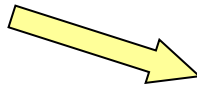
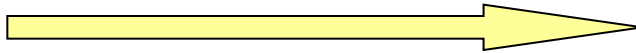
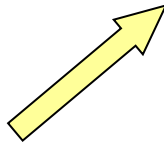


Exprimované geny a přírodní selekce

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



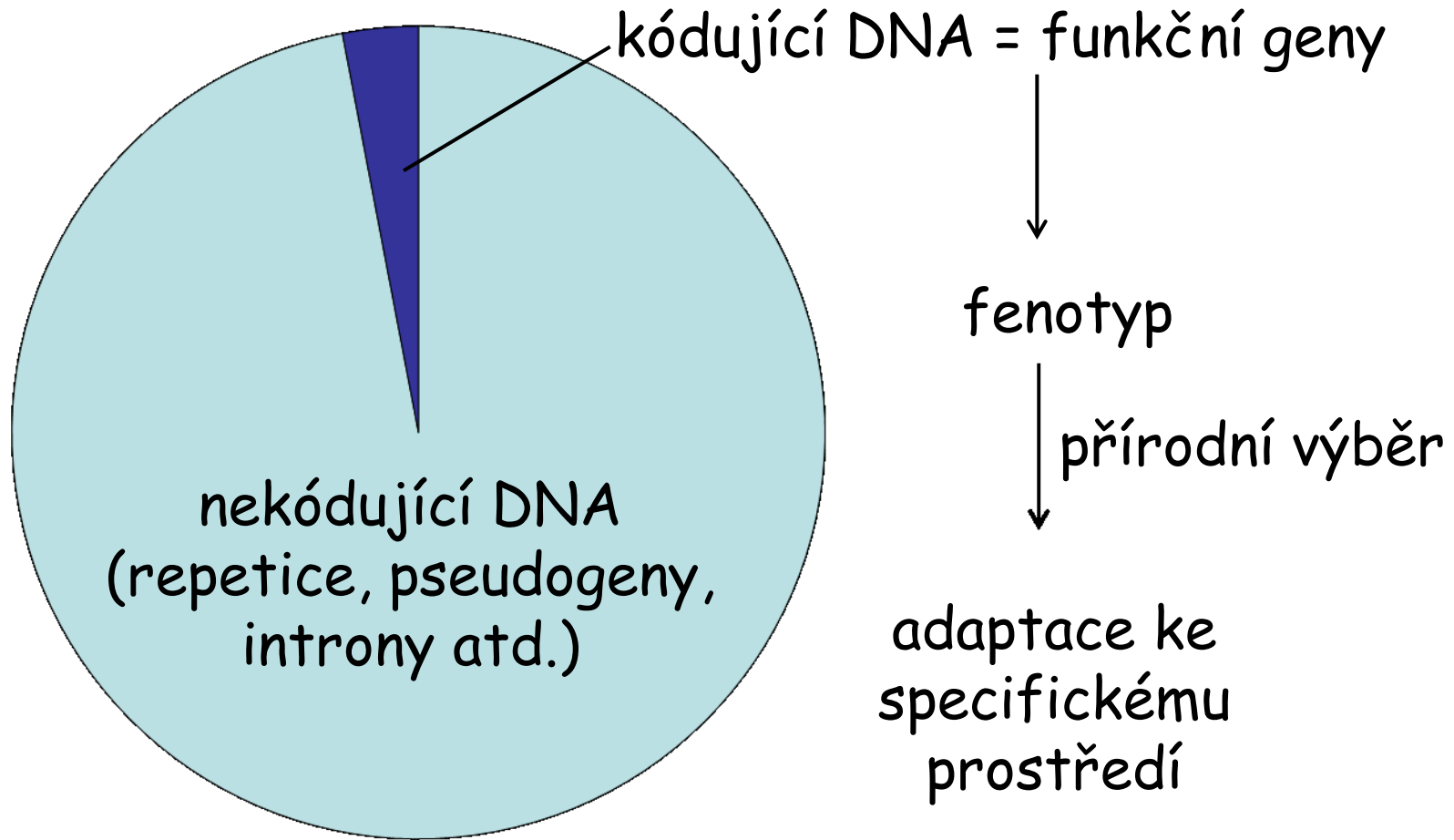
Proč geny v molekulární ekologii?

- 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
- **proximátní 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“

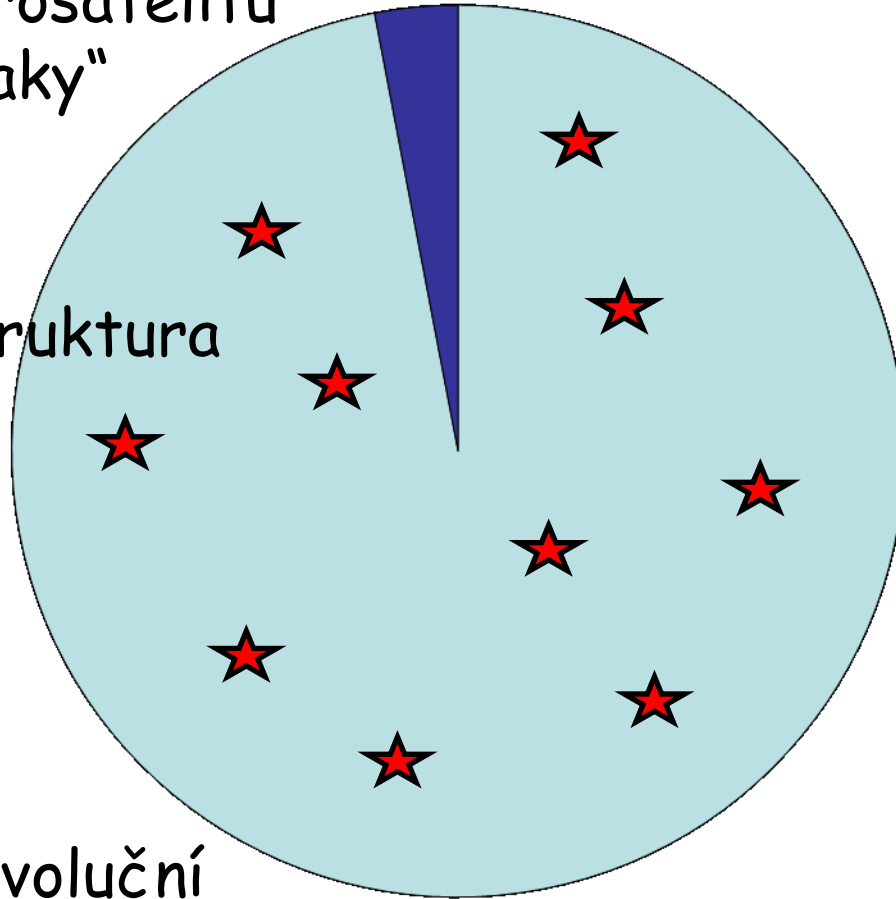
✓ populačně-
genetická struktura

✓ inbreeding

✓ bottleneck

✗ adaptace

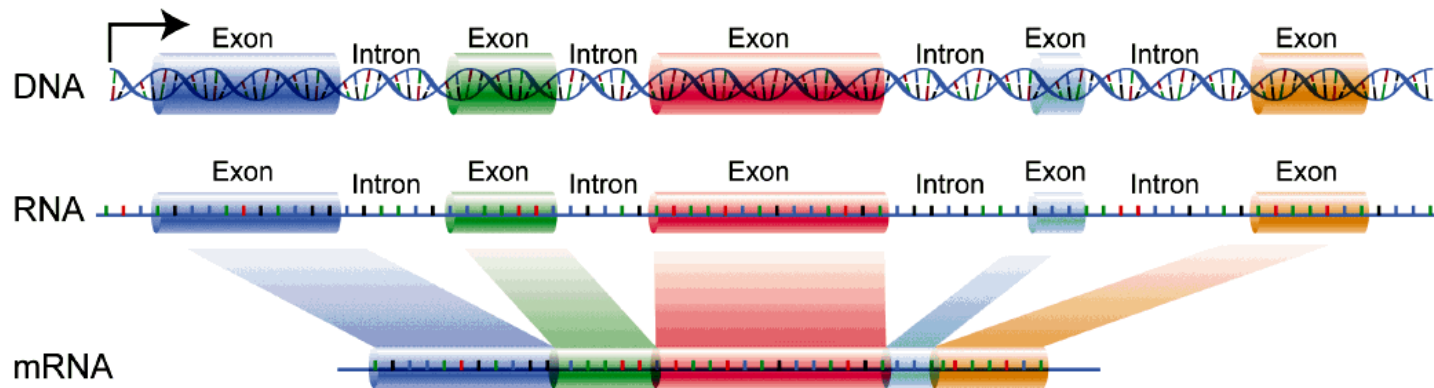
✗ proximální evoluční
mechanismy



↓
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

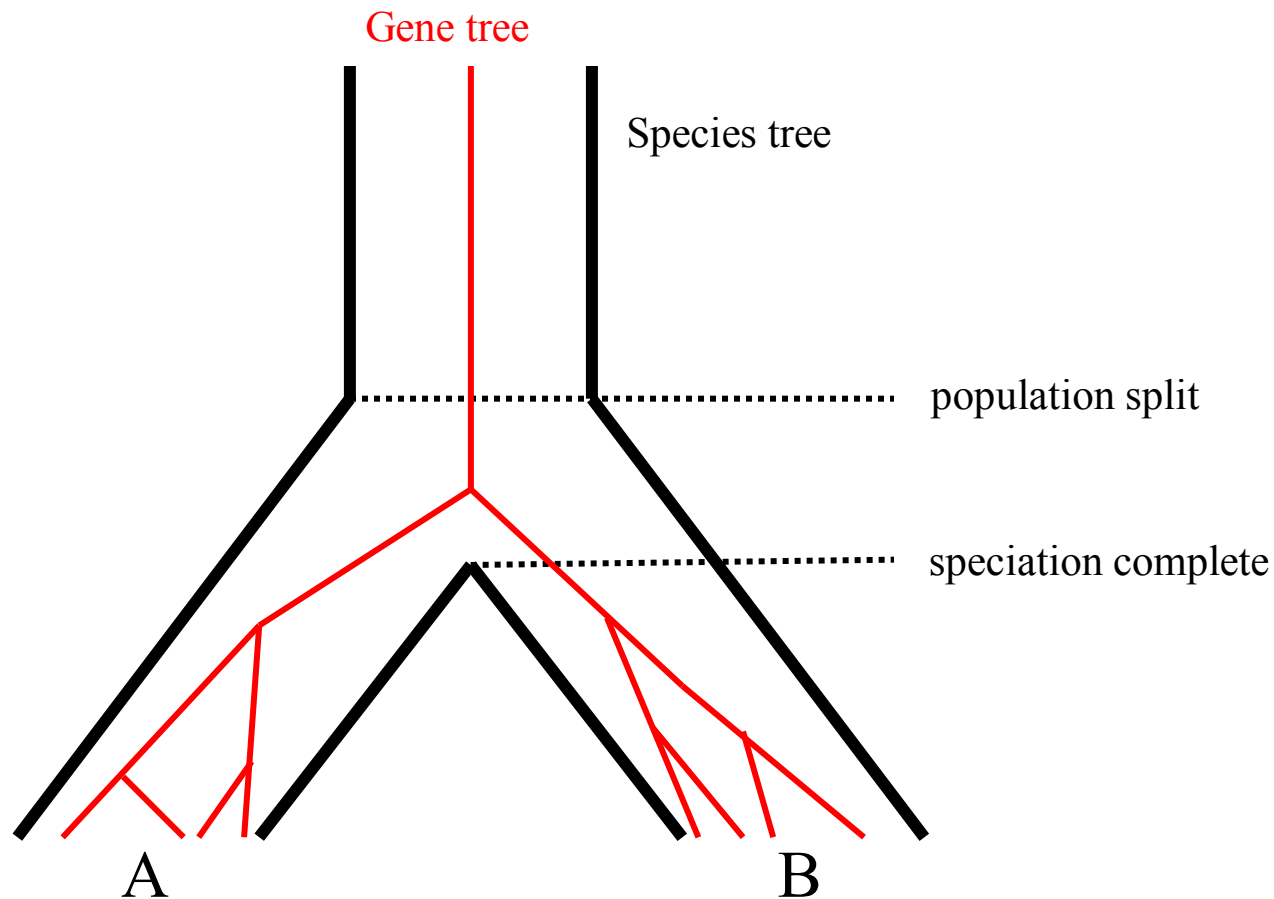
GCT	➔	Alanine
GCA	➔	Alanine
GCC	➔	Alanine
GCG	➔	Alanine
CCT	➔	Proline
GGA	➔	Glycine

→ 3rd position evolves neutrally

→ 1st and 2nd position under selection

Jak poznat, že na daný gen působí selekce?

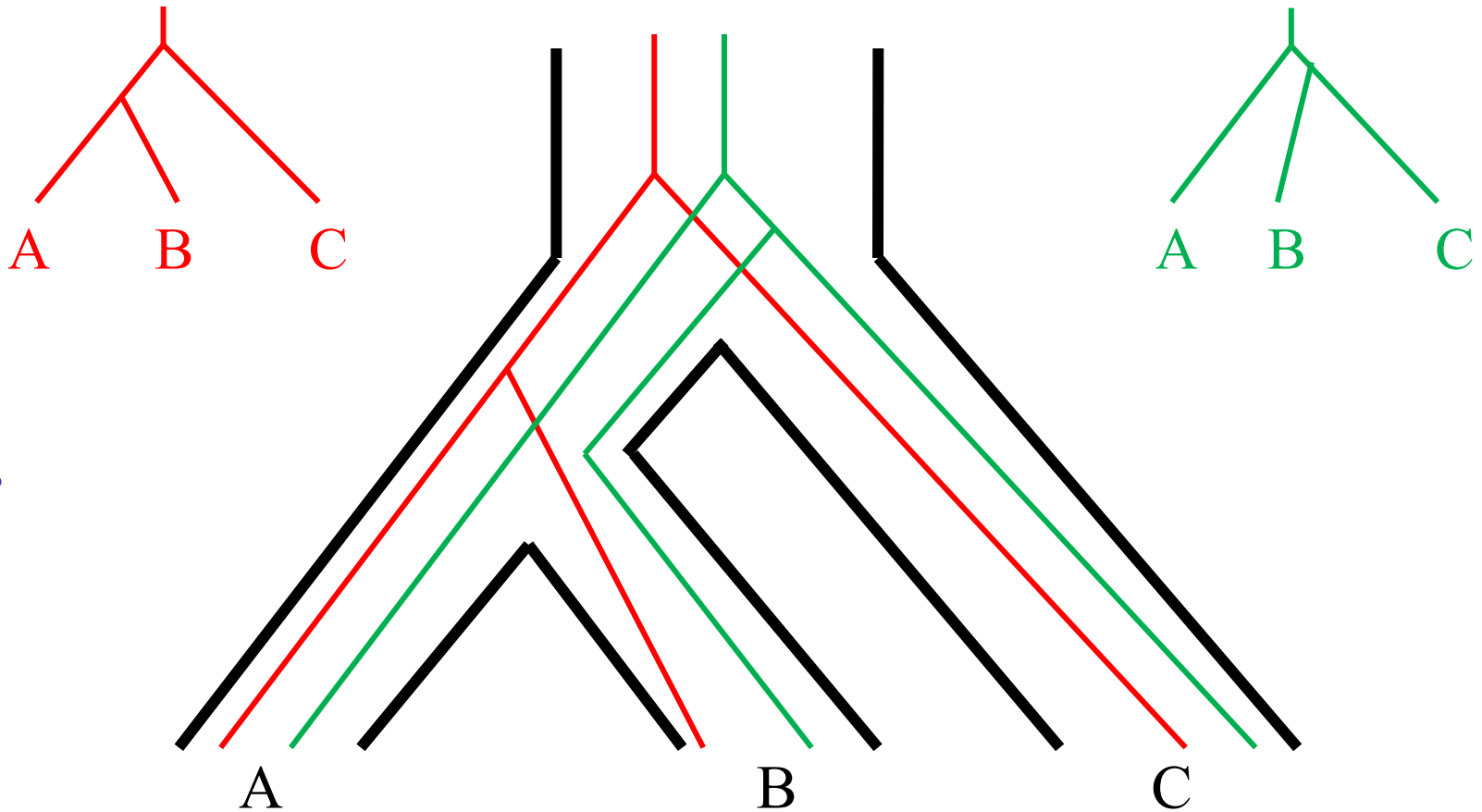
- Gene-tree versus species tree



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

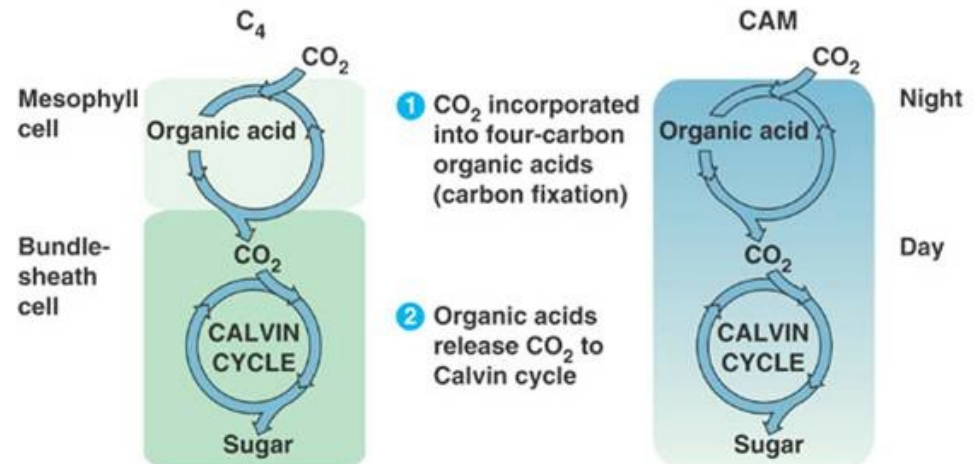
- Christin et al. 2007, Curr Biol
- *PEPC* gene
- →C4 photosynthesis



Sugarcane

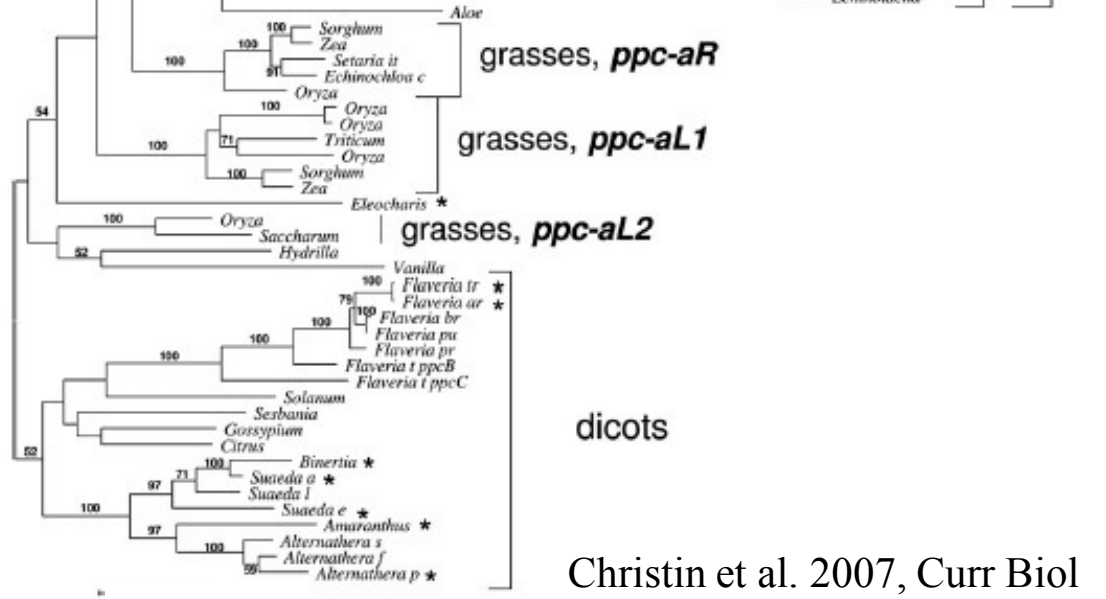
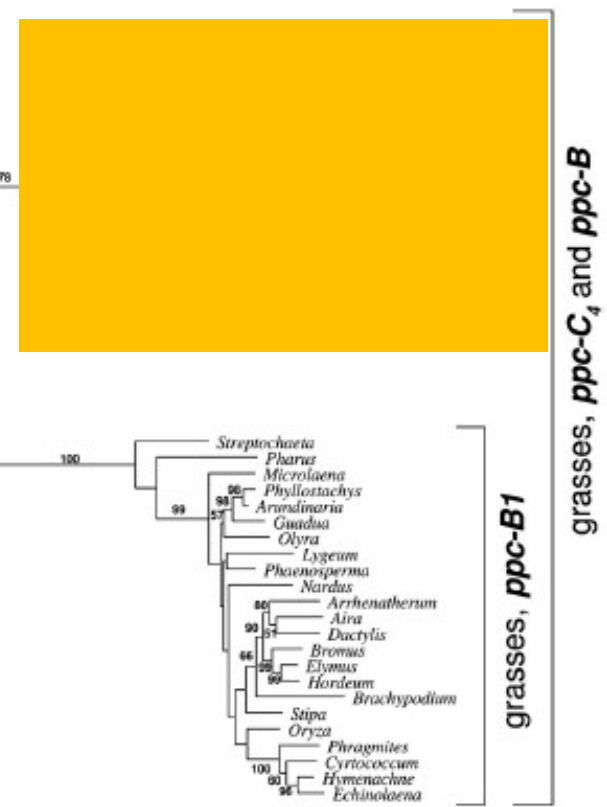


Pineapple

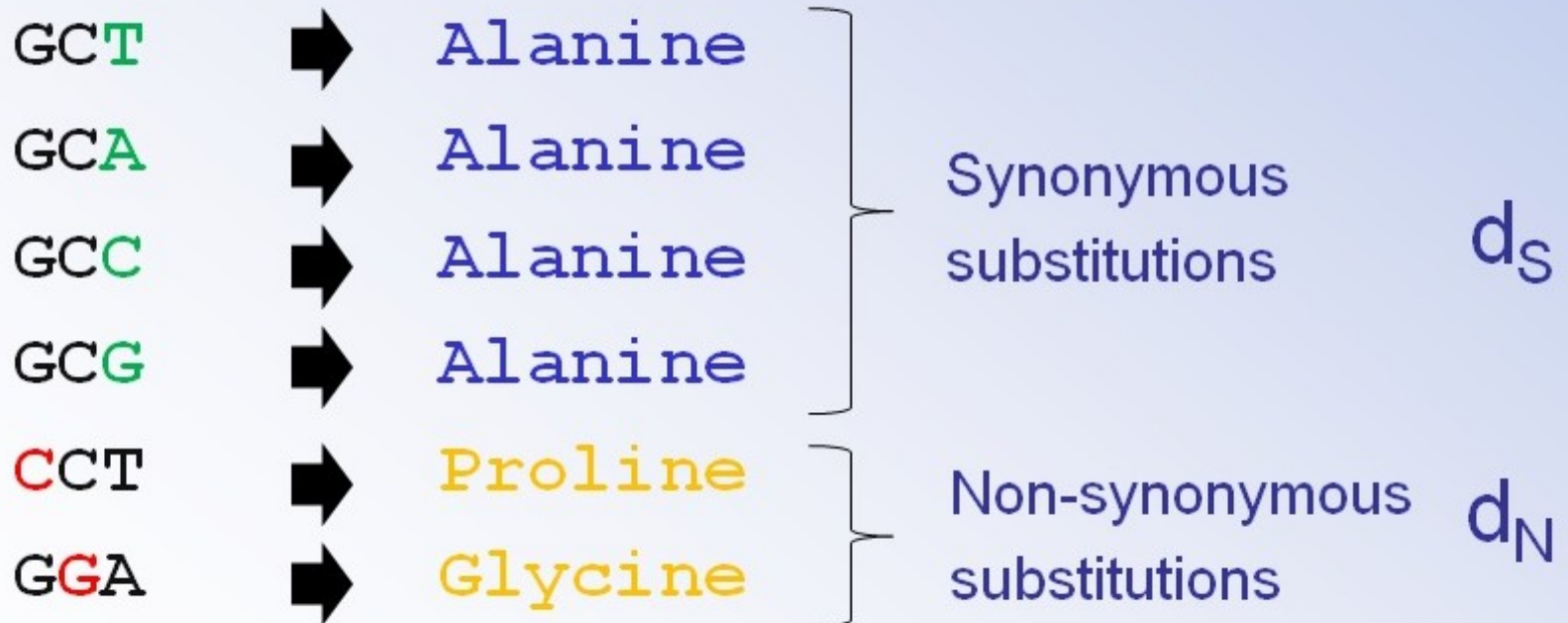


species-tree
 ◀ intronic sequences

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

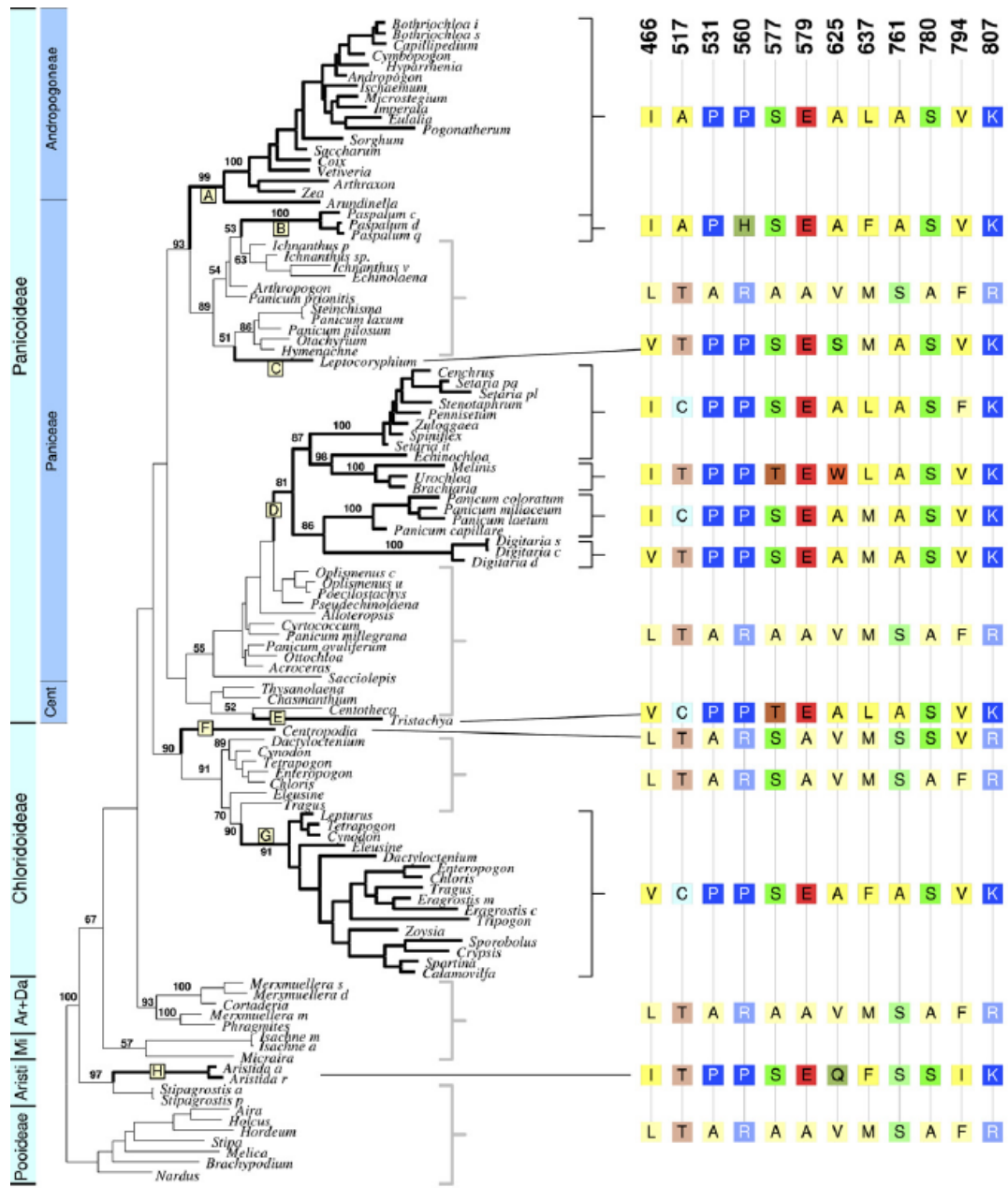
• $d_N/d_S < 1$ less non-syn than syn substitutions \rightarrow purifying selection

• $d_N/d_S > 1$ 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!

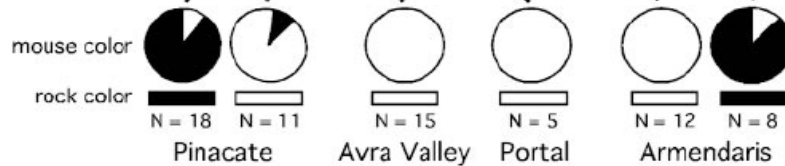
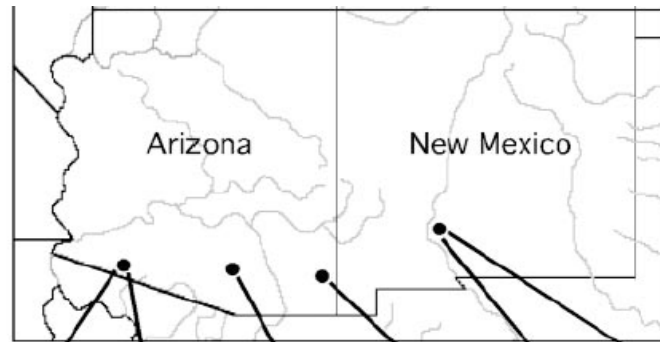
Metody studia funkční variability

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

pytlouš

Chaetodipus intermedius

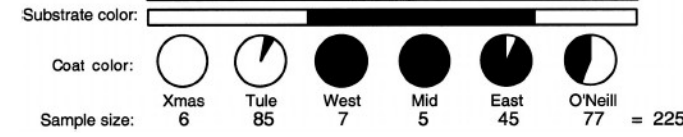
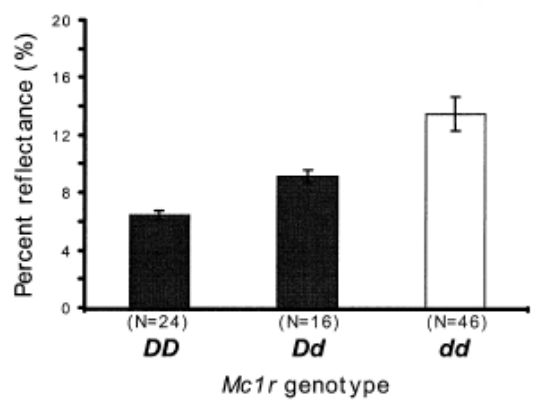
Hoekstra, Nachman et al.



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

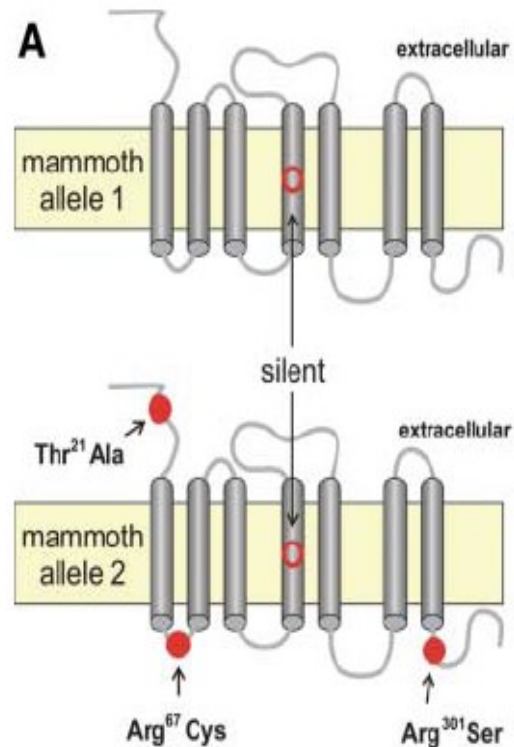
- **Arizona**

- 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

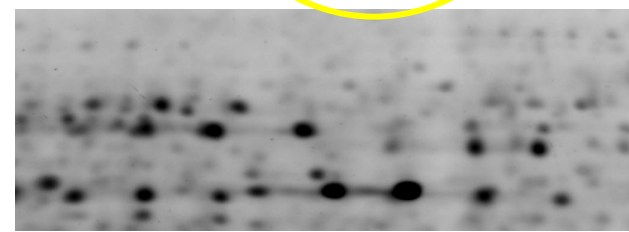
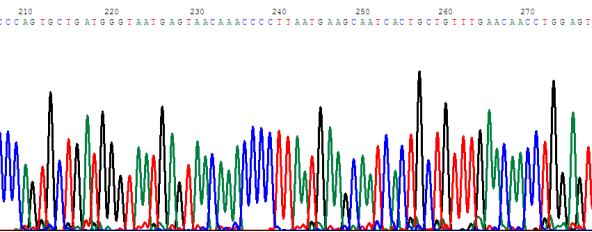
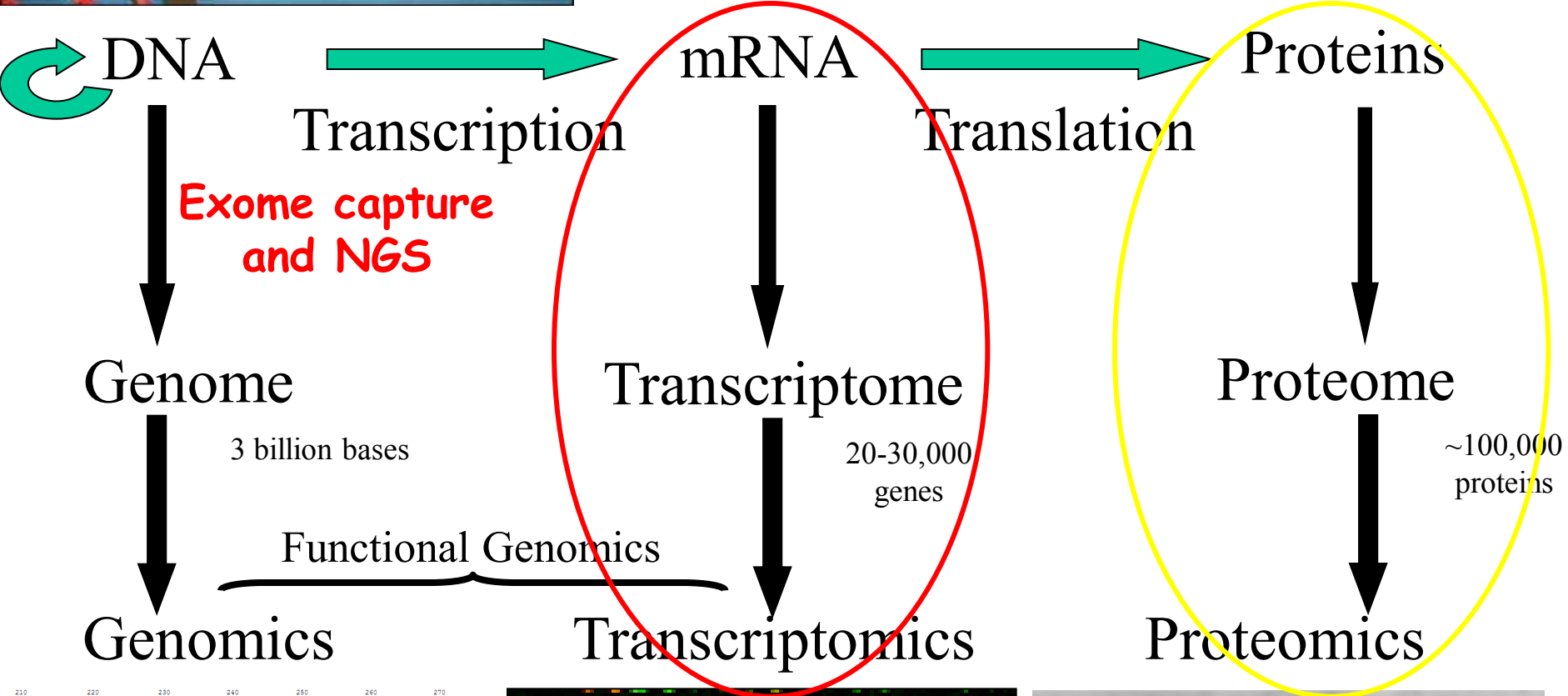
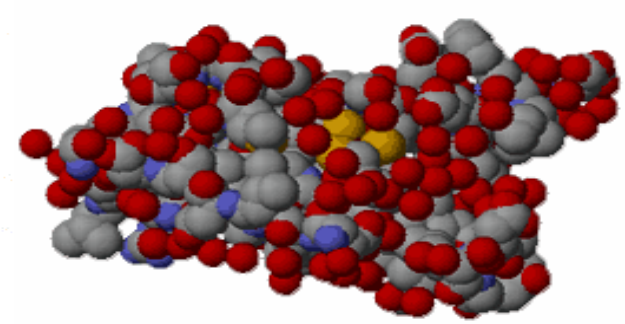
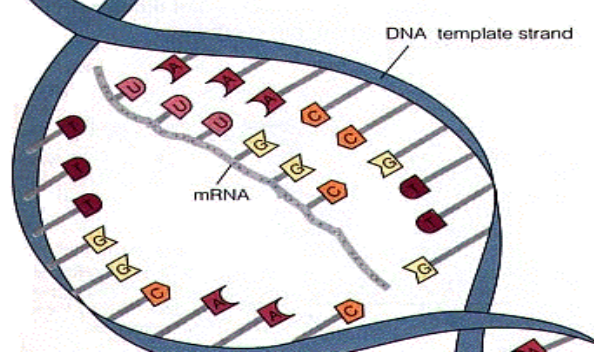
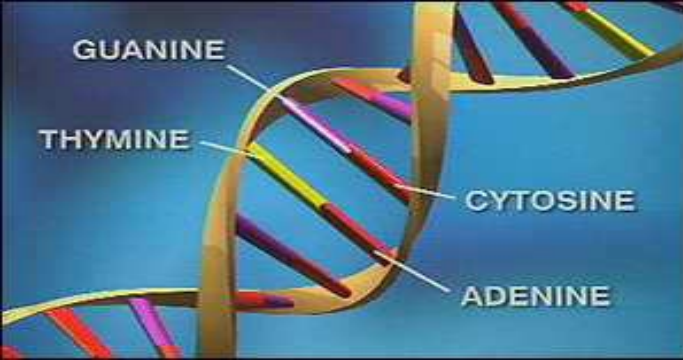


MC1R u člověka, mamuta a dalších

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



Sledování mnoha genů najednou



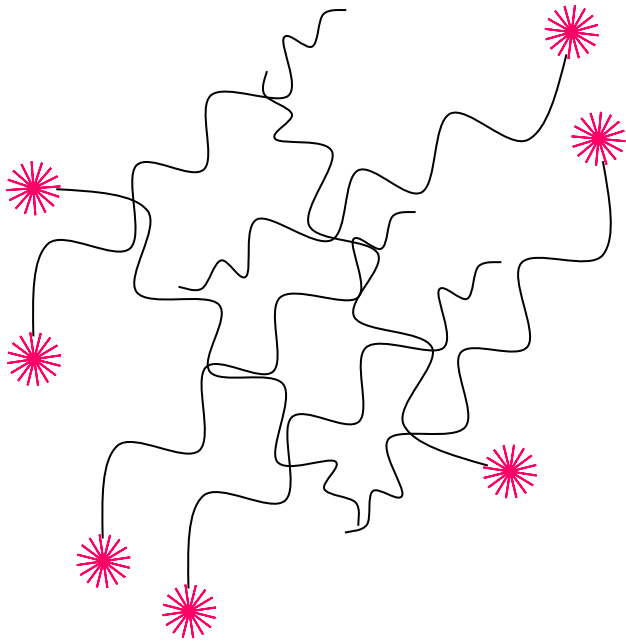
Transkriptomika

1. microarrays
2. RNA seq (NGS)

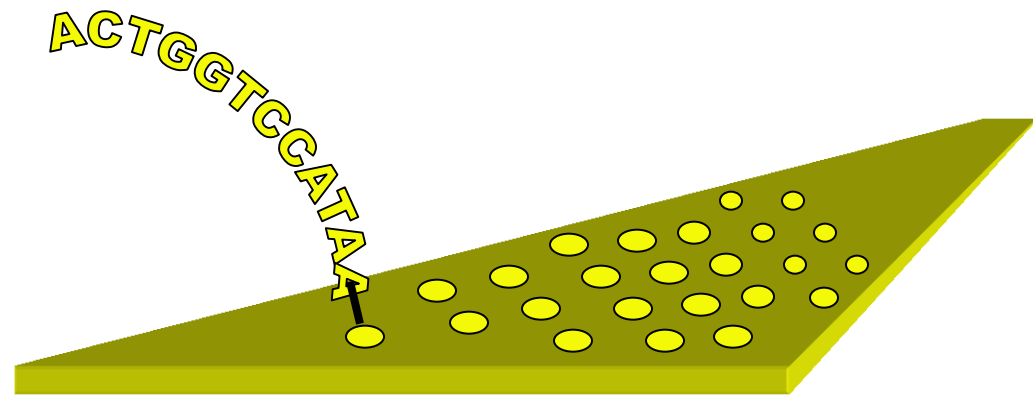
1. Analysis of gene expression by microarrays

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

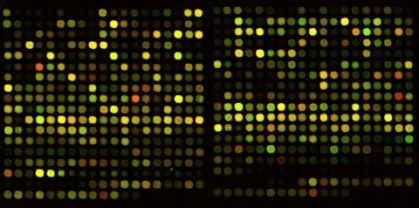
Microarray analysis of transcriptome (~ specific DNA hybridization)



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)

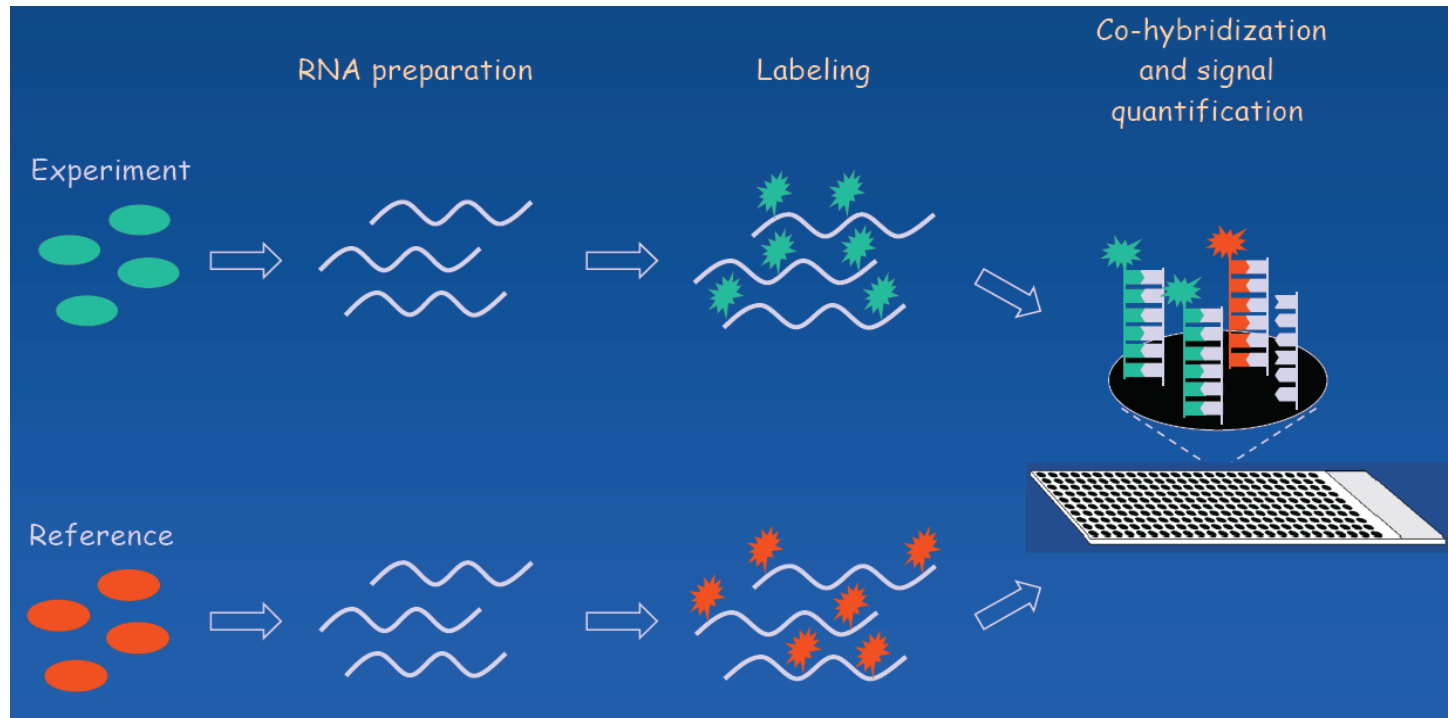


Sledování exprese genů microarrays

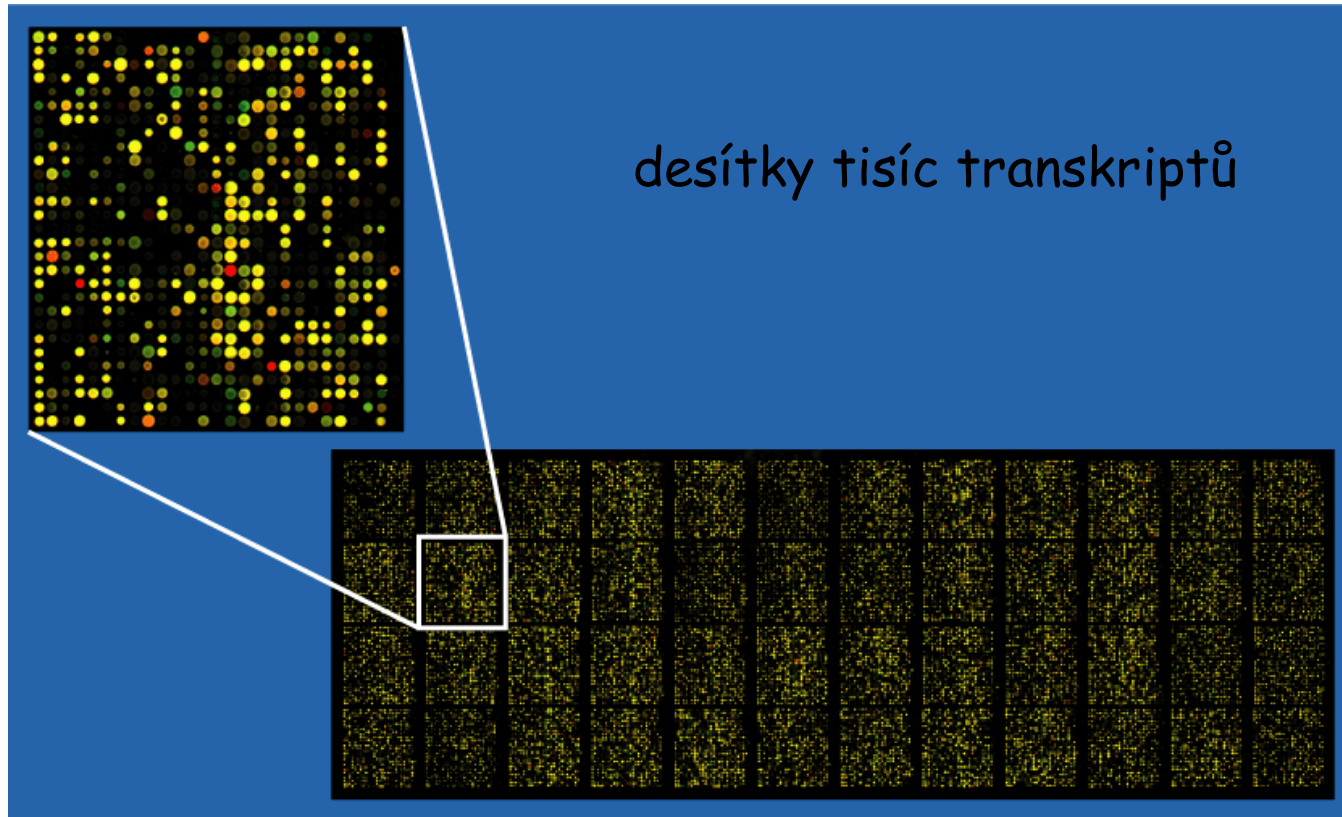
- Sledování exprese mnoha (tisíce) genů najednou
- Založeno na hybridizaci
- Sleduje se rozdíl vůči kontrole ("heterologous hybridization") = dvoukanálový experiment



Affymetrix
Agilent Technologies



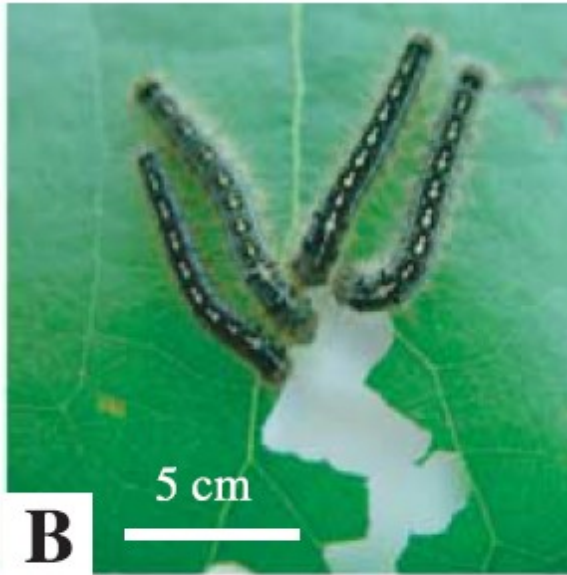
Vyhodnocení chipu – analýza obrazu (srovnání úrovně exprese mezi kontrolou a experimentem)



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



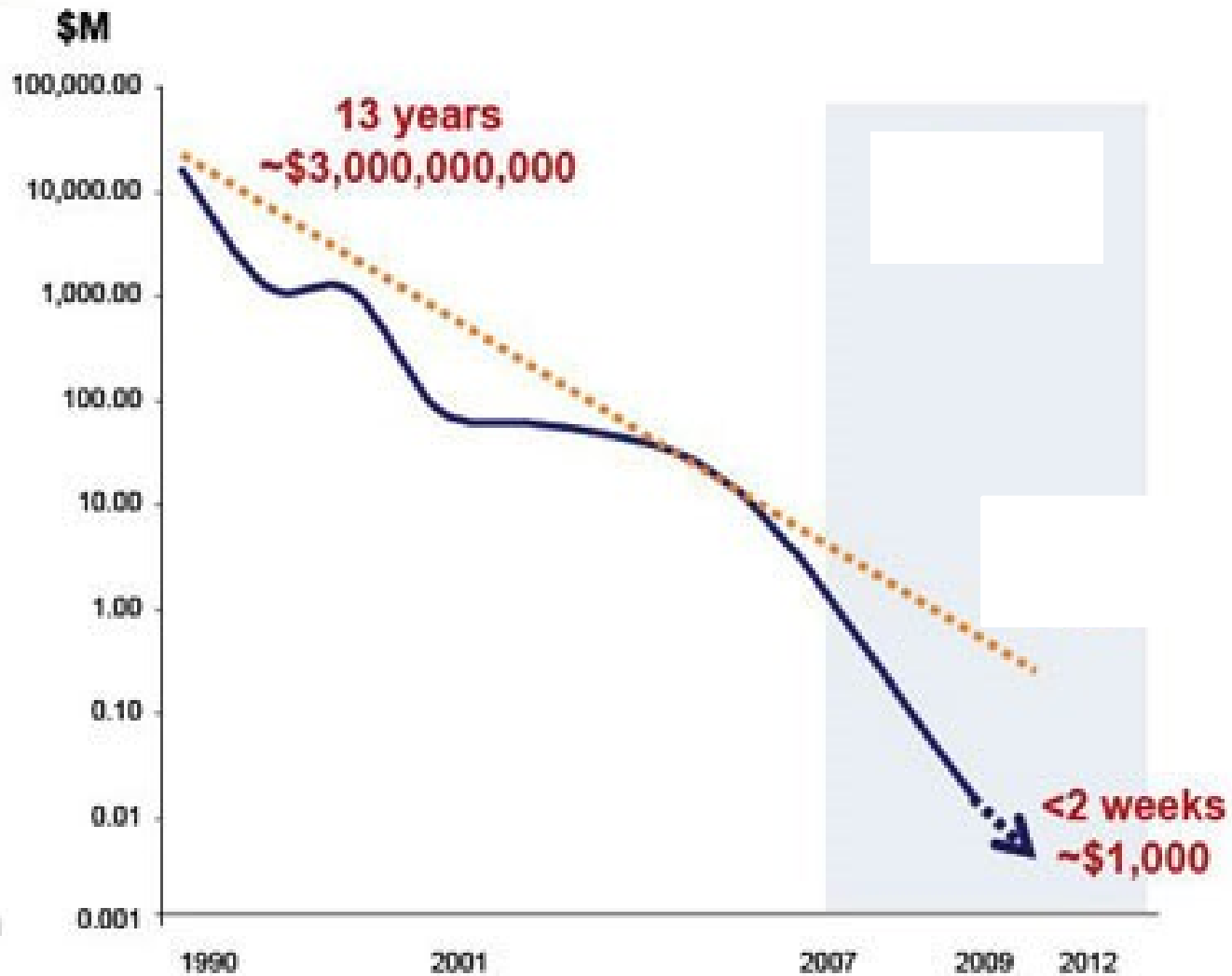
Populus trichocarpa x *deltoides*
a *Malacosoma disstria* bourovec
Ralph et al. 2006



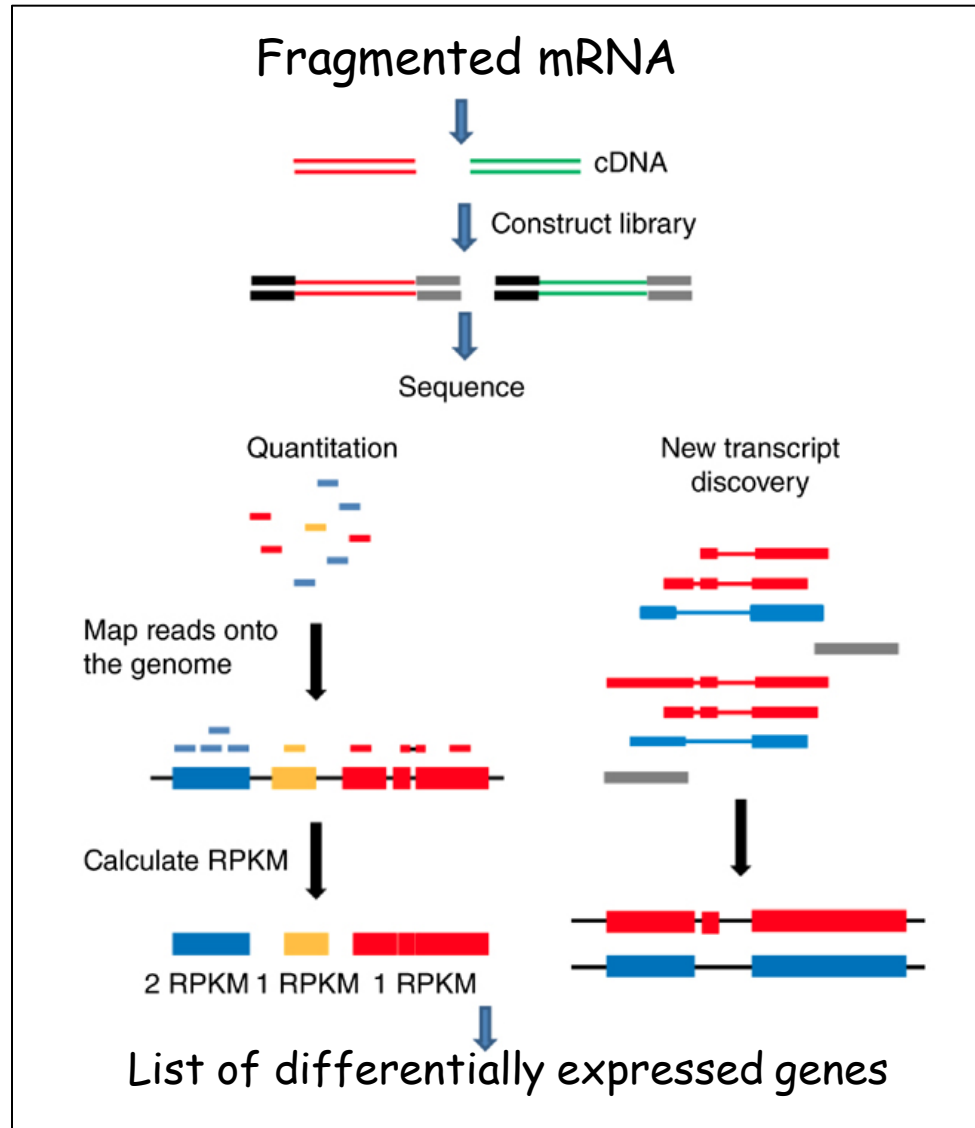
- cDNA microarray
- 15496 genů > 3/4 genomu
- Po 24 hodinách
1191 genů up-regulated
537 down-regulated
- Obrana: endochitinázy, inhibitory proteáz
- Signální funkce
- Transport, metabolismus, regulace transkripce

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



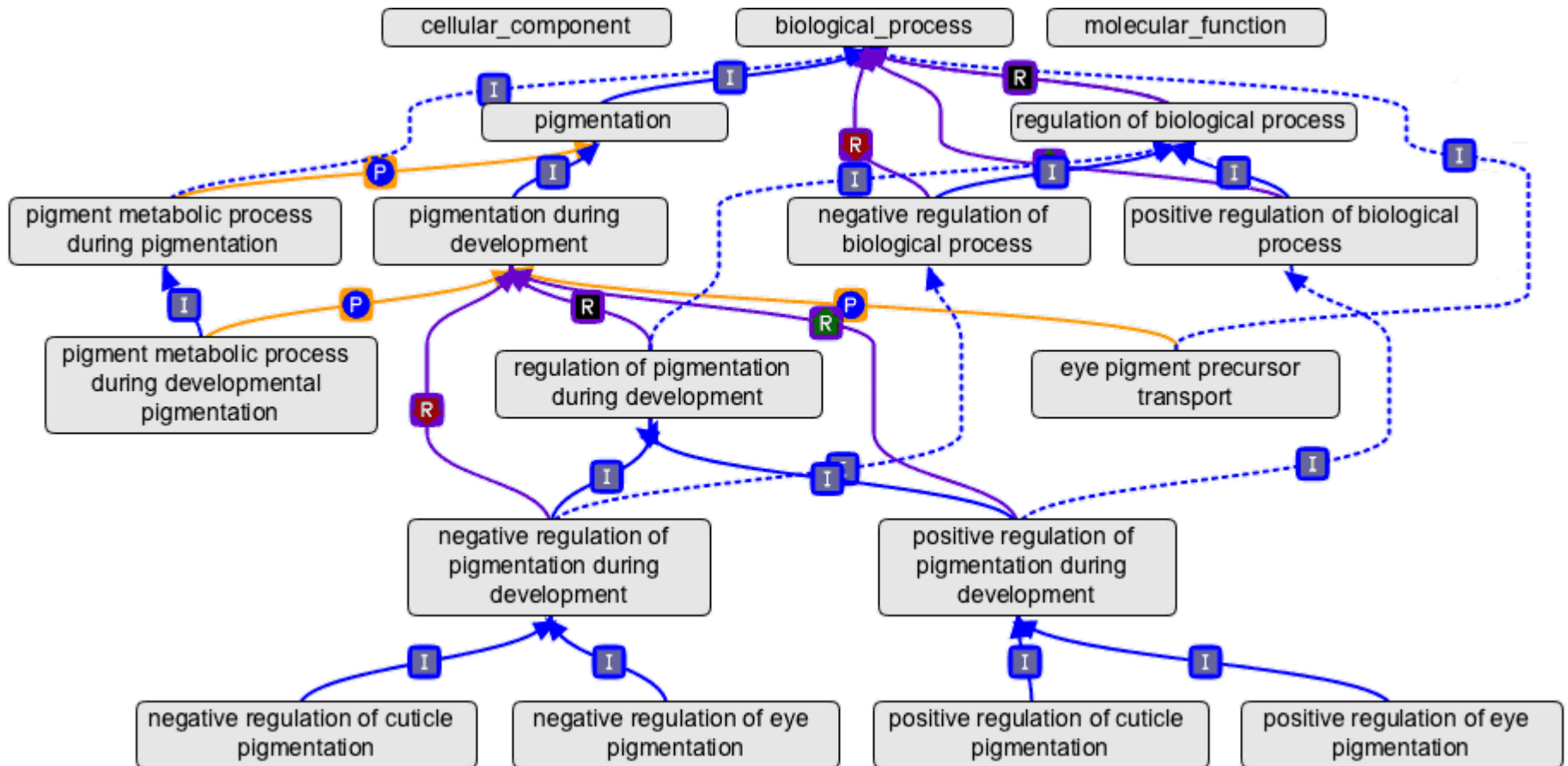
The reference transcriptome is required

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

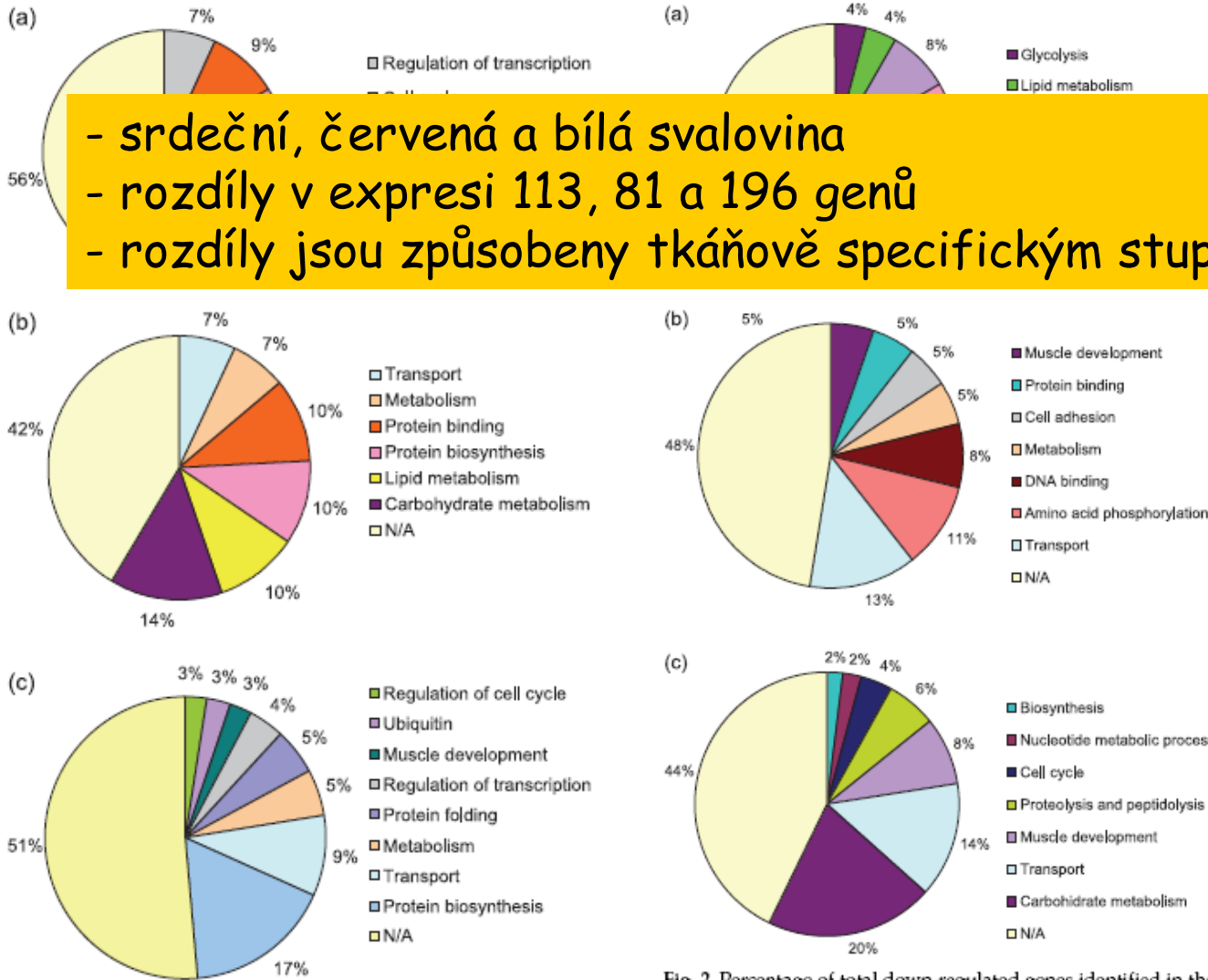


Example: A set of terms under the biological process node pigmentation.

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

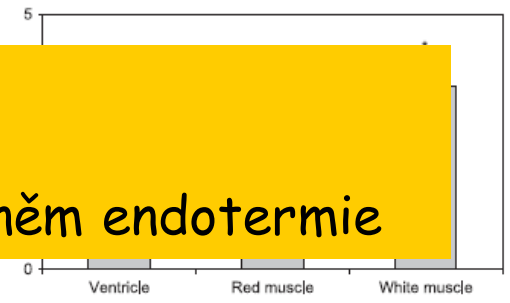


Fig. 1 Percentage of total up-regulated genes identified in the Gene Ontologies (Biological Process) of ventricle (a), red muscle (b) and white muscle (c).

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)

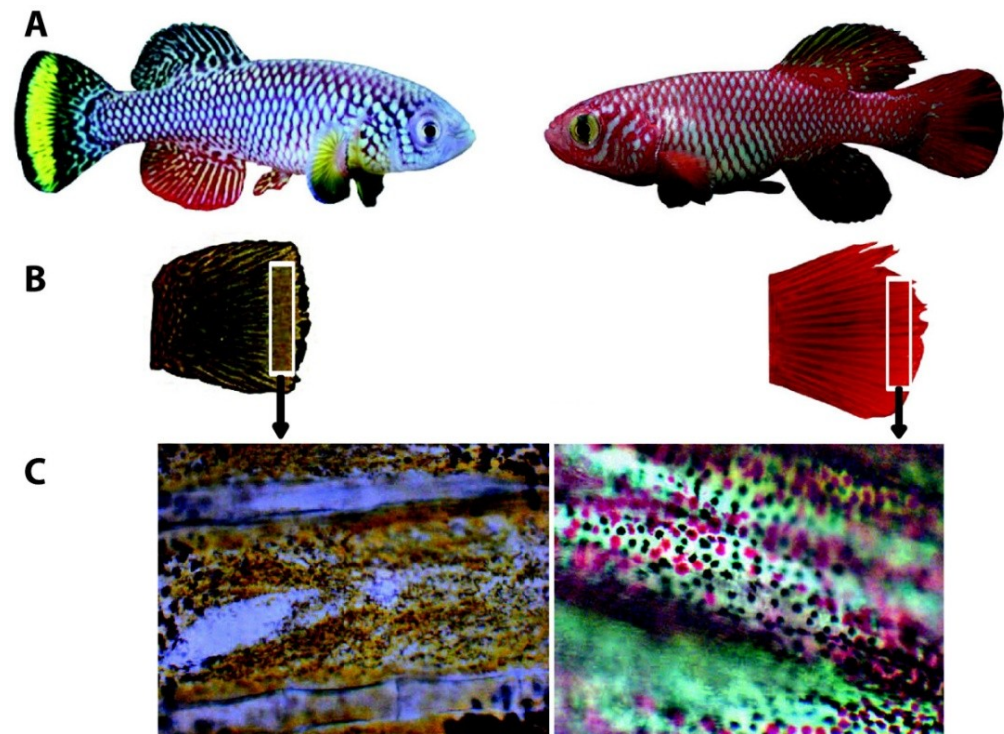
RESEARCH ARTICLE

Open Access

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

Enoch Ng'oma¹, Marco Groth¹, Roberto Ripa², Matthias Platzer¹ and Alessandro Cellerino^{1,2*}

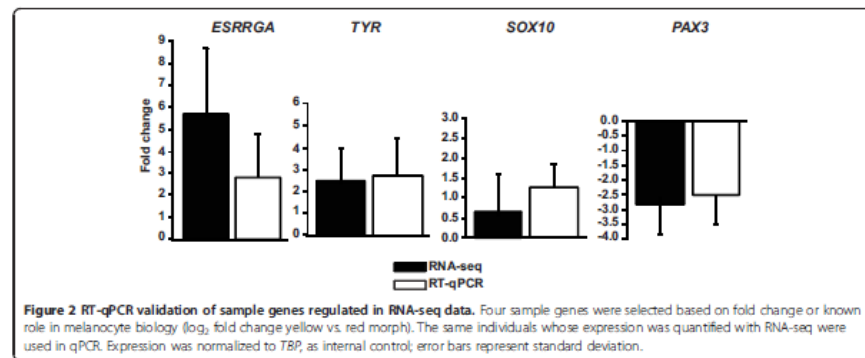
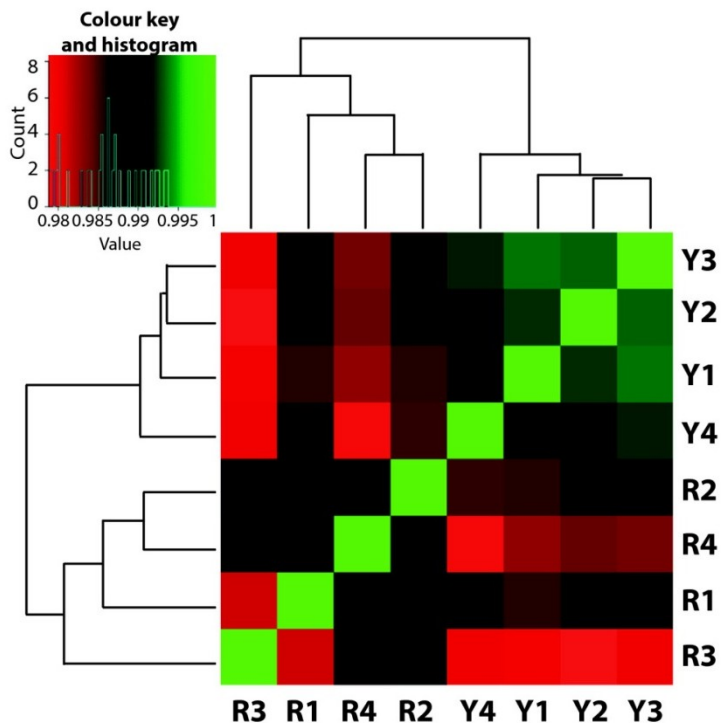
- cca 334 miliónů sekvencí („reads“); 42 mil./sample
- 210 DEGs („differentially expressed genes“) - 119 up-regulated, 91 down-regulated u žlutých jedinců



xanthophory

melanophory
erythrophory

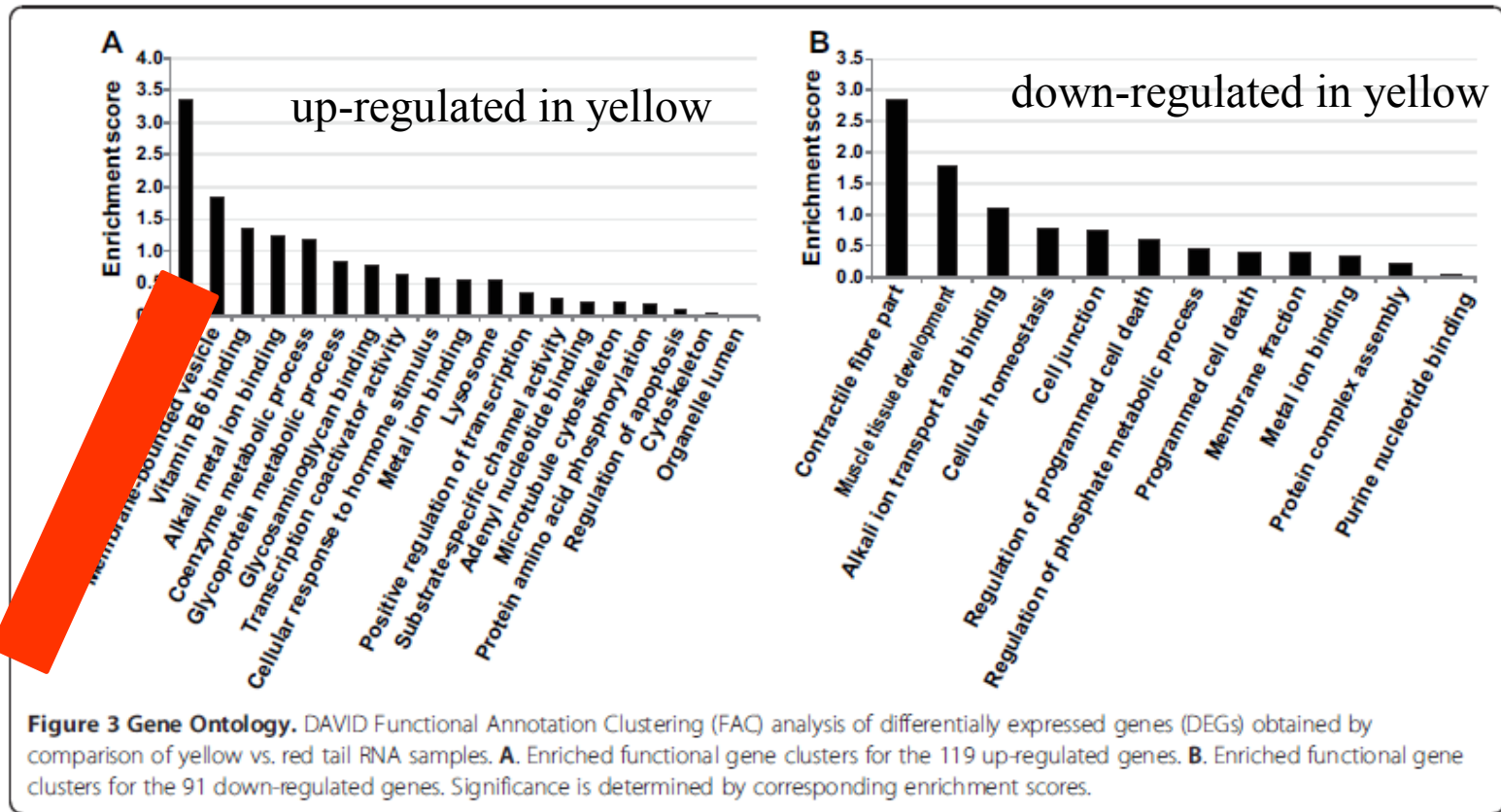
Konzistence výsledků



- 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

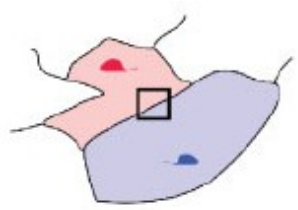
Functional annotation clustering (= gene ontology)



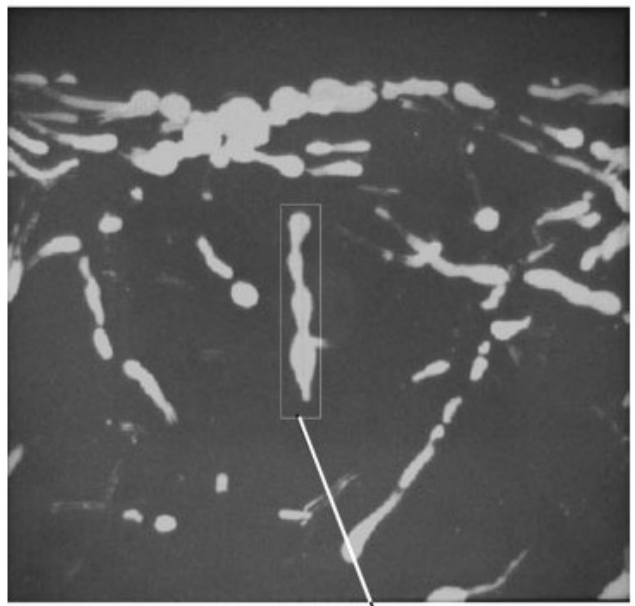
- xanthophory u žlutých jedinců jsou asociovány s melanogenezí
- v dalším kroku je možné studovat roli jednotlivých kandidátních genů

Závěr

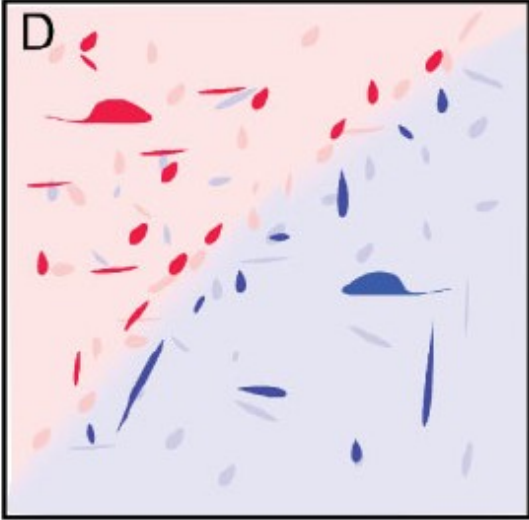
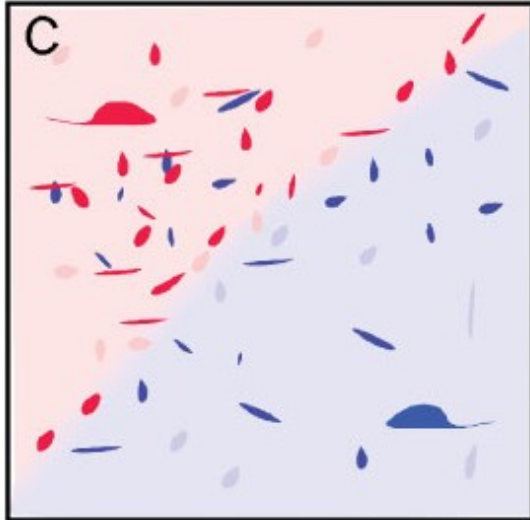
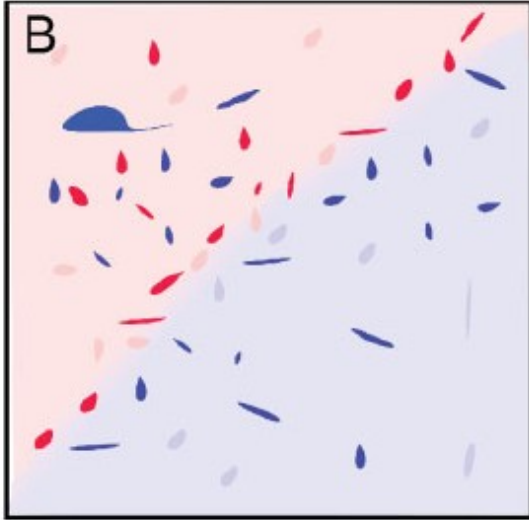
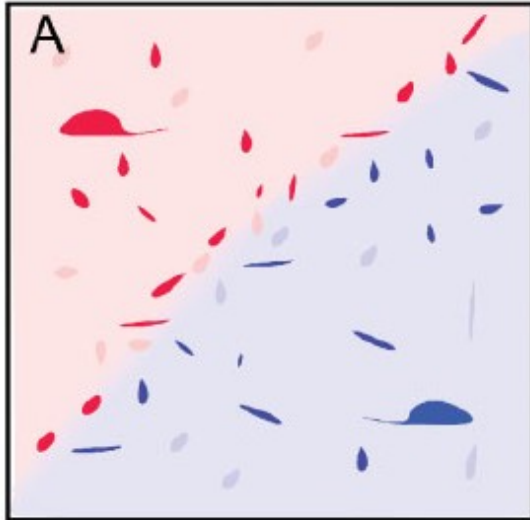
- Molekulární ekologie se rychle vyvíjí
- Metody se zásadně vylepšují a mění
- Co platilo dnes, nemusí platit zítra - těšme se tedy na zítřek



15cm



Urine streak presented as stimulus



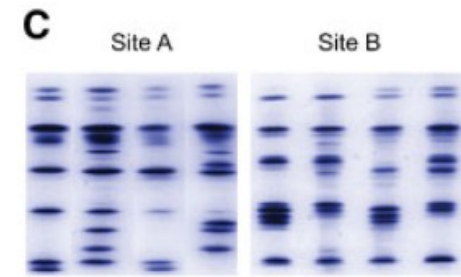
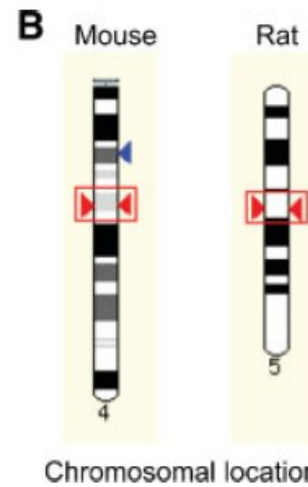
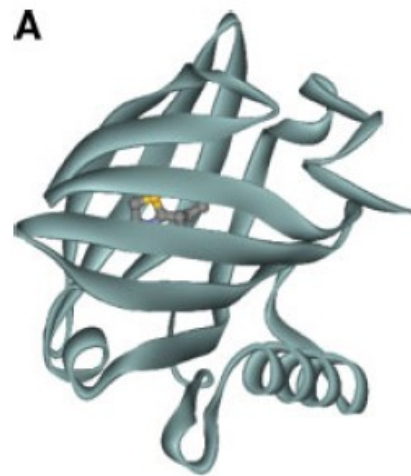
Mus musculus

Značení teritorií pachovými značkami (kapky moči)

Přeznačkování

V moči proteiny vážící volatilní molekuly

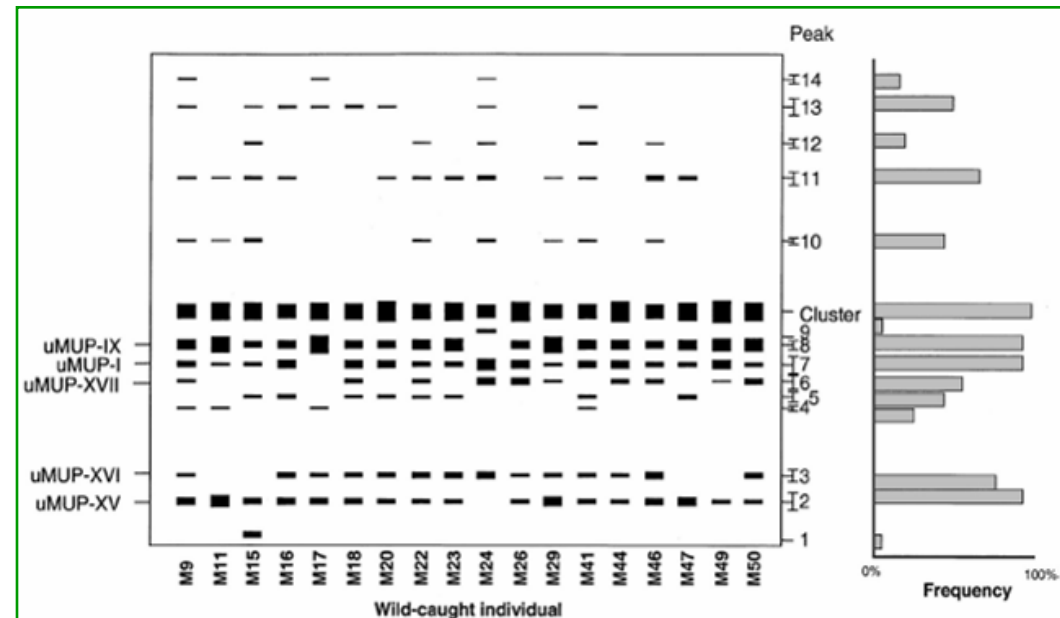
MUPs



Urine samples from individual wild-caught male mice

Major Urinary Proteins - komplex velmi podobných genů

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

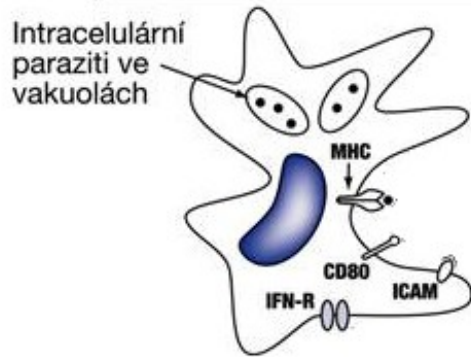


Major histocompatibility complex (MHC)

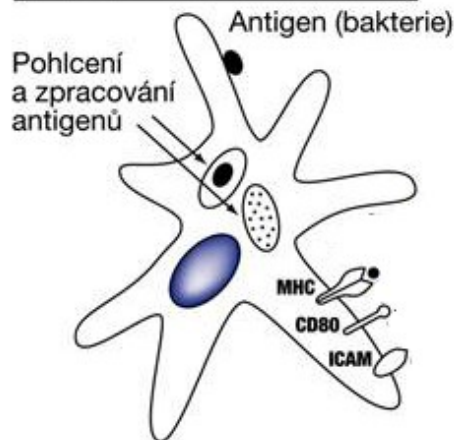
= adaptivní imunitní odpověď u čelistnatých obratlovců

Antigen-specifická imunitní odpověď

INFIKOVANÝ MAKROFÁG

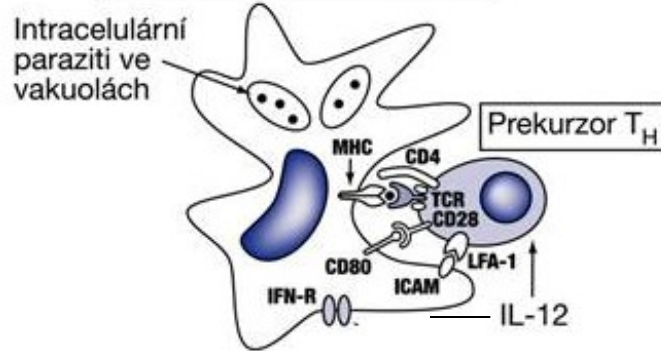


APC (DENDRITICKÁ BUŇKA)



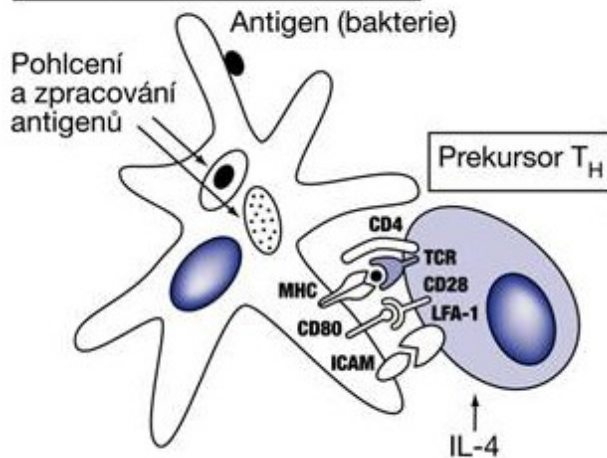
Antigen-specifická imunitní odpověď

INFIKOVANÝ MAKROFÁG

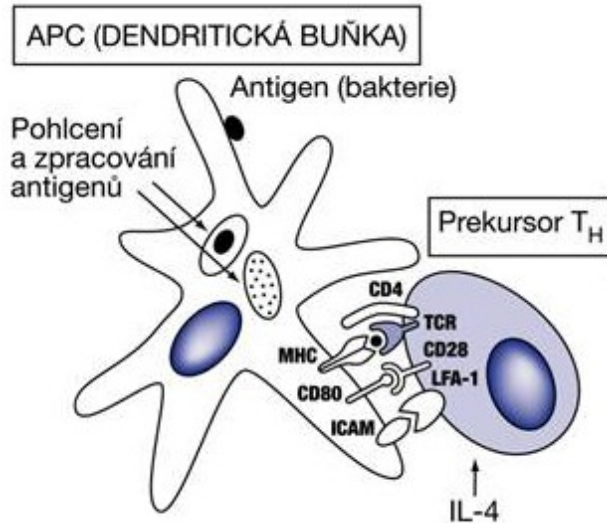
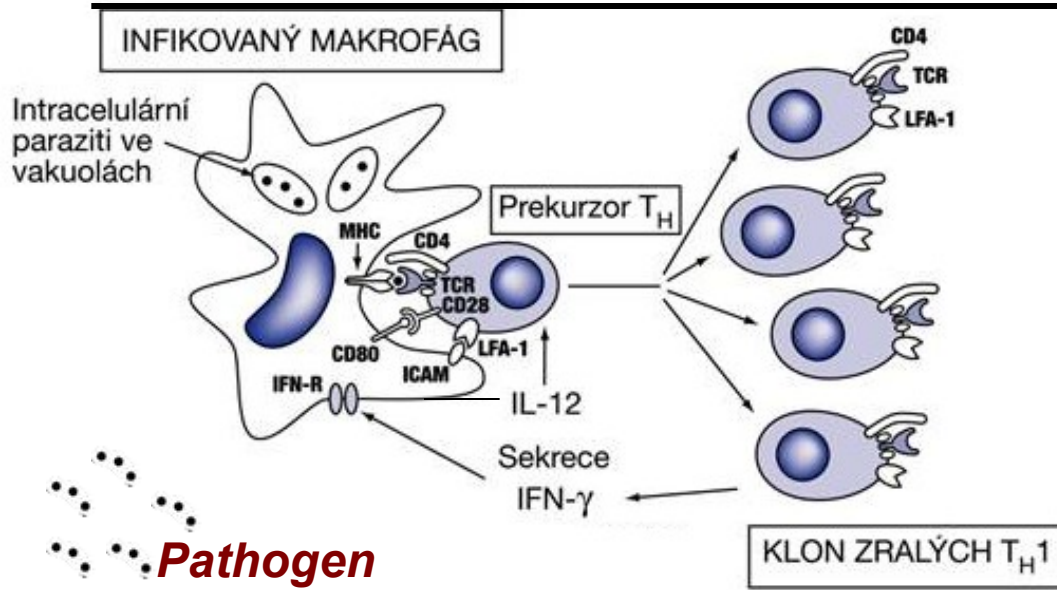


Pathogen

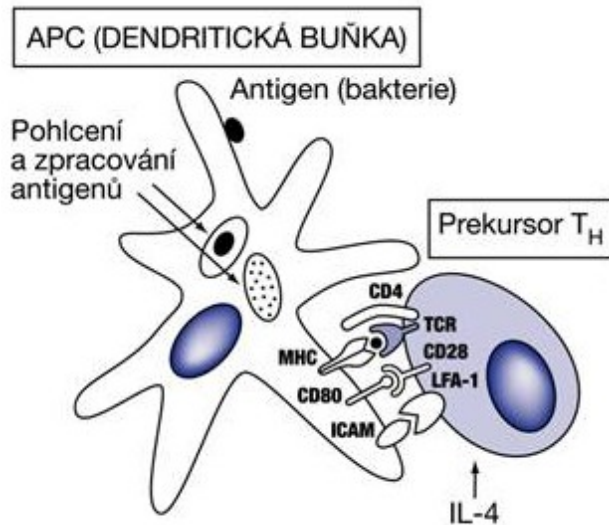
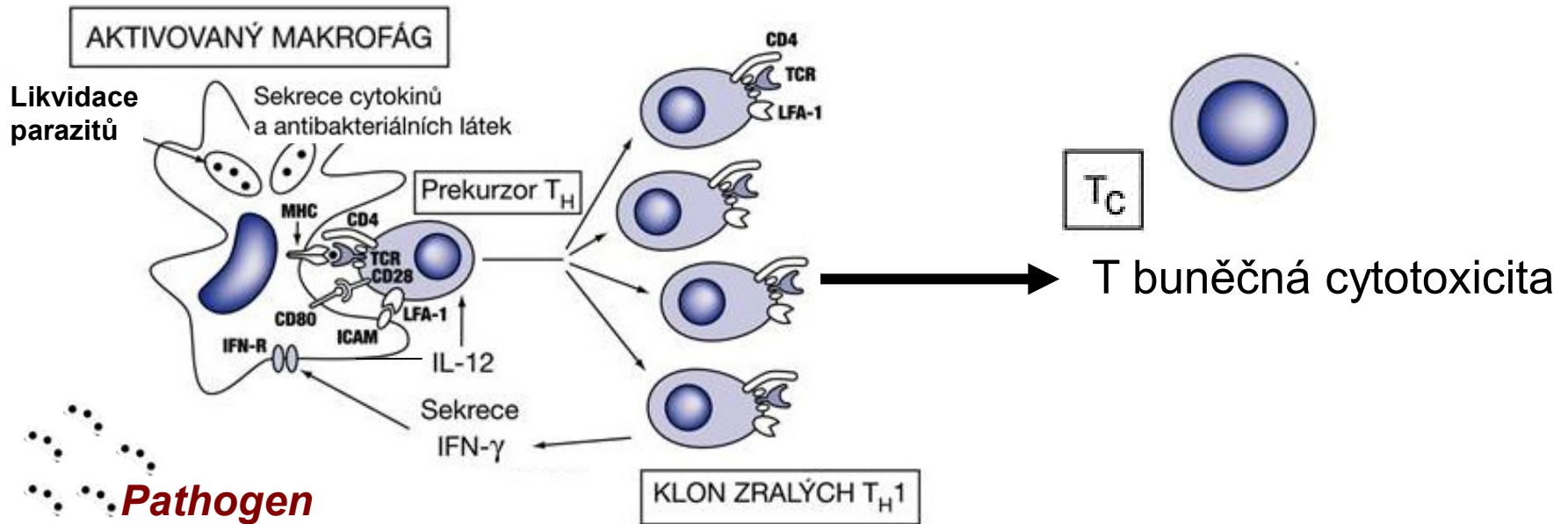
APC (DENDRITICKÁ BUŇKA)



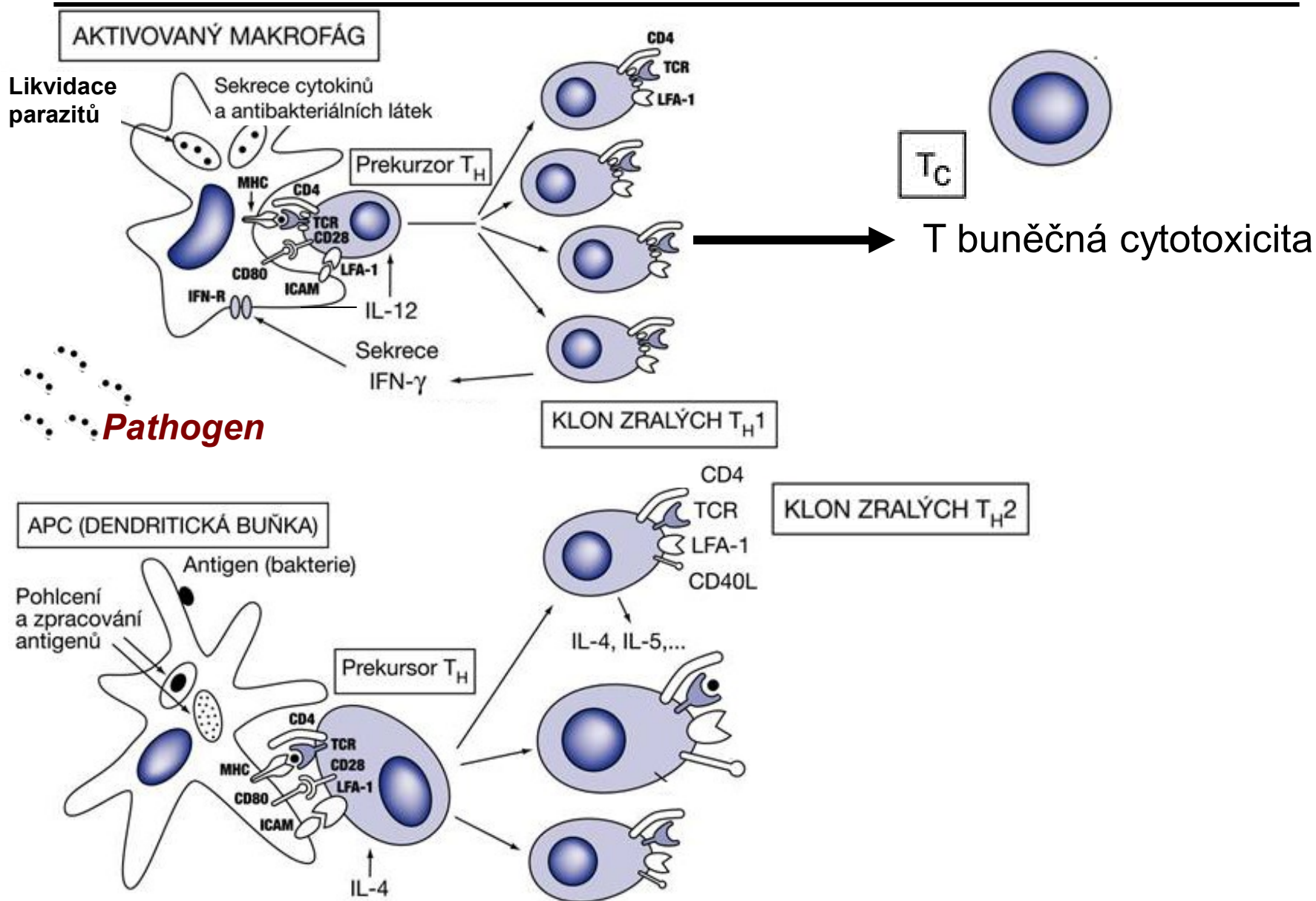
Antigen-specifická imunitní odpověď



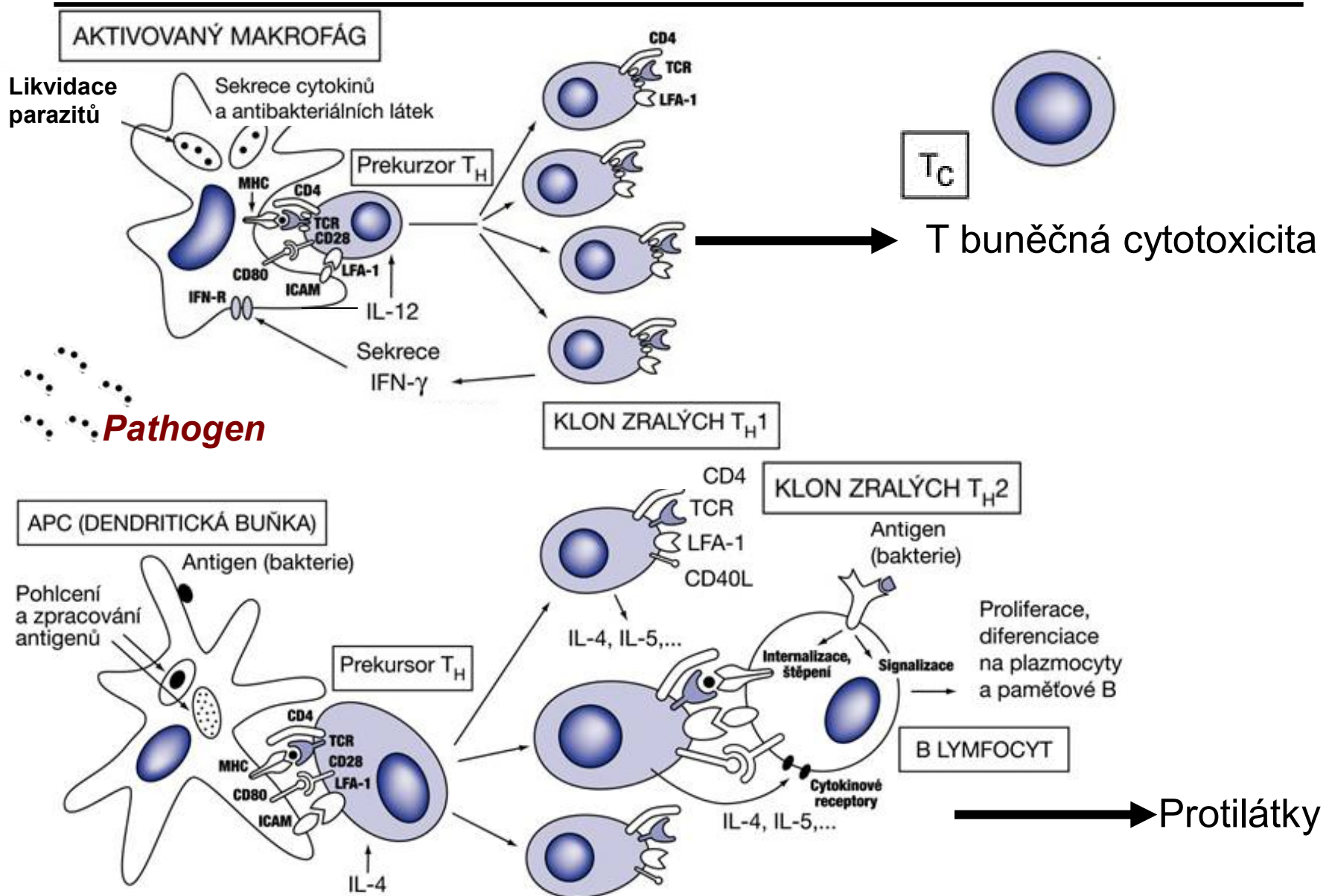
Antigen-specifická imunitní odpověď



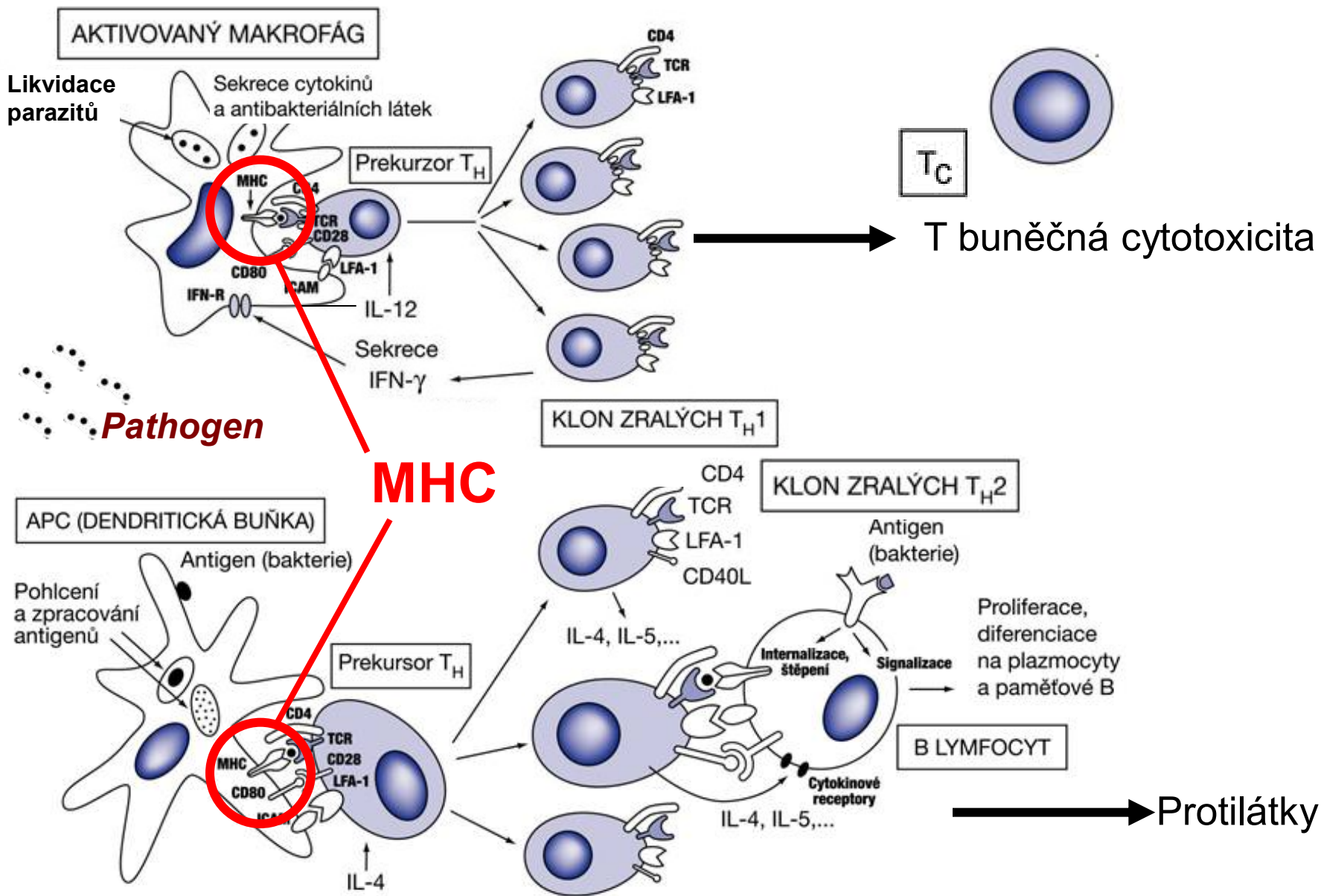
Antigen-specifická imunitní odpověď



Antigen-specifická imunitní odpověď

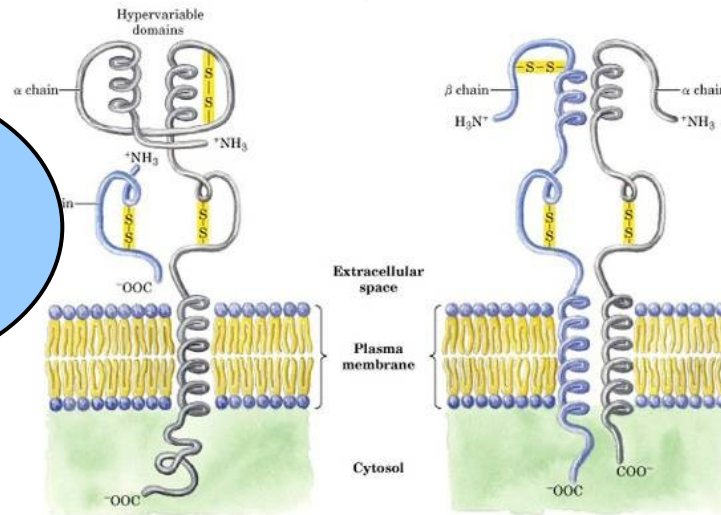


Molekulární ekologie: Kdo a jak rozpozná parazita ?



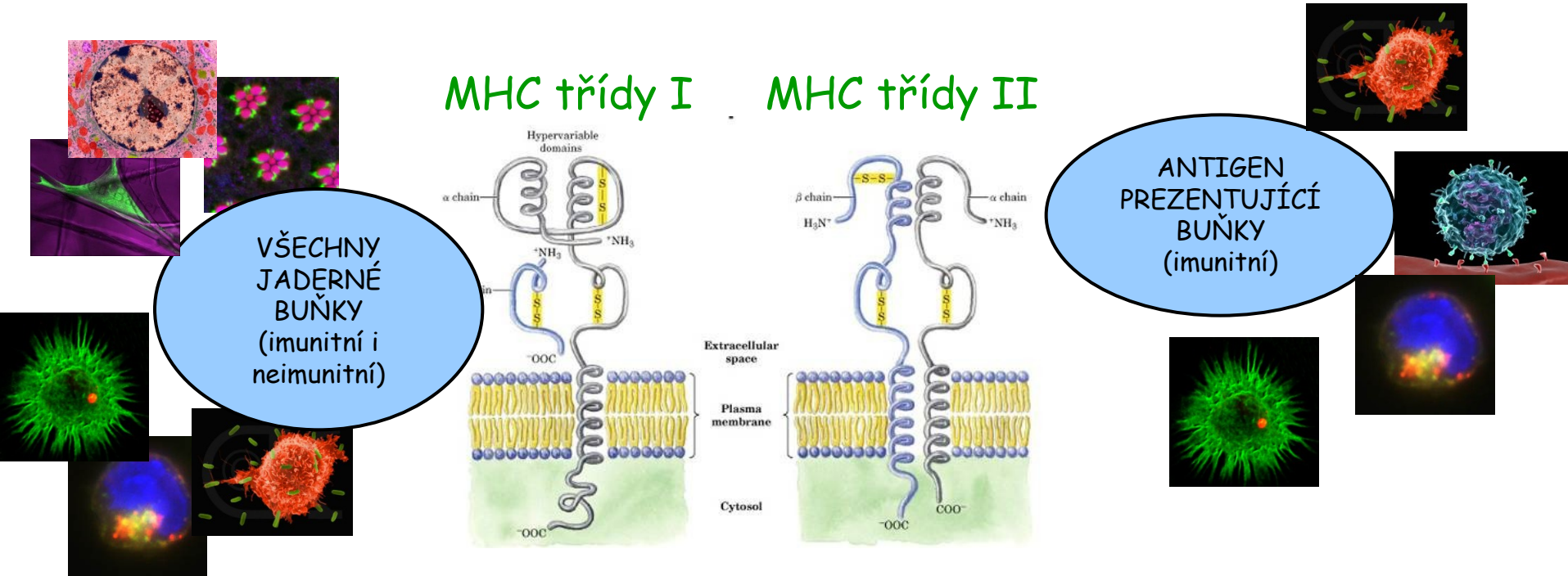
Major histocompatibility complex (MHC)

MHC třídy I MHC třídy II



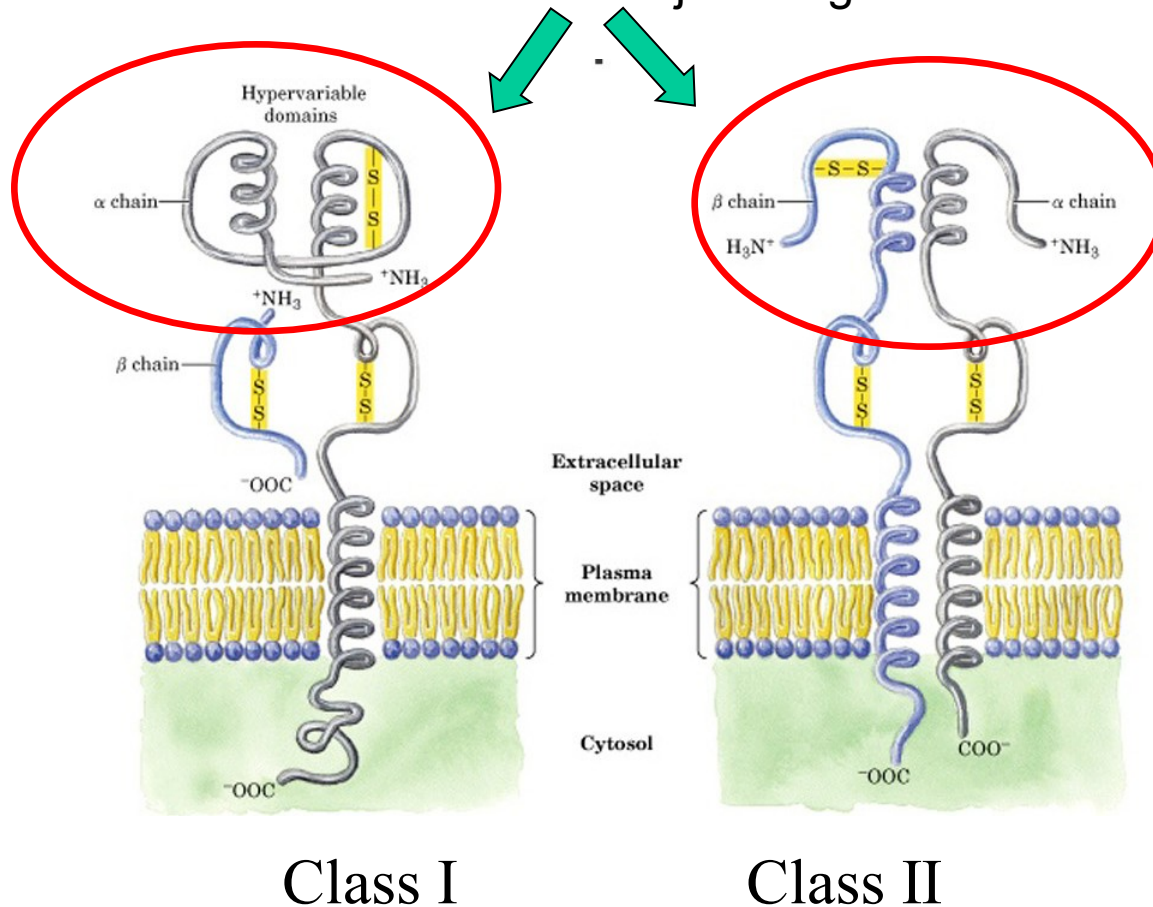
VŠECHNY
JADERNÉ
BUŇKY
(imunitní i
neimunitní)

ANTIGEN
PREZENTUJÍCÍ
BUŇKY
(imunitní)

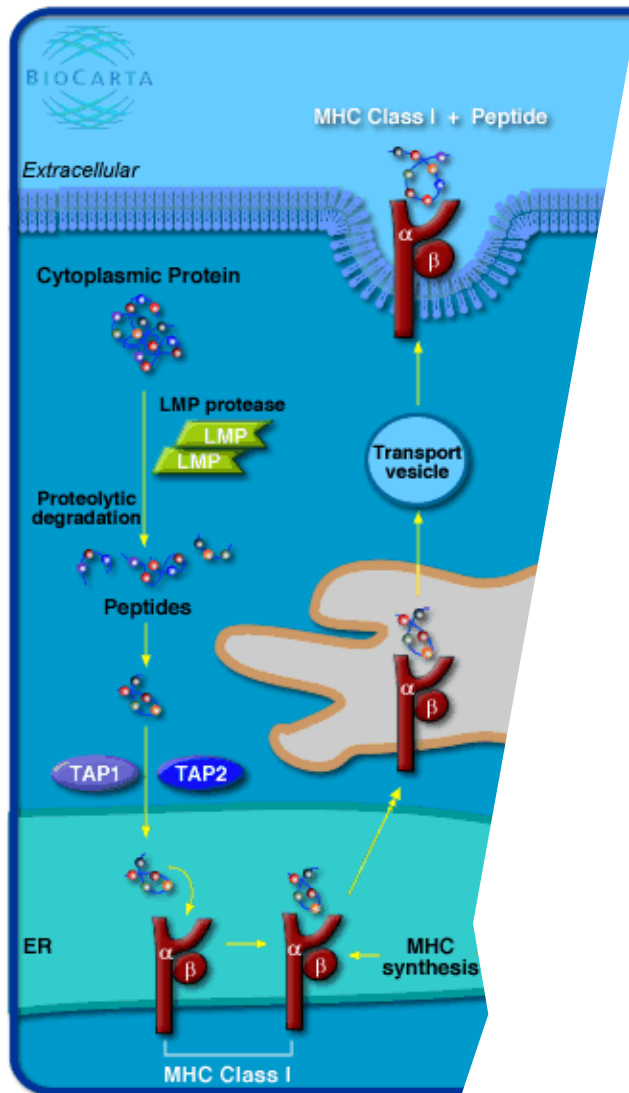


Major histocompatibility complex (MHC)

Oblast rozeznávající antigen



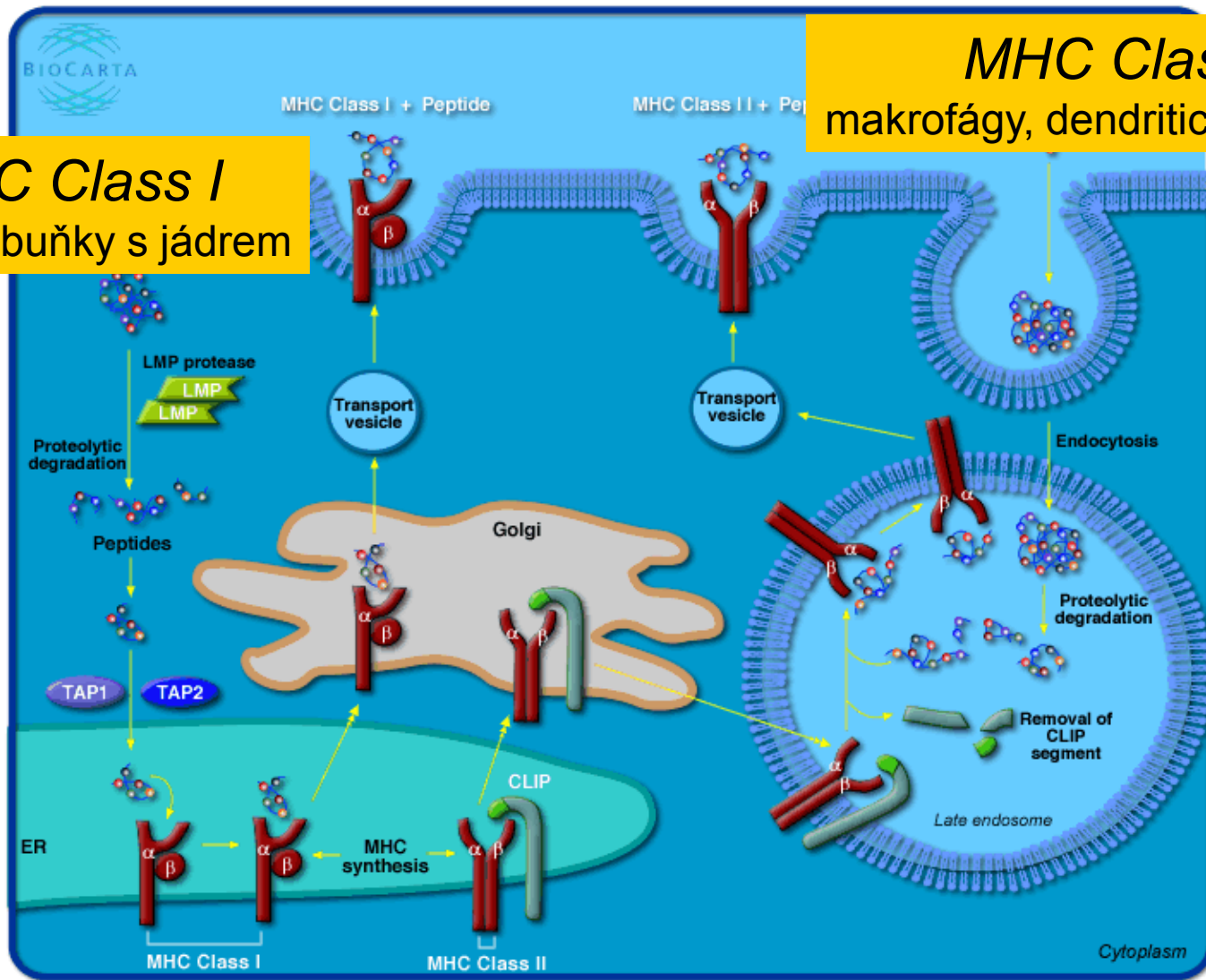
Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu



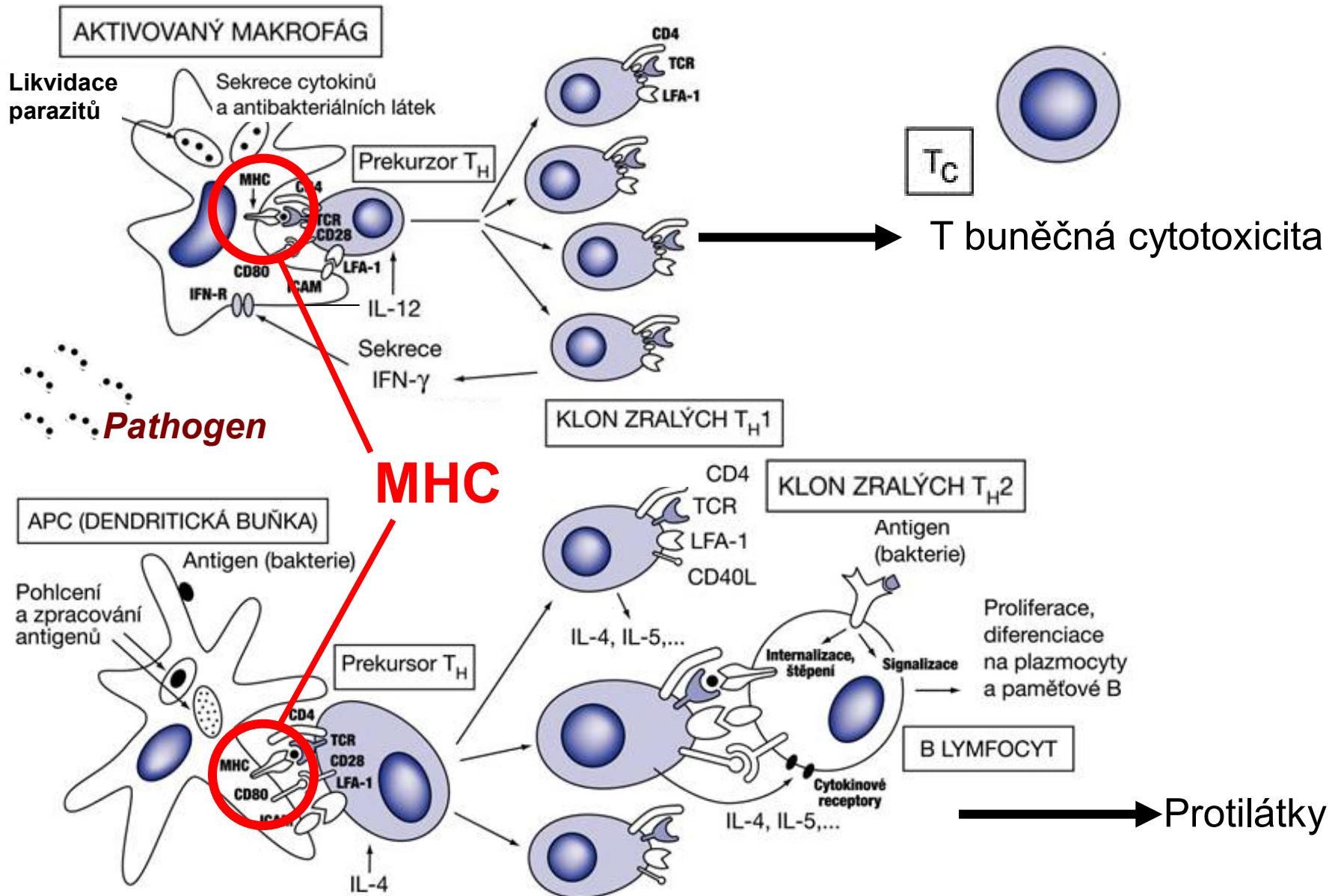
Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu

MHC Class I
všechny buňky s jádrem

MHC Class II
makrofágy, dendritické buňky aj.



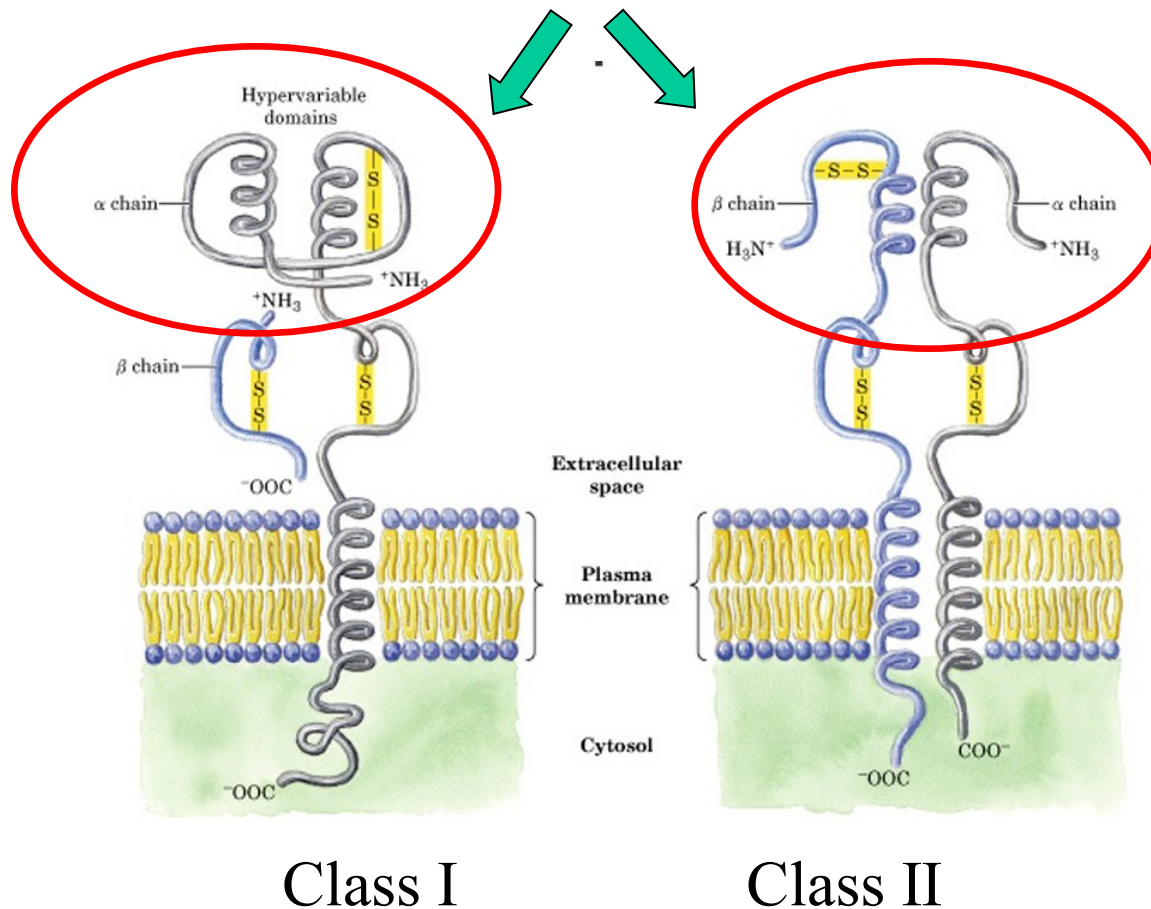
Buňka nabízející antigen spustí imunitní odpověď



Jak zjistit, že je MHC pod selekcí?

Major histocompatibility complex (MHC)

Oblast rozeznávající antigen (antigen-binding sites = ABS)



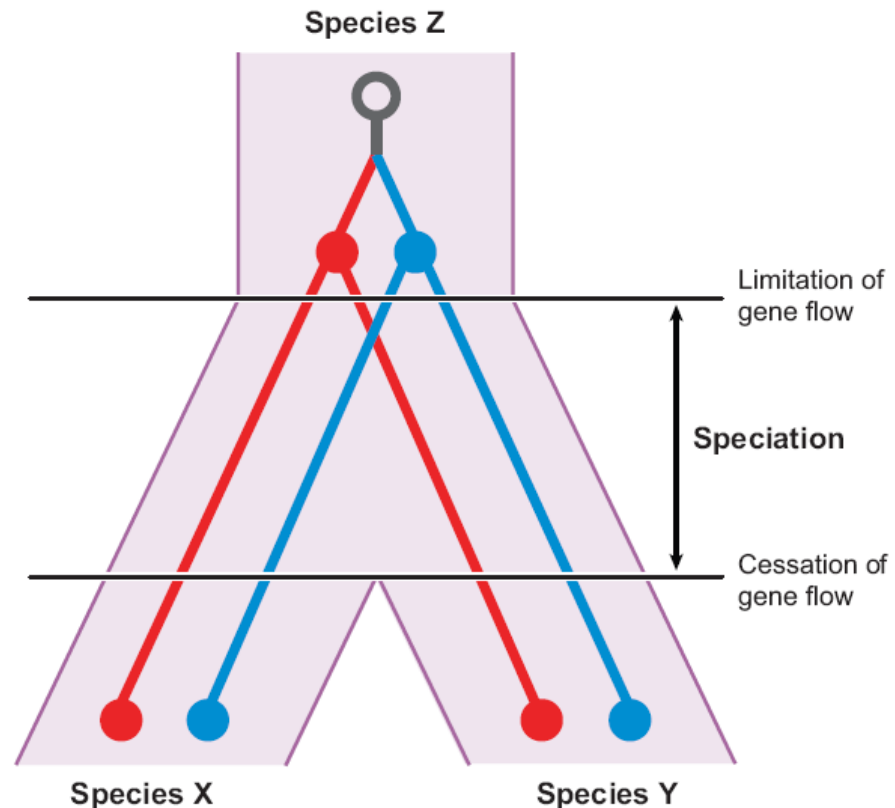
Je variabilita MHC důsledkem přírodního výběru?

Pozitivní selekce - vytvoření a udržení velkého množství funkčních variant

Trans-species polymorfismus

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

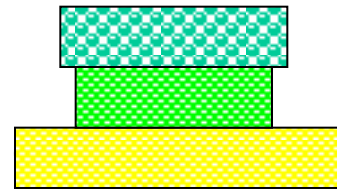
- „gene tree” vs. „species tree”



Fylogenetická analýza MHC sekvencí



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



Mus

Rattus



Pozitivní historická selekce na MHC Class II

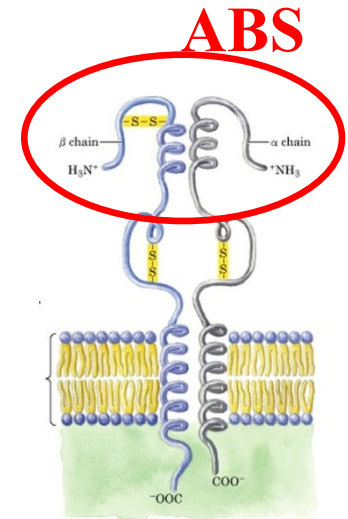
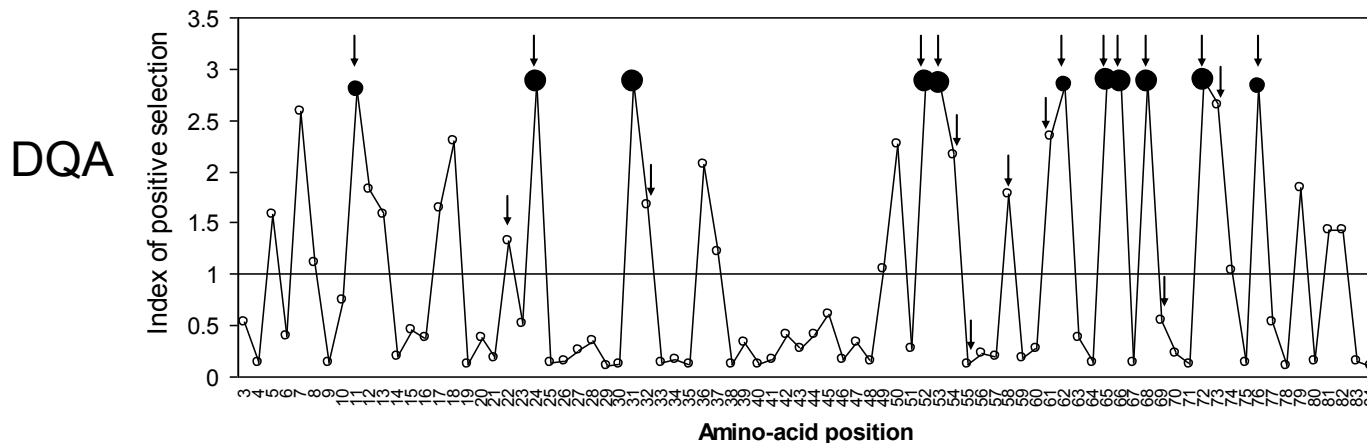
špatně určená pozice ABS (?)

- 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)



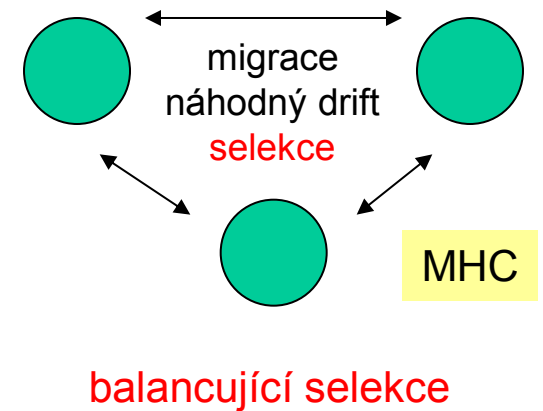
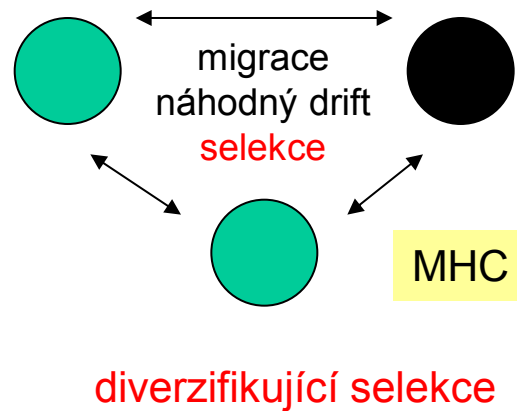
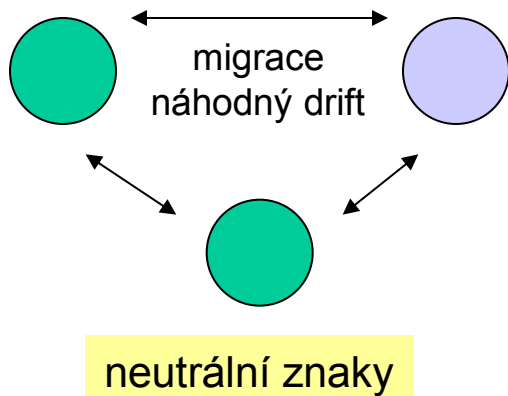
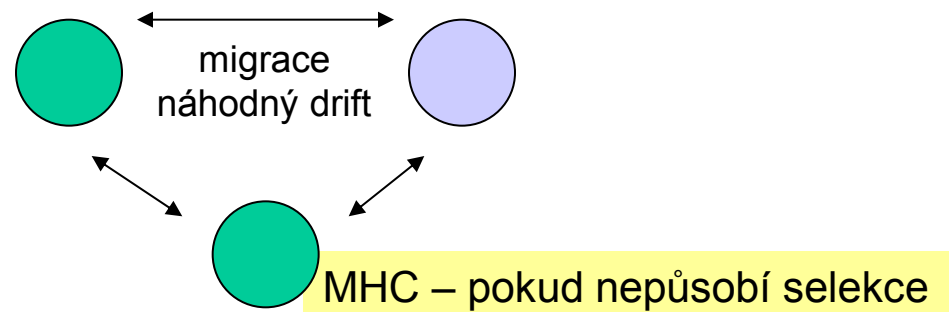
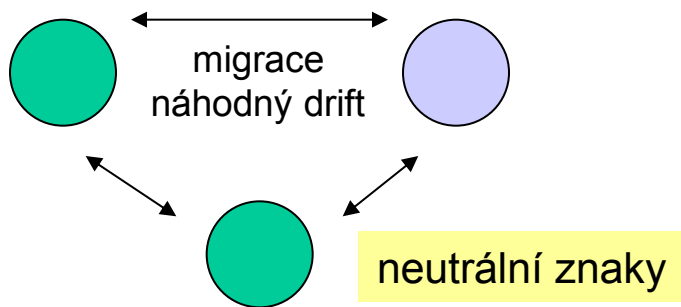
Šipky ukazují ABS místa identifikovaná na základě krystalografického modelu DQA proteinu u myši

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)

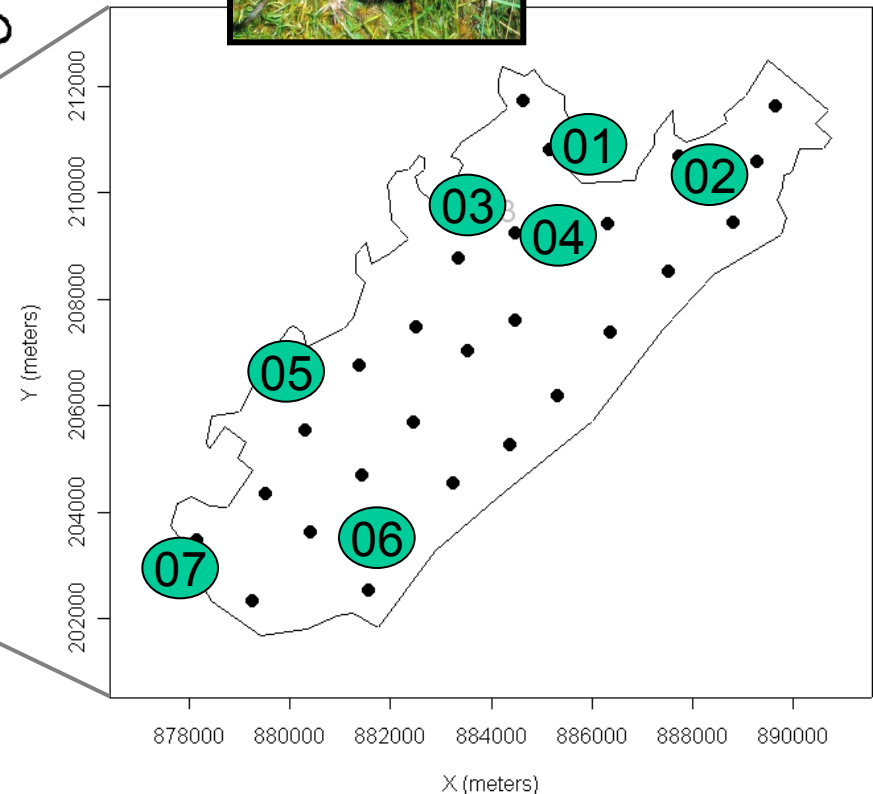
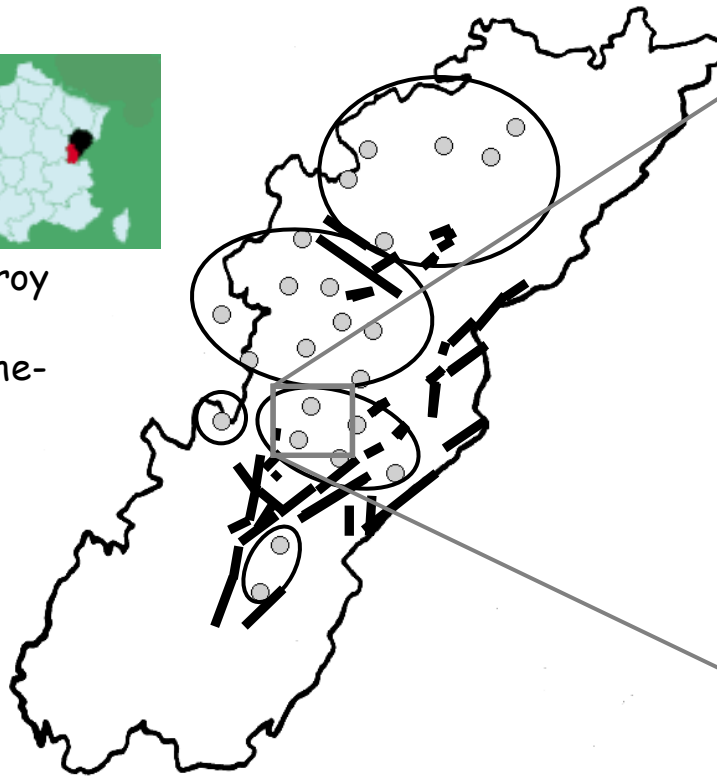


Důkaz přírodního výběru v současnosti: analýza populačně-genetické struktury

- Srovnání neutrálních znaků a MHC

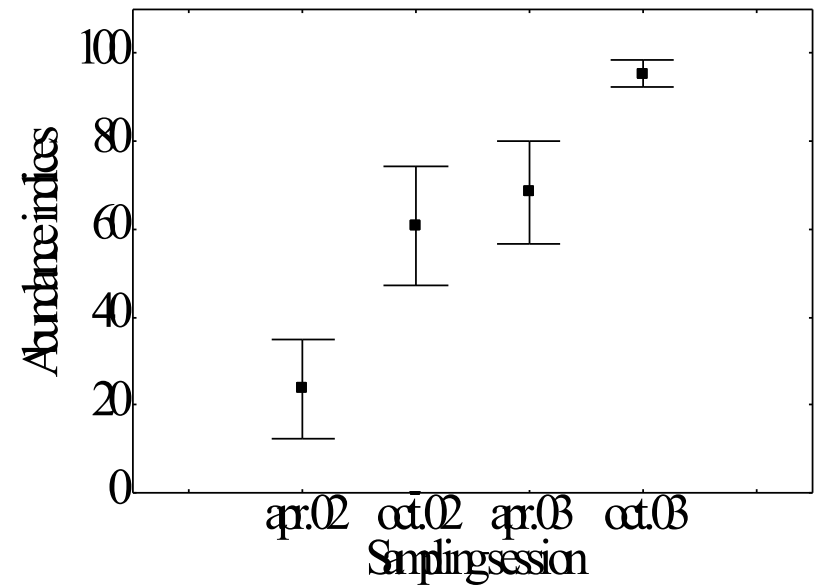
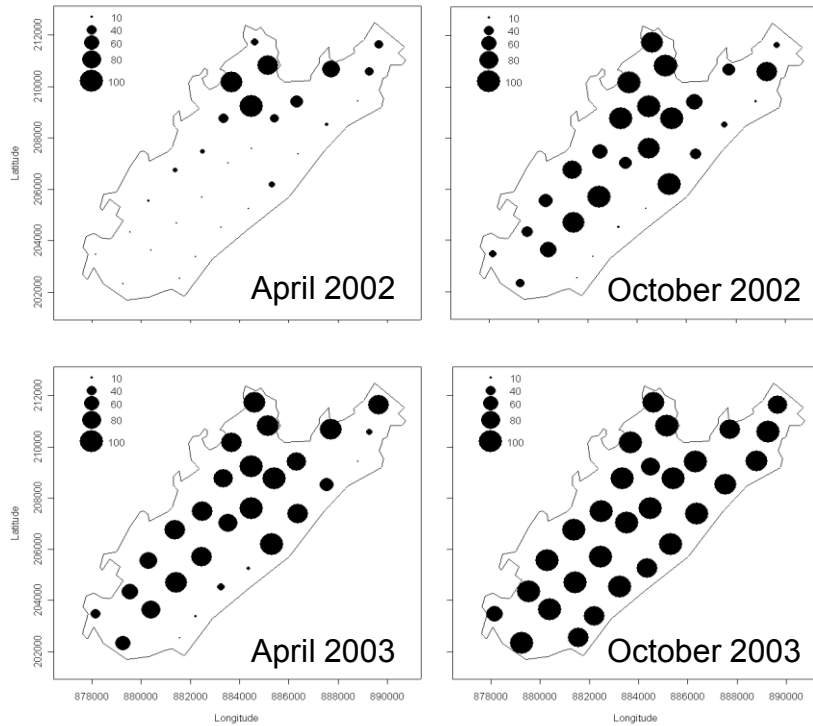


Canton Nozeroy
(pohoří Jura,
région Franche-
Comté)

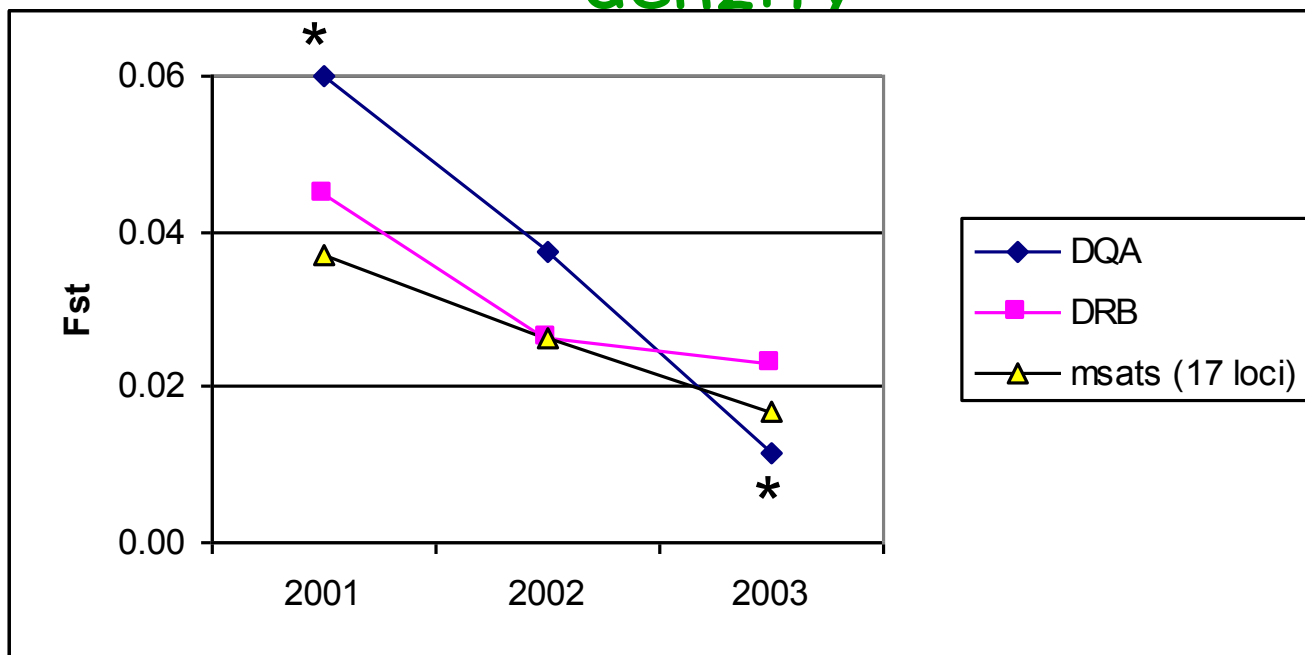


Studované lokality - 7 populací ve
stejně fázi populačního cyklu

→ 2001-2003: fáze růstu populační hustoty



Diferenciace populací v průběhu růstu denzity

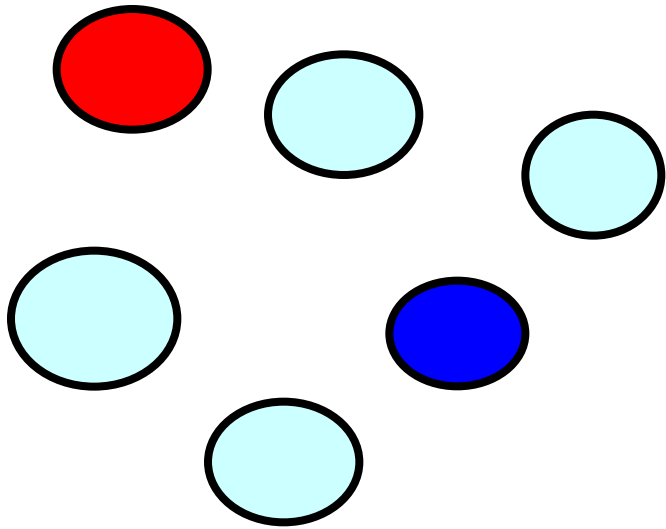


* Signifikantní rozdíl DQA1 vs. mikrosatelity

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

MHC (zejména DQA1) - signifikantně odlišné od mikrosatelitů

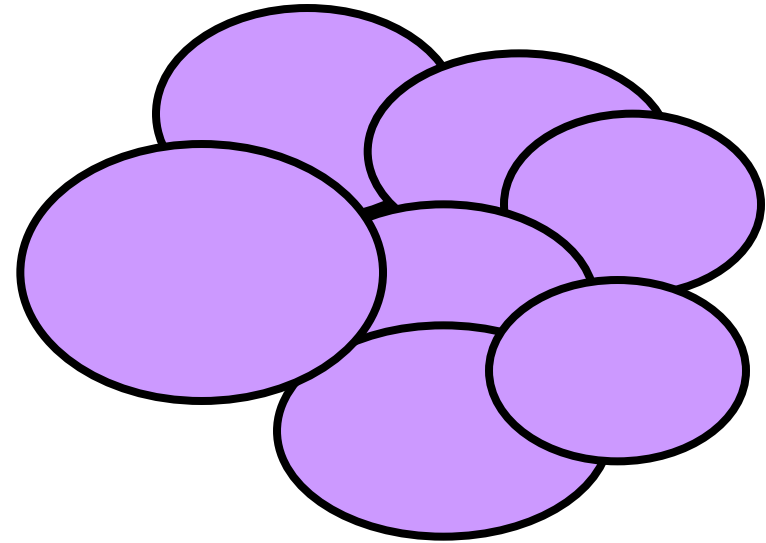
Závěr: Typ selekce na MHC závisí na početnosti populace



Nízká denzita

Lokální rozdíly ve
společenstvech patogenů

**Lokální diverzifikující
selekce**



Vysoká denzita

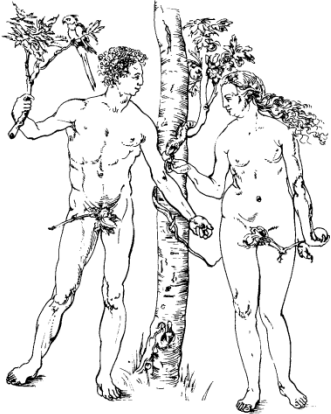
Nárůst diverzity
parazitů v důsledku
disperze

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)

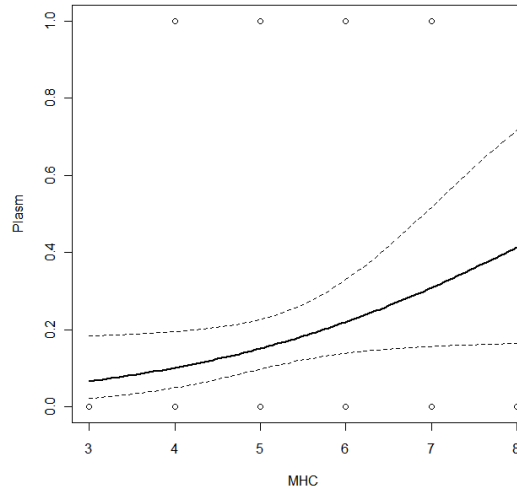
Výhoda heterozygotů - mají 2x více alel než homozygoti, tj. mohou rozeznávat 2x více patogenů



- 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

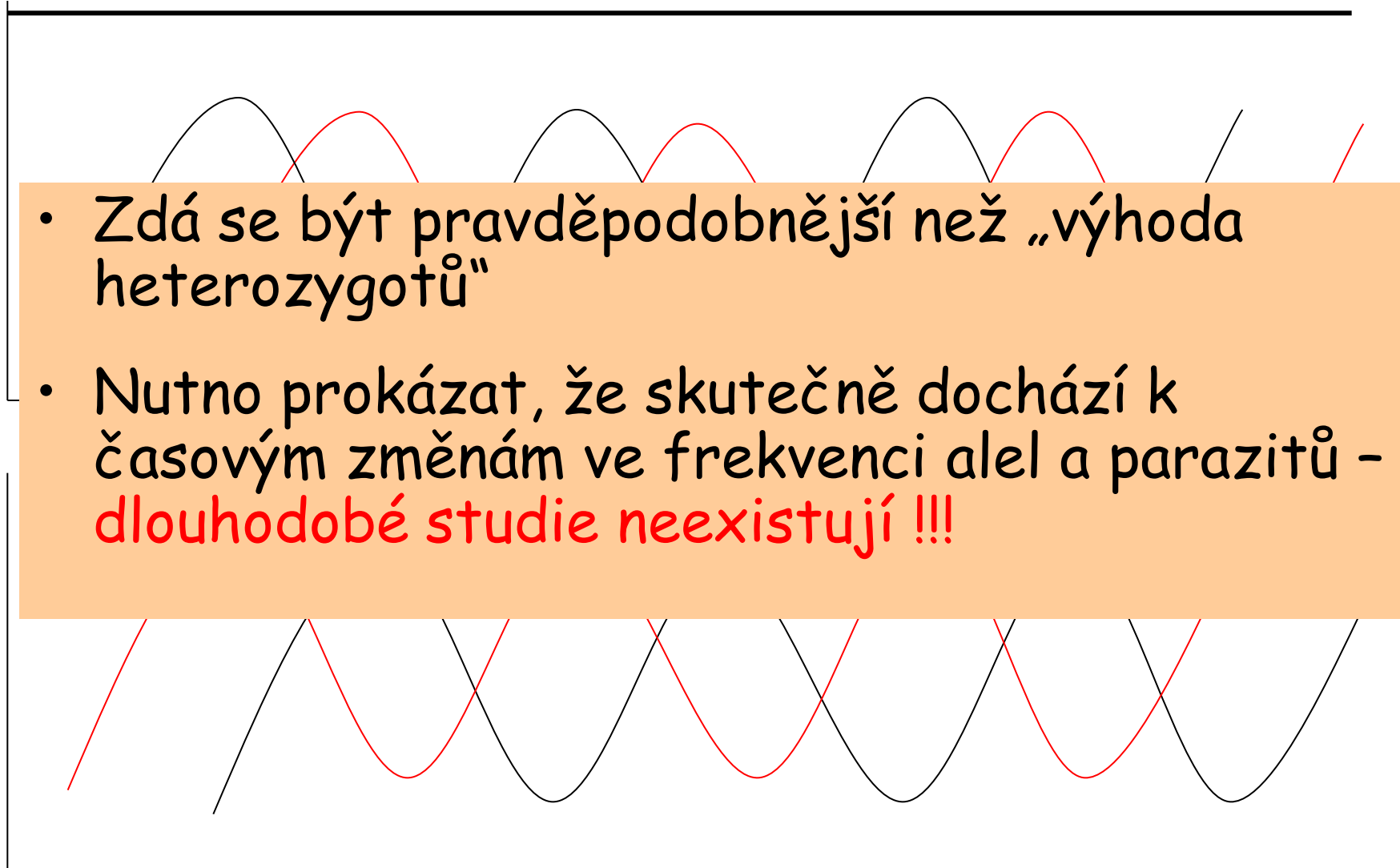
Frekvence alely

- Zdá se být pravděpodobnější než „výhoda heterozygotů“

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

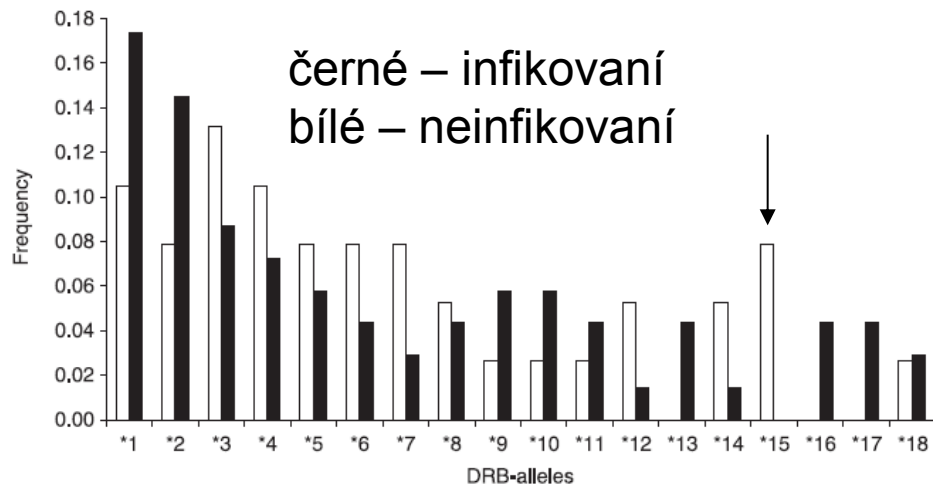
Frekvence parazita

Čas



Asociace MHC genů a parazitů

vajíčka Nematoda v trusu



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



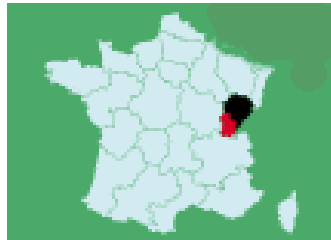
Microcebus murinus
(Schad et al., Evolution 2005)



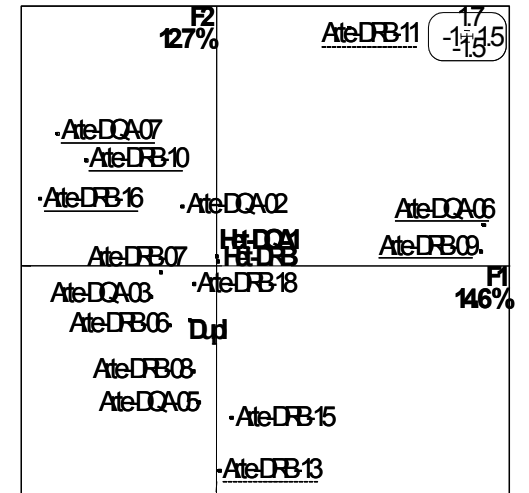
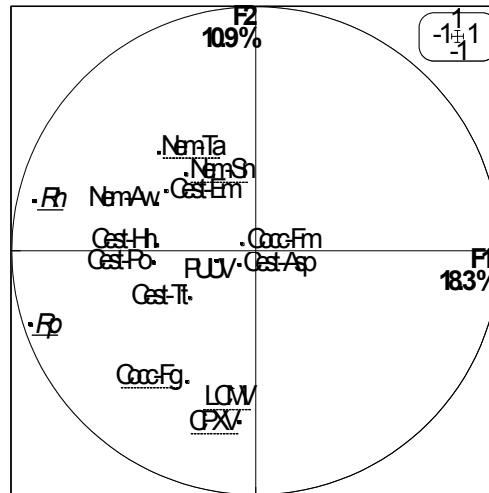
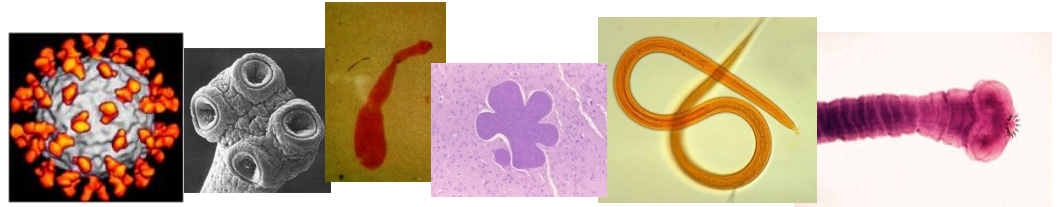
Apodemus flavicollis
(Meyer-Lucht & Sommer, Mol. Ecol. 2005)

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

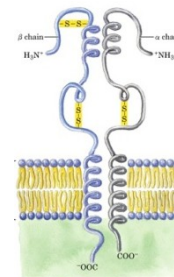
Př. *Arvicola terrestris* – hryzec vodní



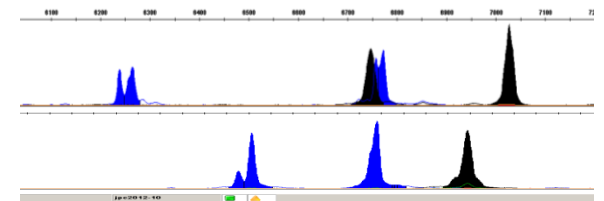
Canton Nozeroy (pohoří Jura, région Franche-Comté)



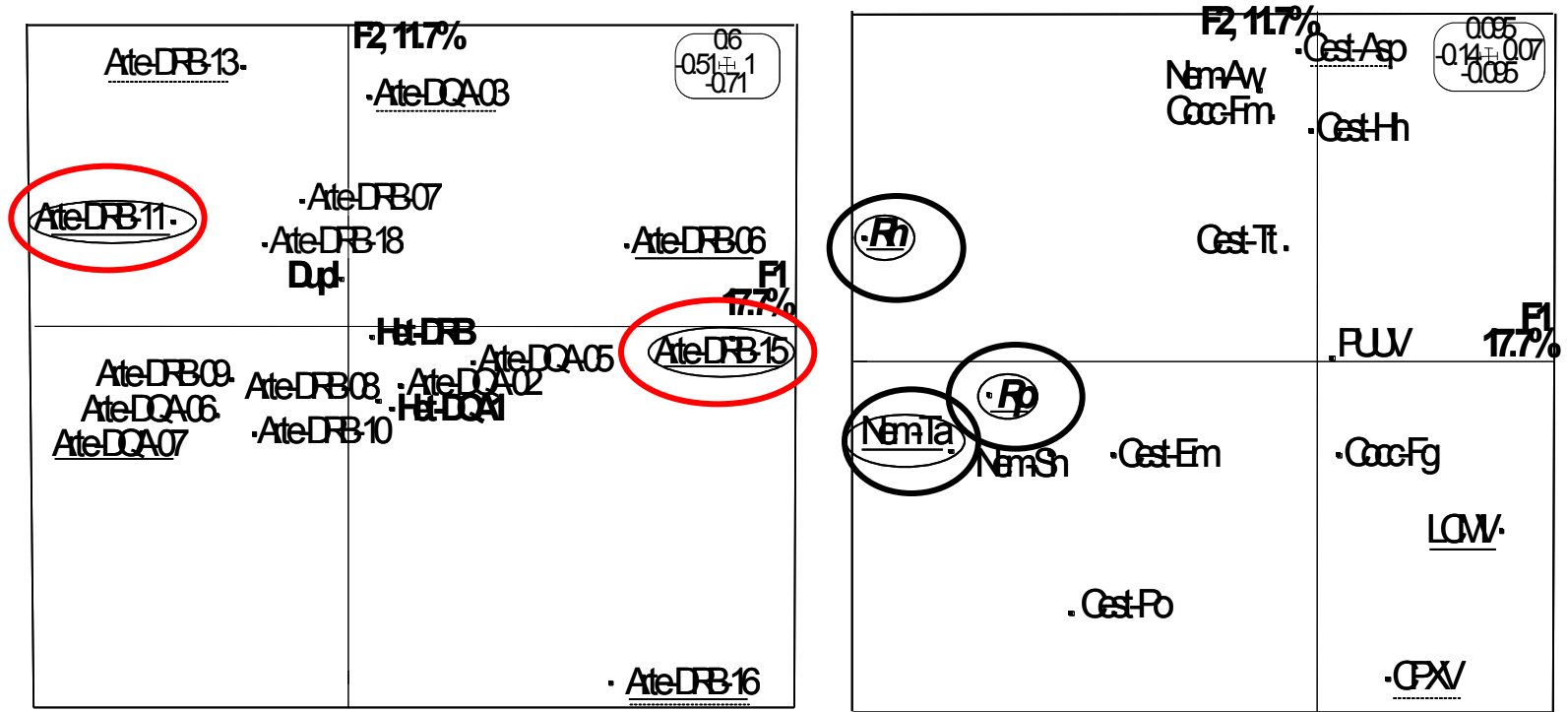
- 6 populací, 3 roky
- téměř kompletní parazitologická analýza (včetně některých virů)
- vícerozměrné analýzy



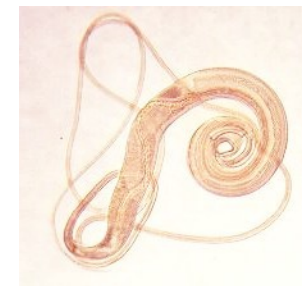
SSCP analýza



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