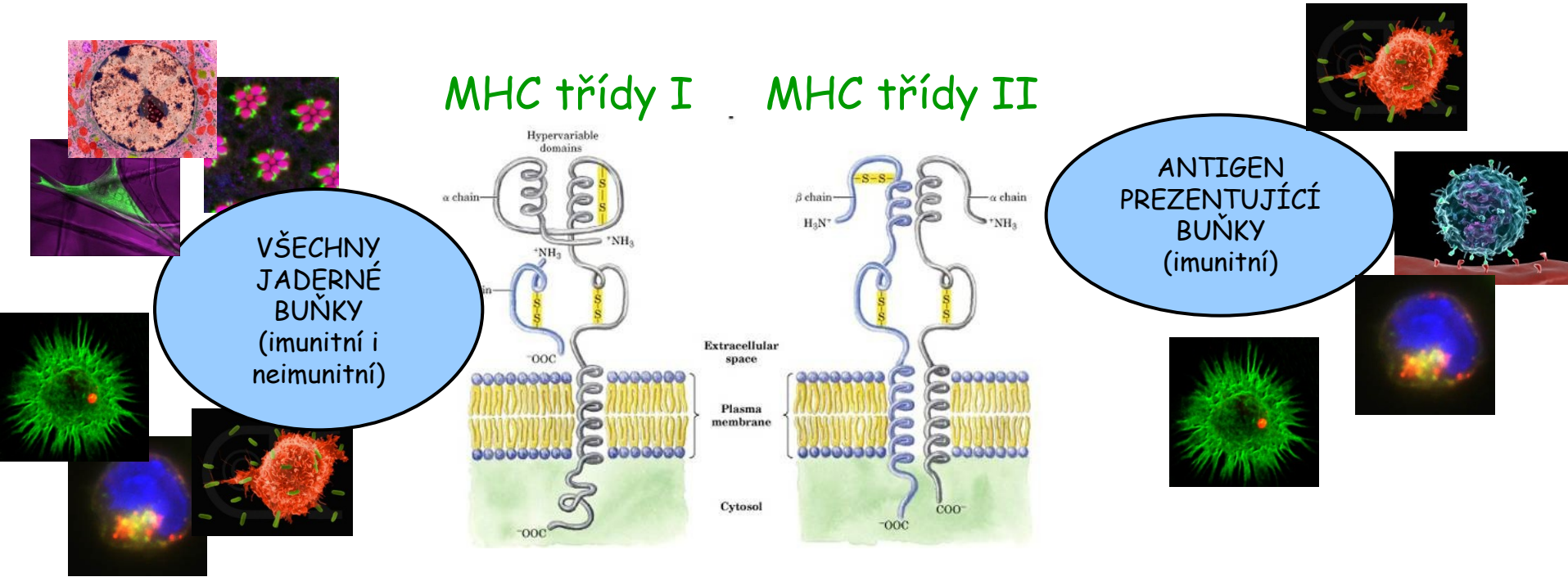
# Major histocompatibility complex (MHC)

## MHC třídy I      MHC třídy II



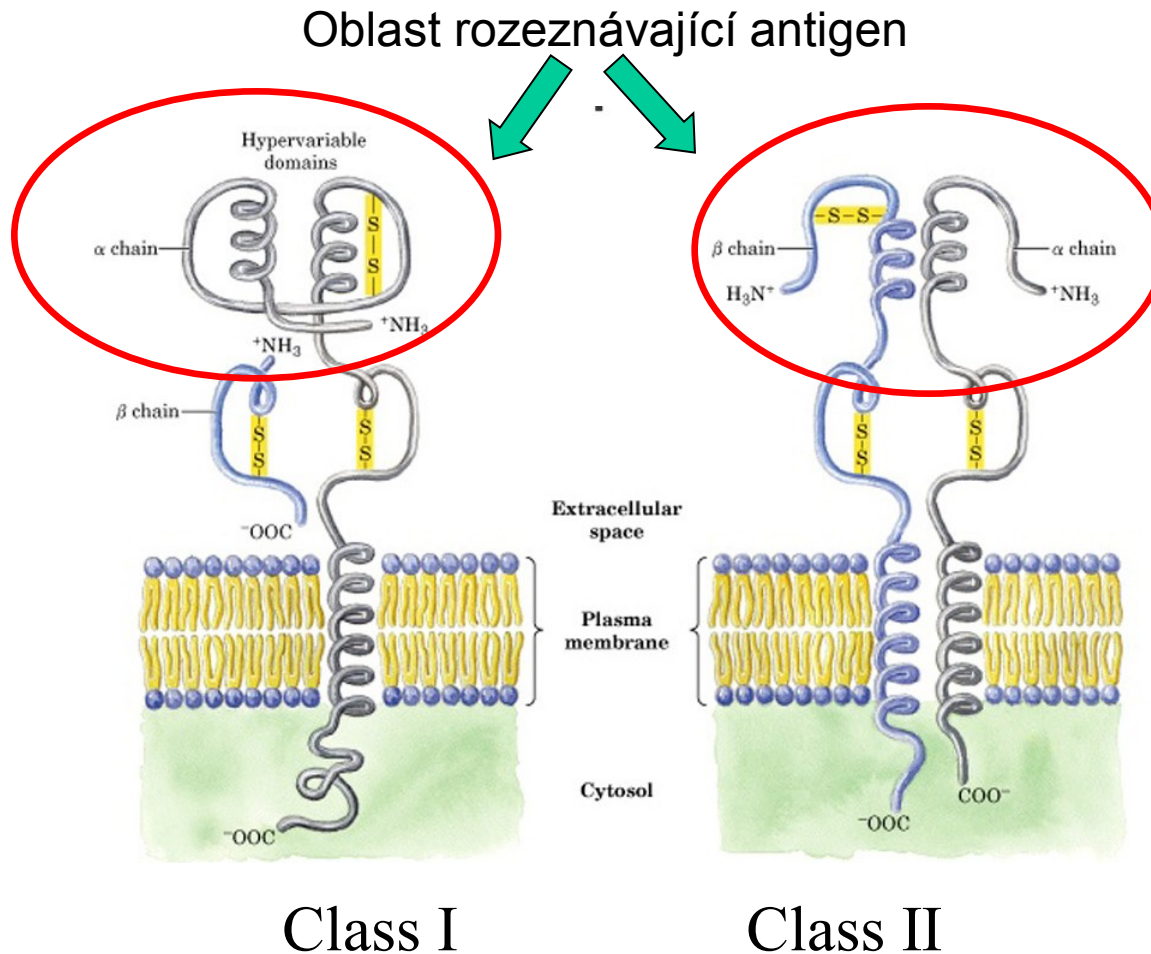
VŠECHNY  
JADERNÉ  
BUŇKY  
(imunitní i  
neimunitní)

ANTIGEN  
PREZENTUJÍCÍ  
BUŇKY  
(imunitní)

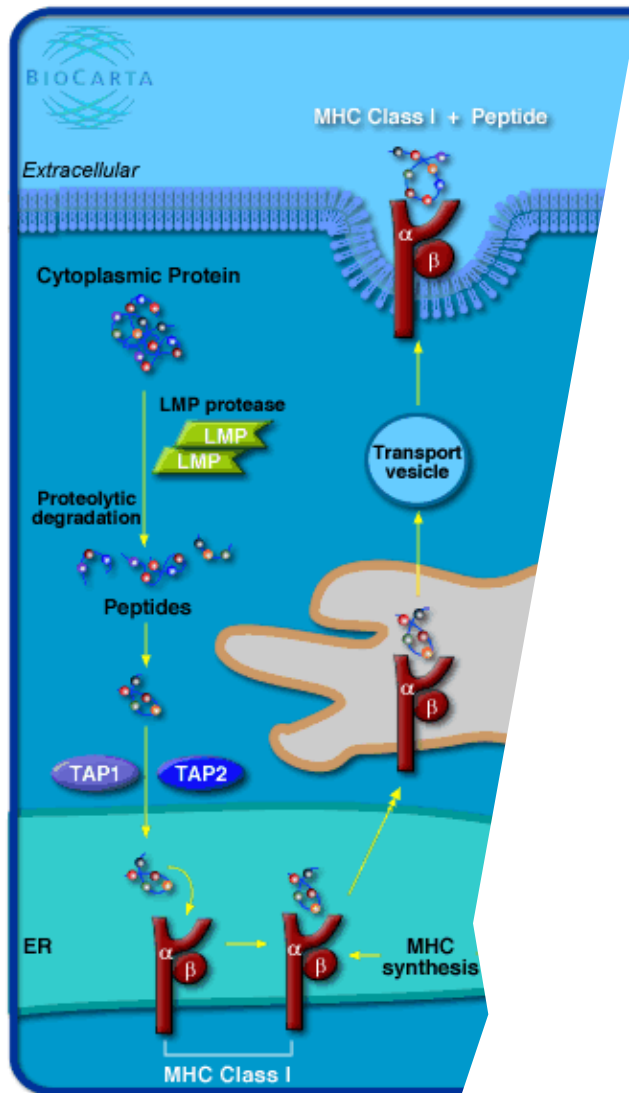


# Major histocompatibility complex (MHC)

---



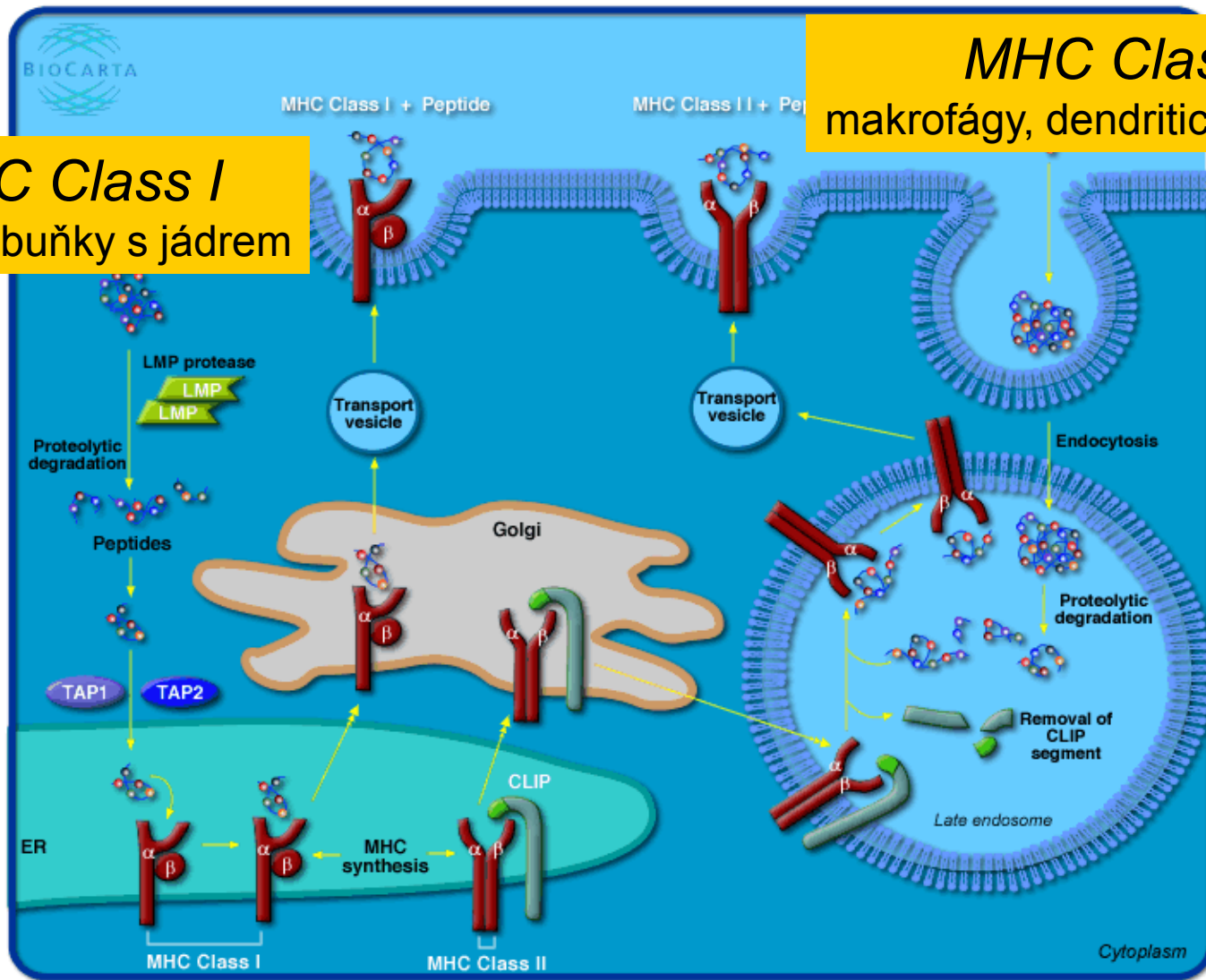
# *Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu*



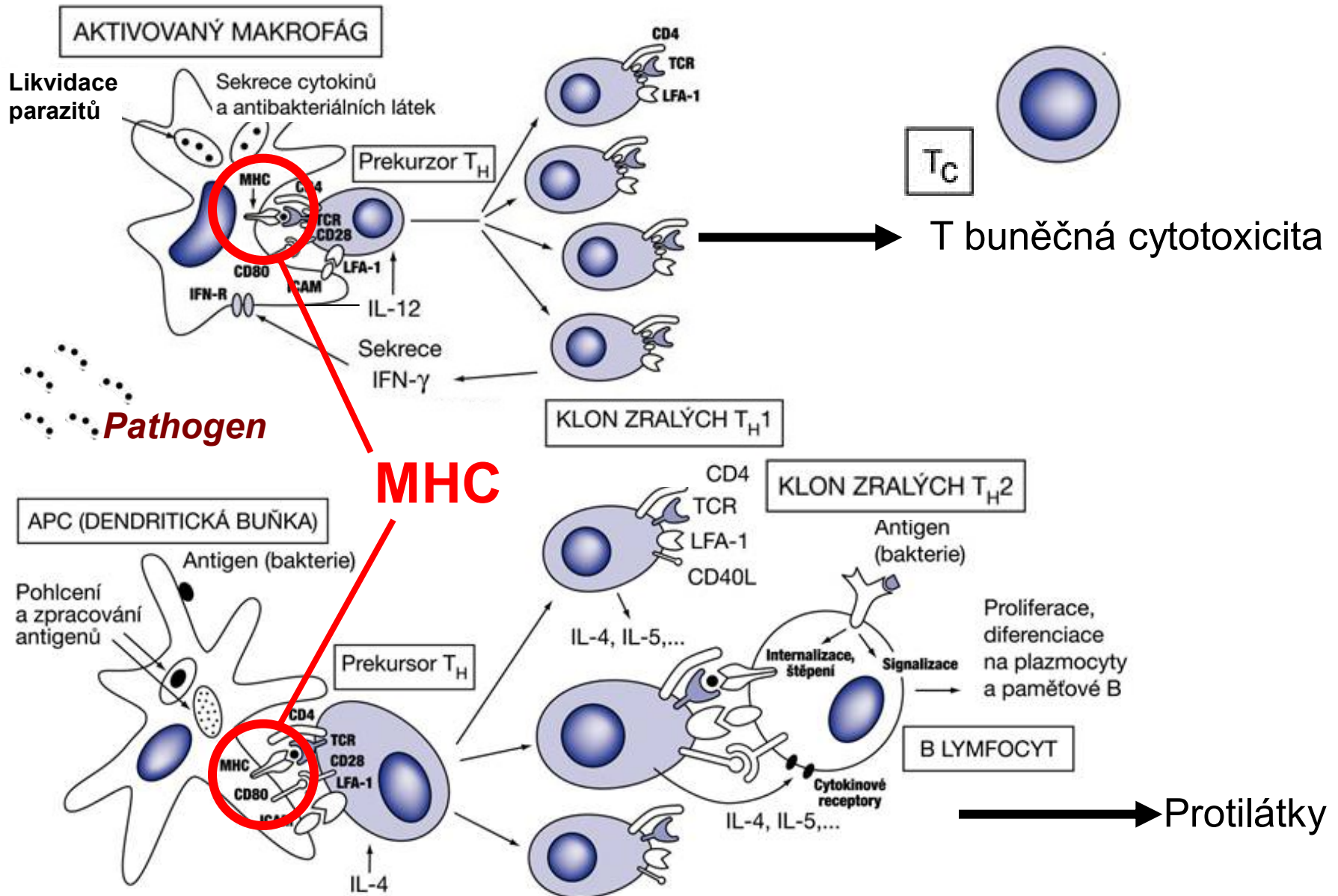
# Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu

**MHC Class I**  
všechny buňky s jádrem

**MHC Class II**  
makrofágy, dendritické buňky aj.



# Buňka nabízející antigen spustí imunitní odpověď

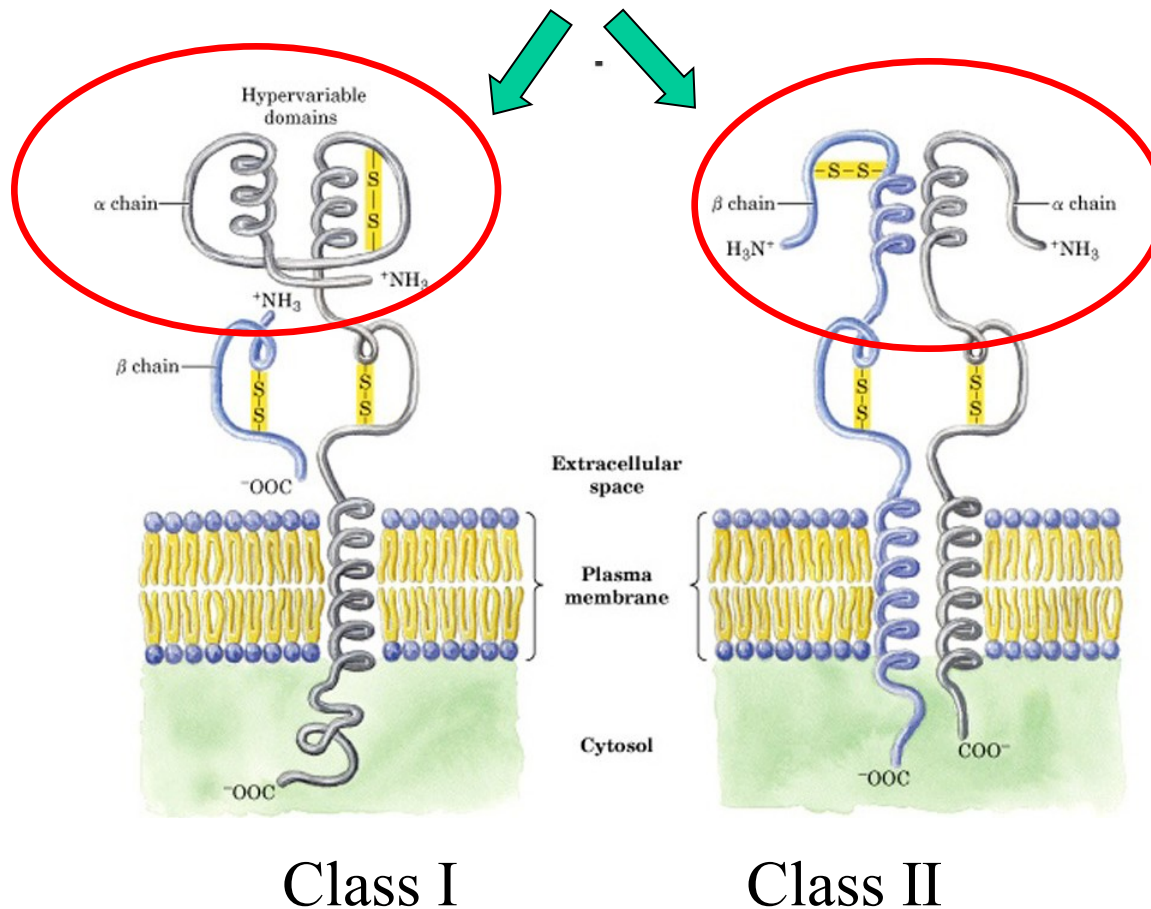


Jak zjistit, že je MHC pod selekcí?



# Major histocompatibility complex (MHC)

Oblast rozeznávající antigen (antigen-binding sites = ABS)



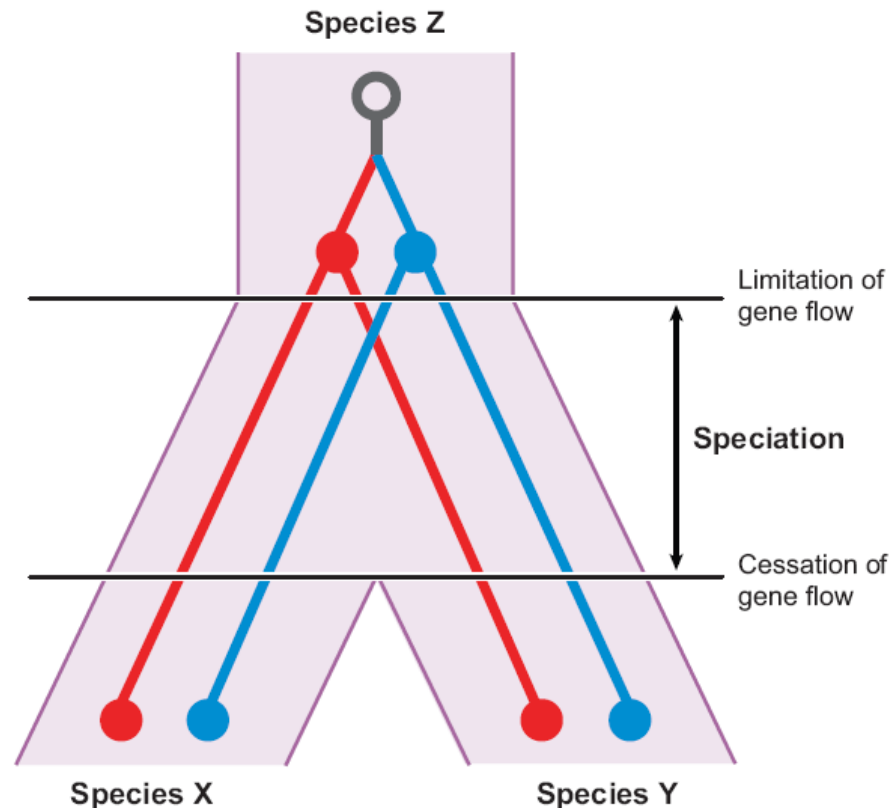
# *Je variabilita MHC důsledkem přírodního výběru?*

Pozitivní selekce - vytvoření a udržení velkého množství funkčních variant

Trans-species polymorfismus

- výhodné alelické linie  
přetrvávají i po oddělení druhů =  
detekce selekce fylogenetickou  
analýzou

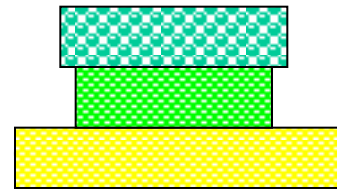
- „gene tree” vs. „species tree”



# Fylogenetická analýza MHC sekvencí



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



*Mus*

*Rattus*

# Pozitivní historická selekce na MHC Class II

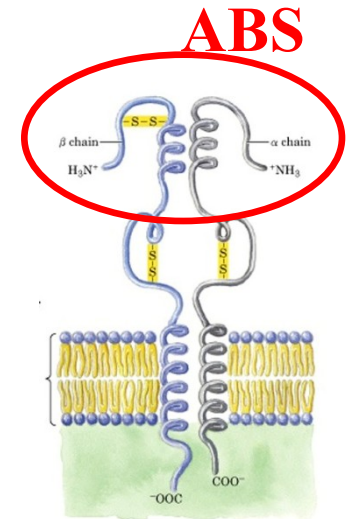
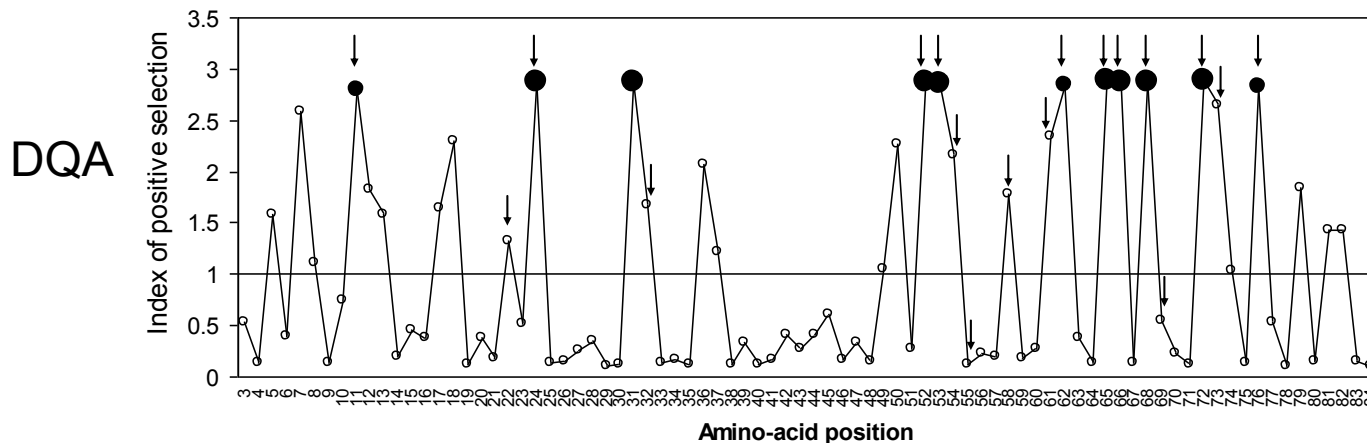
špatně určená pozice ABS (?)

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



dN/dS	ABS	Non ABS
DRB	5.25	3.00
DQA	3.16	0.33

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



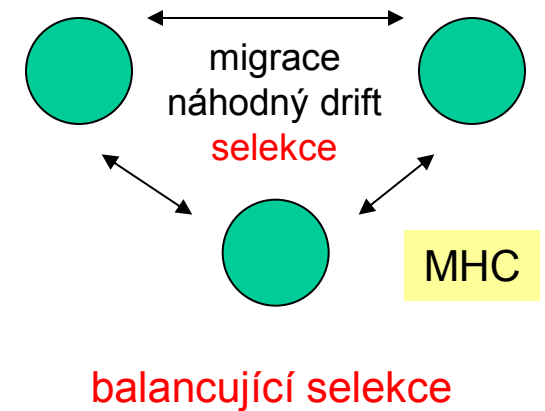
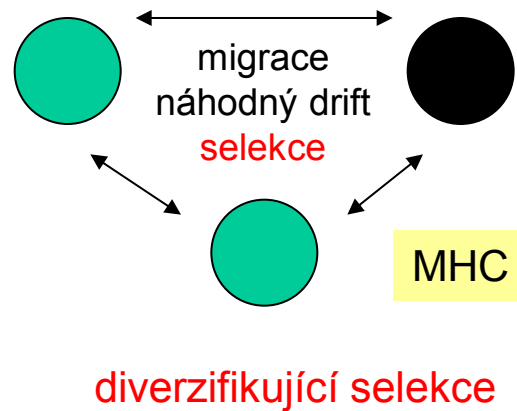
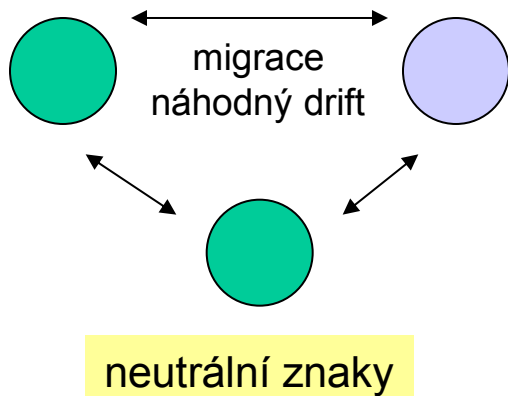
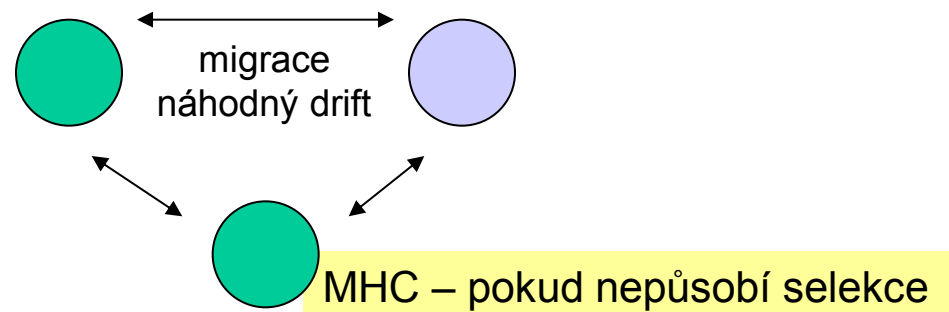
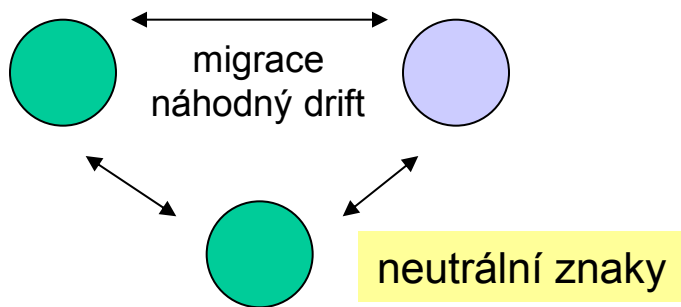
Šipky ukazují ABS místa identifikovaná na základě krystalografického modelu DQA proteinu u myši

# 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)

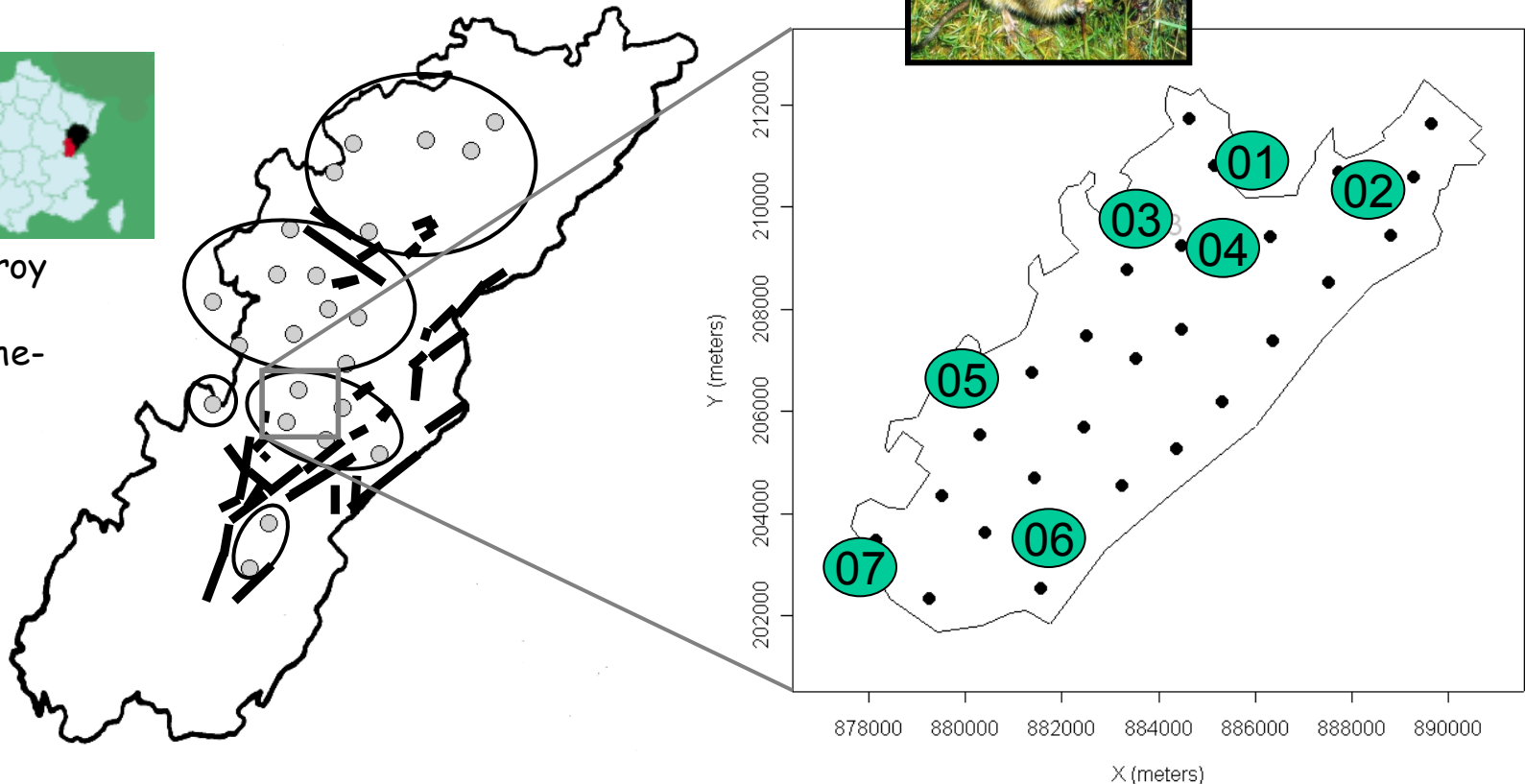


# Důkaz přírodního výběru v současnosti: analýza populačně-genetické struktury

- Srovnání neutrálních znaků a MHC

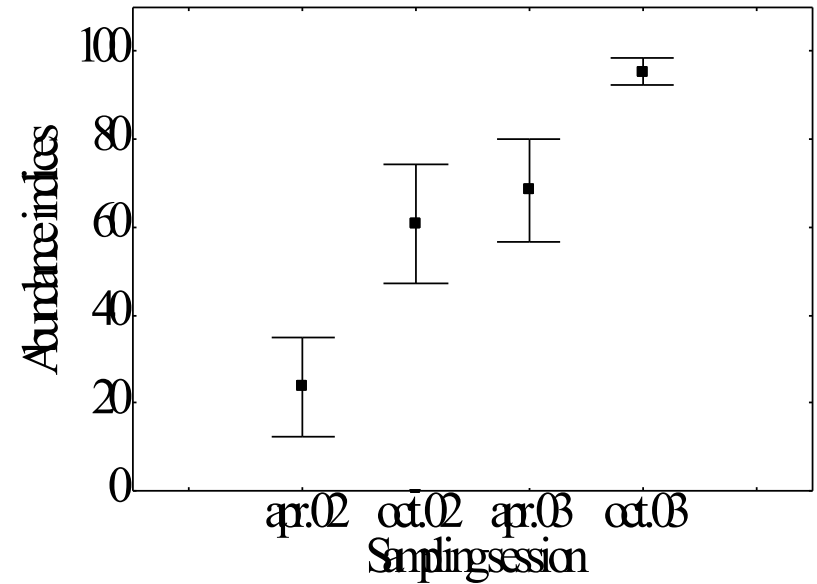
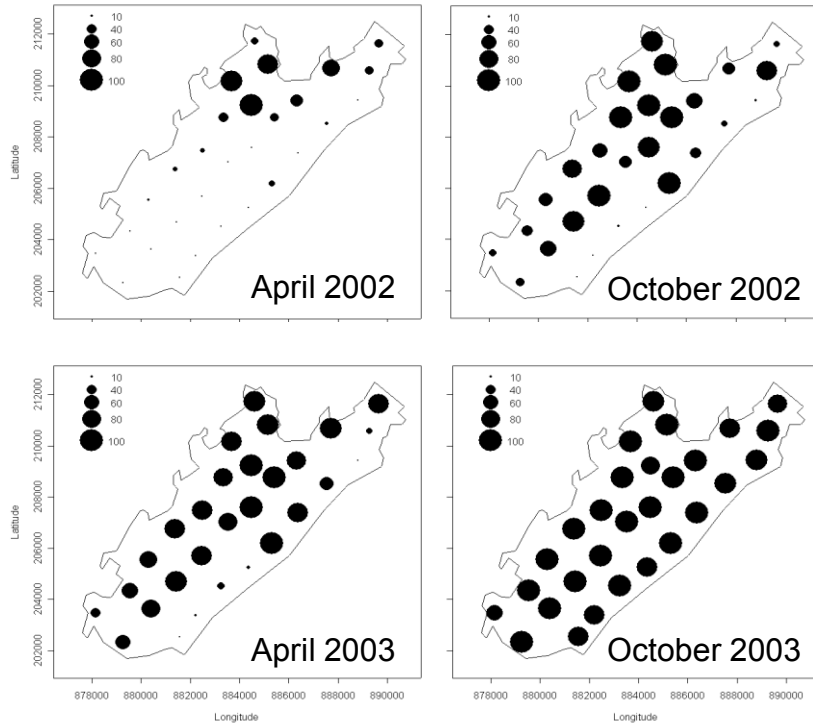


Canton Nozeroy  
(pohoří Jura,  
région Franche-  
Comté)



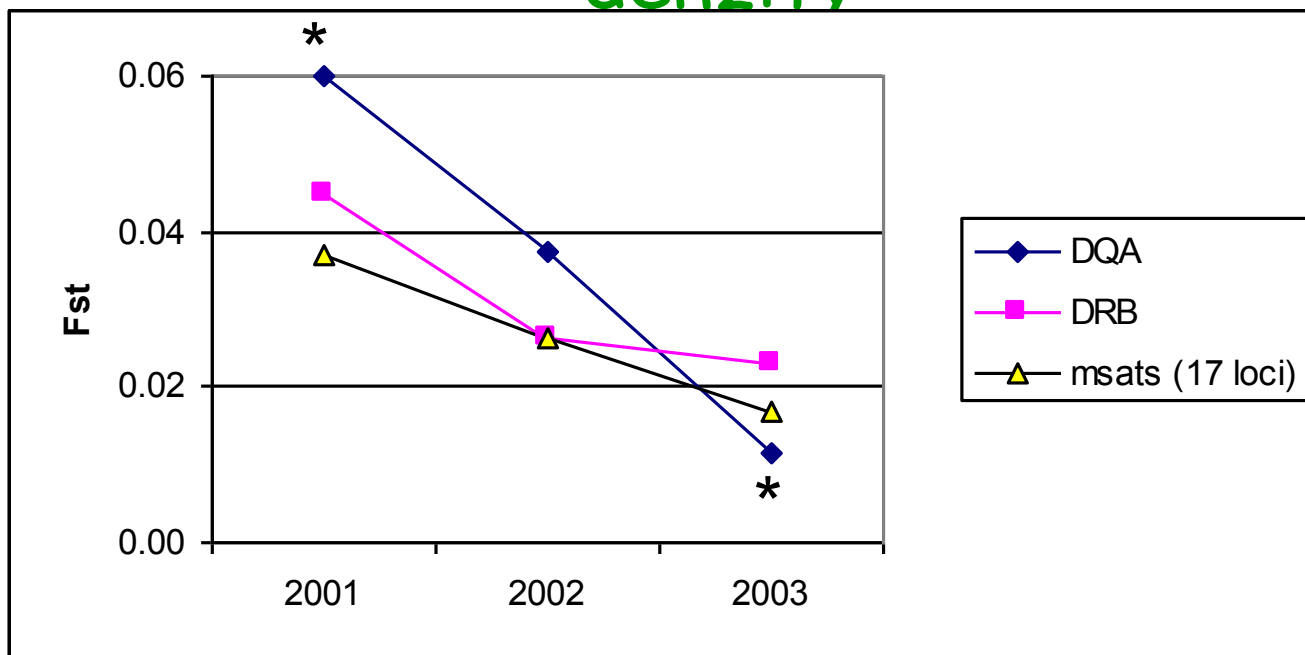
Studované lokality - 7 populací ve  
stejně fázi populačního cyklu

# → 2001-2003: fáze růstu populační hustoty





# Diferenciace populací v průběhu růstu denzity



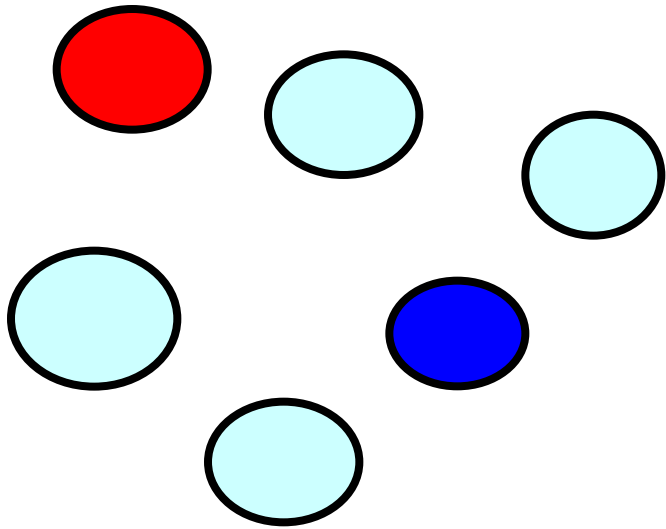
\* Signifikantní rozdíl DQA1 vs. mikrosatelity

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

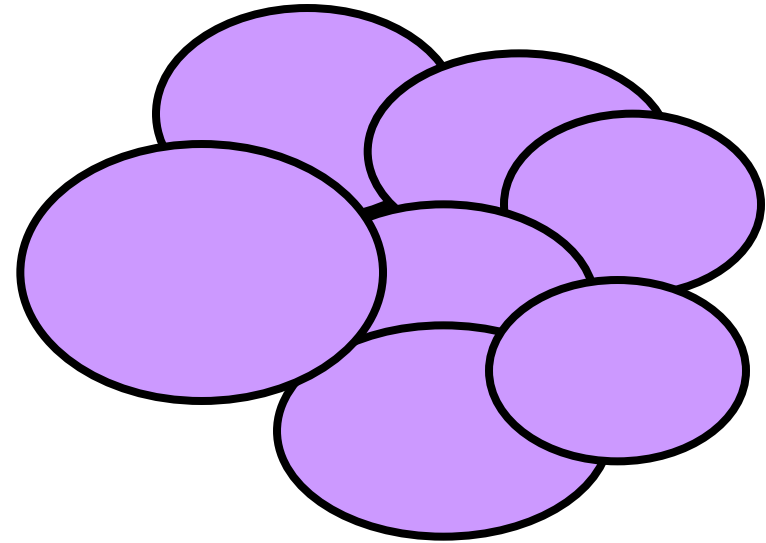
---



**Nízká denzita**

Lokální rozdíly ve  
společenstvech patogenů

**Lokální diverzifikující  
selekce**



**Vysoká denzita**

Nárůst diverzity  
parazitů v důsledku  
disperze

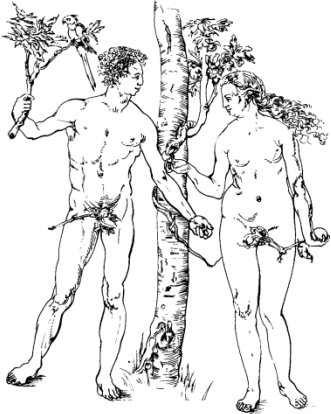
**Balancující selekce**

*Jaké jsou mechanismy přírodního výběru pro udržení vysoké variability MHC?*

---

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

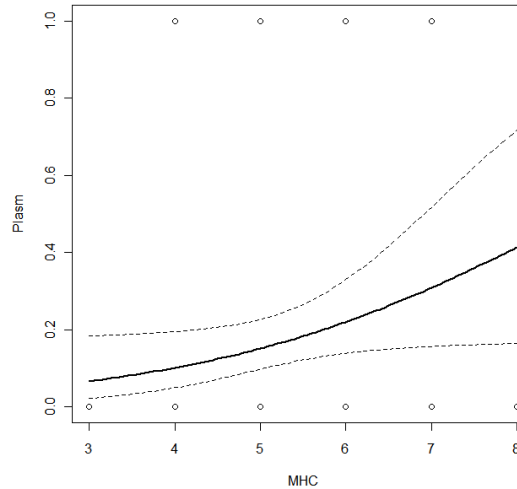
# Výhoda heterozygotů - mají 2x více alel než homozygoti, tj. mohou rozeznávat 2x více patogenů



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



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

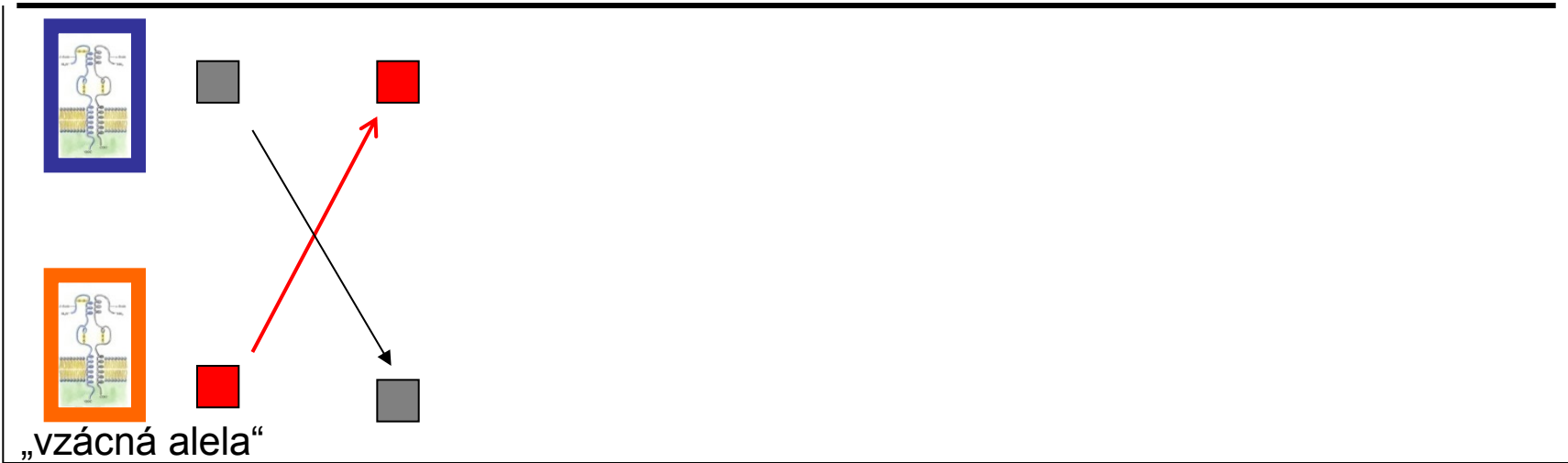
# *Výhoda vzácné (výhodné) alely*

---

- 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“

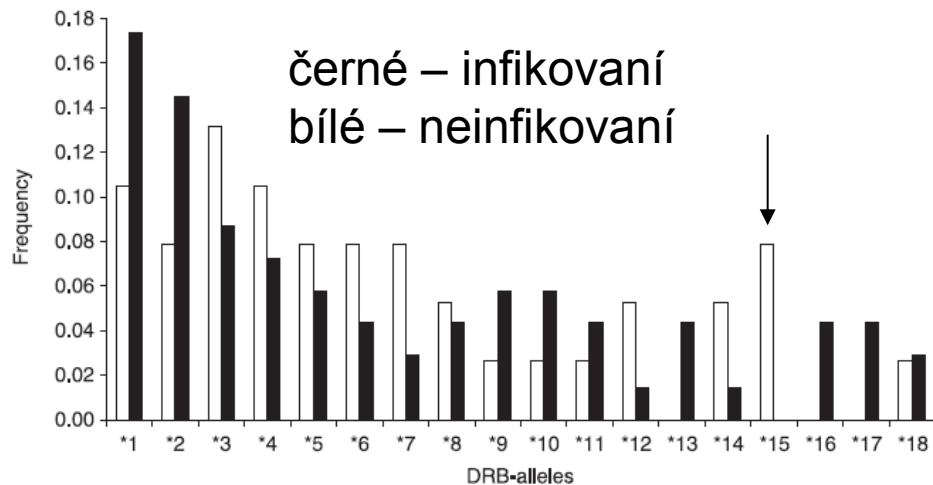
- Nutno prokázat, že skutečně dochází k časovým změnám ve frekvenci alel a parazitů - **dlouhodobé studie neexistují !!!**

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)



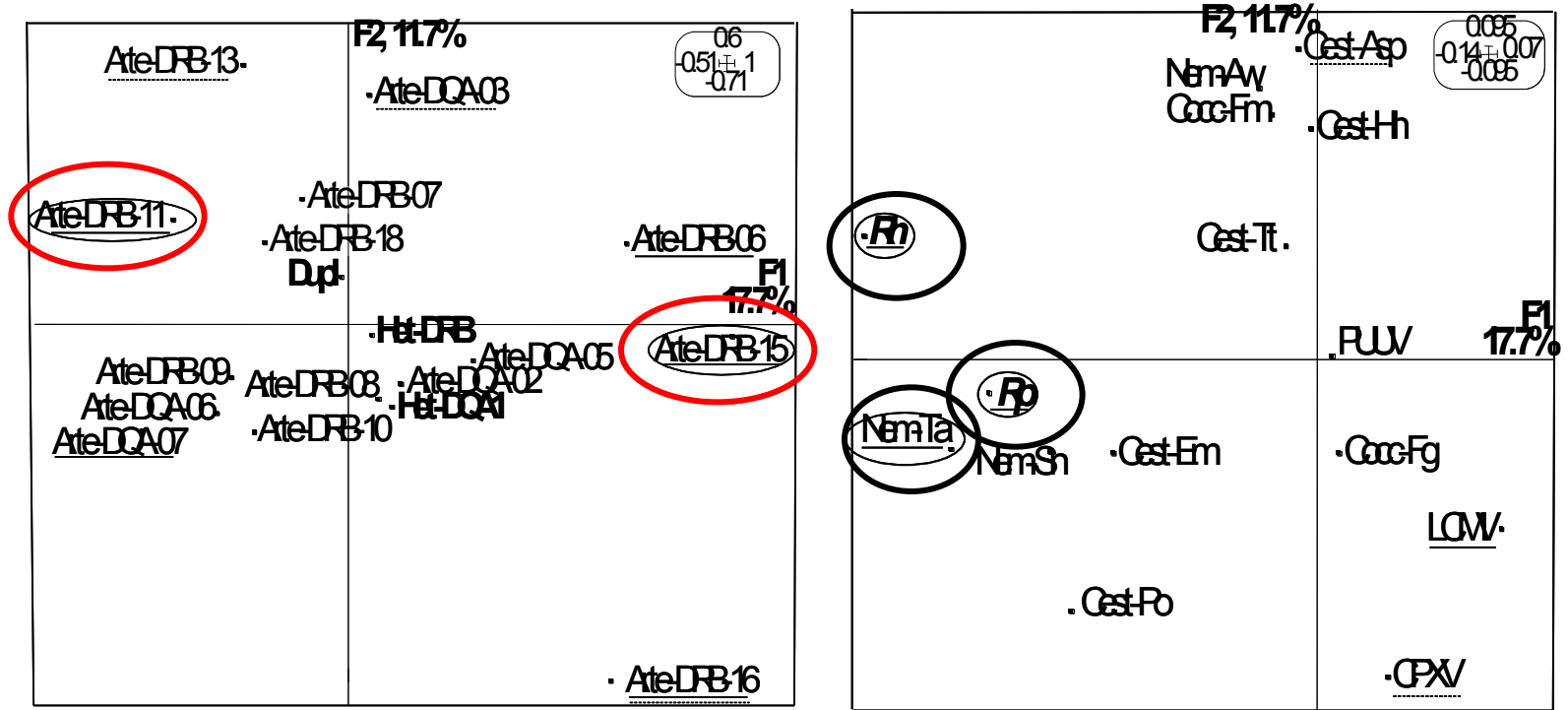
*Apodemus flavicollis*  
(Meyer-Lucht & Sommer, Mol. Ecol. 2005 )

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

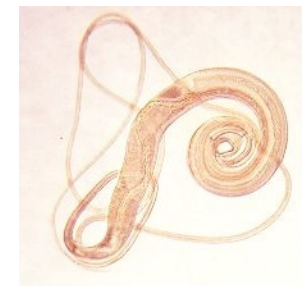




# Analýza koinercie (co-inertia analysis)



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