DETEKCE

SELEKCE

Testování neutrality vs. selekce

základní mírou relativního významu selekce a driftu je poměr *dN/dS* (ω)

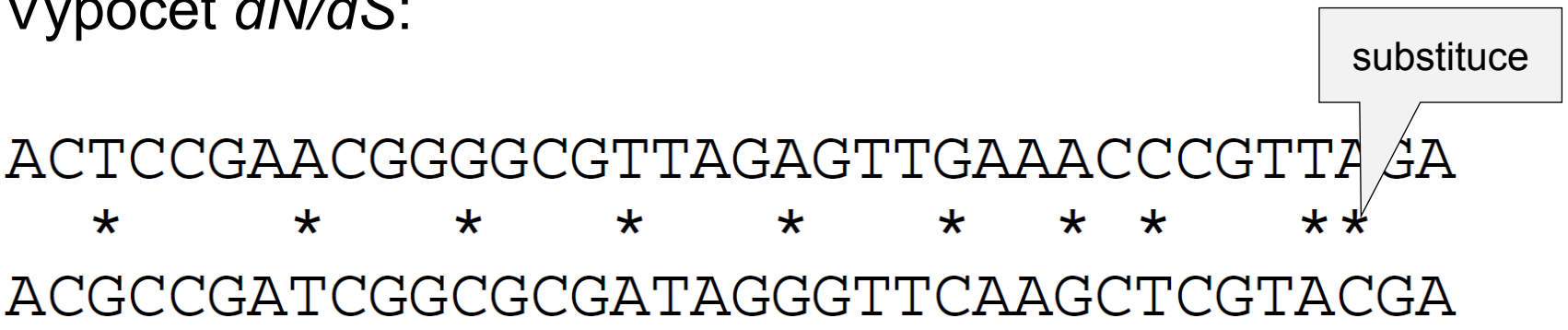
dN (d_N, K_a) = průměrný počet nukleotidových rozdílů mezi sekvencemi *na 1 nesynonymní pozici*

měří míru rozdílnosti 2 homologních kódujících sekvencí z hlediska aminokyselin, tj. do jaké míry se liší v nesynonymních pozicích

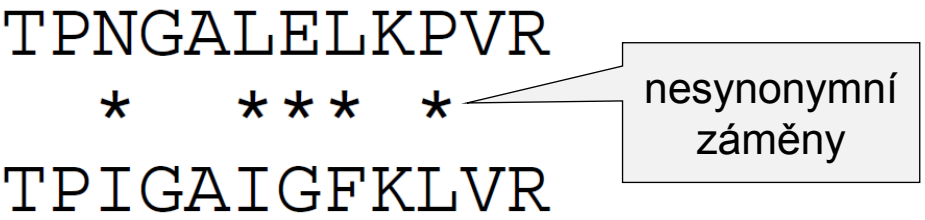
dS (d_S, K_s) = průměrný počet nukleotidových rozdílů mezi sekvencemi *na 1 synonymní pozici*

měří míru rozdílnosti 2 homologních kódujících sekvencí z hlediska tichých substitutcí, tj. do jaké míry se liší v synonymních pozicích

Výpočet *dN/dS*:

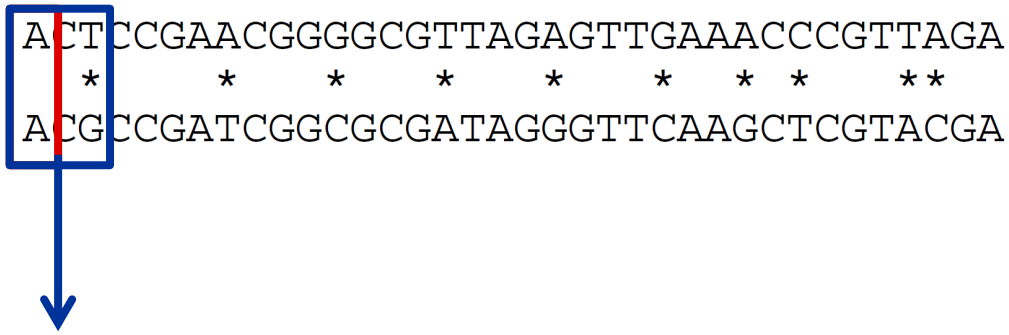


přepsáno do sekvencí aminokyselin:



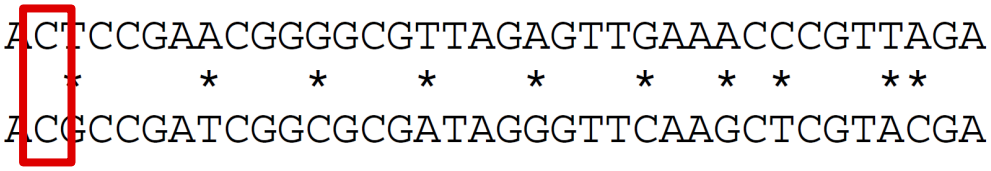
tj. 5 nesynonymních substitucí

protože celkový počet záměn je 10 (viz 10 hvězdiček mezi sekvencemi DNA), 5 musí být synonymních

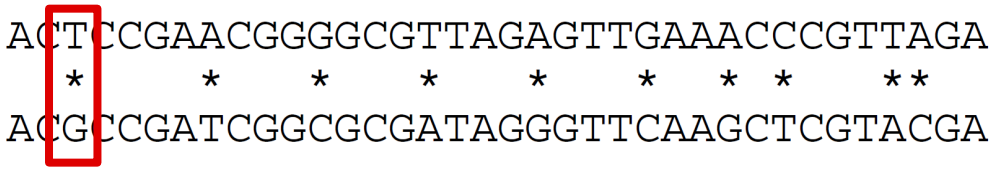


buď ACT (sekvence 1), nebo ACG (sekvence 2) ⇒ změna z A na kteroukoli bázi způsobí záměnu aminokyseliny (např. CCT, GCT, TCT)

⇒ pozice 1 je nesynonymní



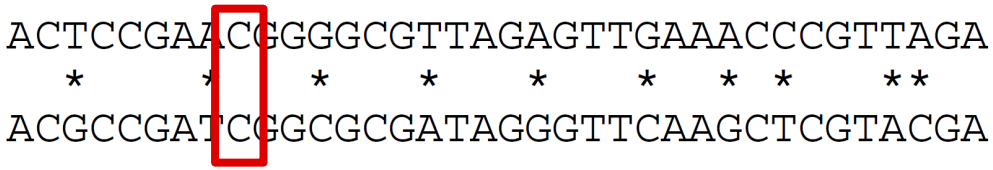
Pozice 2: podle genetického kódu každá substituce na 2. místě kodonu je nesynonymní



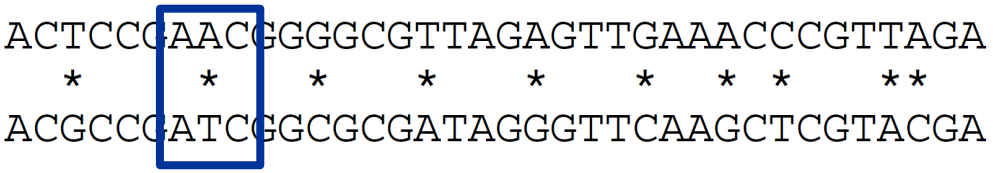
Pozice 3: 4 potenciální aminokyseliny lišící se ve 3. pozici – ACT, ACG, ACC, ACA $\rightarrow$ všechny kódují stejnou aminokyselinu (threonin, T) $\Rightarrow$ všechny substituce jsou synonymní $\Rightarrow$ pozice 3 je synonymní (tato pozice je 4-násobně degenerovaná)

pozice 4 (C v CCG): všechny substituce nesynonymní

pozice 5: nesynonymní atd.


ACTCCGAACGGGGCGTTAGAGTTGAAACCCGTTAGA
* * * * * * * **
ACGCCGATCGGCGCGATAGGGTTCAAGCTCGTACGA

Pozice 9:



Pozice 9: v sekvenci 1 = 3. pozice kodonu AAC (asparagin, N),
v sekvenci 2 kodon ATC (isoleucin, I)

mutace v AAC → AAT (asparagin, N), AAG, AAA (obě lysin, K) ⇒
C = 2-násobně degenerovaná → 9. pozice z 1/3 synonymní a
ze 2/3 nesynonymní

podobně mutace C v ATC → ATT, ATA (obě isoleucin, I), ATG (methionin,
M) ⇒ 3-násobně degenerovaná pozice – 2/3 synonymní, 1/3
nesynonymní

⇒ průměr ½(1/3 synonymních + 2/3 nesynonymních) +
½(2/3 synonymních + 1/2 nesynonymních)
= ½ synonymních a ½ nesynonymních

⇒ pozice 9 je částečně synonymní a částečně nesynonymní

site # 123456789111111111122222222223333333
012345678901234567890123456

syn 00100100$\frac{1}{2}$001001$\frac{1}{4}$0$\frac{1}{2}$00$\frac{1}{3}\frac{1}{3}$0$\frac{1}{3}$00$\frac{1}{3}$001001$\frac{1}{3}$0$\frac{2}{3}$ sum = 7.5833

non 11011011$\frac{1}{2}$110110$\frac{3}{4}$1$\frac{1}{2}$11$\frac{2}{3}\frac{2}{3}$1$\frac{2}{3}$11$\frac{2}{3}$110100$\frac{2}{3}$1$\frac{1}{3}$ sum = 28.4167

$$dN = \frac{\text{poč. nsyn substitucí}}{\text{poč. nsyn pozic}} = \frac{5}{28{,}417} = 0{,}176$$

$$dS = \frac{\text{poč. syn substitucí}}{\text{poč. syn pozic}} = \frac{5}{7{,}583} = 0{,}659$$

$$\frac{dN}{dS} = \frac{0{,}176}{0{,}659} = 0{,}269$$

Interpretace *dN/dS*:

1. všechny nesynonymní substituce jsou neutrální:

počet synonymních i nesynonymních neutrálních mutací fixovaných každou generaci = μ
$\Rightarrow$ $dN/dS = \mu/\mu = 1$

2. část nesynonymních substitucí je neutrálních, zbytek škodlivých:

$dS = \mu$

v každé generaci fixace f neutrálních nesynonymních mutací
$\Rightarrow$ $(1 - f)$ škodlivých mutací se nezafixuje

$dN = f\mu + (1 - f)0 = f\mu$

$dN/dS = f\mu/\mu = f$

Protože f je vždy < 1, platí $dN/dS < 1$

Závěr: $dN/dS < 1$ indikuje působení purifikující selekce

3. část f mutací je neškodných a $(1 - f)$ škodlivých; z neškodných mutací je část θ prospěšných a $(1 - \theta)$ neutrálních:

$dS = \mu$

$(1 - f)$ se nefixuje

$f(1 - \theta)$ neutrálních $\Rightarrow$ fixace frekvencí μ za generaci

$f\theta$ prospěšných, vznik rychlostí $2N\mu$ za generaci, pravděpodobnost fixace rovna selekčnímu koeficientu s

$\Rightarrow$ počet nesynonymních substitucí fixovaných každou generaci:
$dN = (1 - f)0 + f(1 - \theta)\mu + f\theta\, 2N\mu s$

$\Rightarrow dN/dS = [(1 - f)0 + f(1 - \theta)\mu + f\theta\, 2N\mu s]/\mu = f(1 - \theta) + f\theta\, 2Ns$

$dN/dS > 1$ pokud θ velká, konkrétně

$$\theta > \frac{1 - f}{f} \frac{1}{(2N - s)}$$

Závěr: *dN/dS* > 1 indikuje působení pozitivní selekce

Pozn.: *dN/dS* < 1 nemusí znamenat, že pozitivní selekce nepůsobí, pouze že ji tímto způsobem nemůžeme detekovat

Shrnutí:

1. *dN/dS* = 1: substituce aminokyselin převážně neutrální
   (ale: pozitivní selekce může vyrušit působení selekce purifikující)

Shrnutí:

2. $dN/dS < 1$: purifikující selekce
   (ale: některé AA mohly být fixovány pozitivní selekcí, purifikující selekce ale silnější)

3. $dN/dS > 1$: pozitivní selekce fixovala některé AA, některé substituce mohly být způsobeny driftem
   (ale: purifikující selekce mohla působit, ale nebyla dost silná, aby převážila nad selekcí pozitivní)

Kromě výpočtu synonymních a nesynonymních pozic a synonymních a nesynonymních substitucí nutná ještě korekce pro opakované substituce na téže pozici

→ pro výpočty nutné zjednodušující předpoklady, navíc nemůžeme přesně zjistit počet opakovaných substitucí

Odhad pomocí maximální věrohodnosti (*maximum likelihood*): simultánní odhad všech 3 kroků současně

poskytuje navíc odhad doby divergence a poměr Ts/Tv

Ke kvantifikaci počtu substitucí lze:

rekonstruovat ancestrální sekvenci a spočítat změny na jednotlivých pozicích (výsledek bude pravděpodobně podhodnocený)

bayesovský přístup: použít substituční rychlosti (v apriorních kategoriích)

generovat substituční rychlosti pro jednotlivé kodony

Tajimův test neutrality

měření rovnováhy mutace a driftu pomocí heterozygotnosti $\theta = 4N_e\mu$

θ lze odhadovat i jinými způsoby:

π_{ij} = počet párových rozdílů (SNP) mezi sekvencemi *i* a *j*
(... celkem $n(n-1)/2$ možných párových srovnání)

$$\hat{\pi} = \frac{\sum_{i=1}^{j}\sum_{j=2}^{n}\pi_{ij}}{\frac{n(n-1)}{2}}$$

suma párových rozdílů

počet párových srovnání

v případě DNA sekvencí dělíme ještě jejich délkou

S = počet segregujících pozic: $\Theta = \frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1}\left(\frac{1}{i}\right)}$

1/1 + 1/2 + ... + 1/(*n* – 1)

při modelu nekonečných pozic a neutrální evoluci platí:

$$\hat{\pi} = \Theta$$

Fumio Tajima (1989): $$D = \frac{\hat{\pi} - \Theta}{\sqrt{\mathrm{Var}(\hat{\pi} - \Theta)}}$$

Př.:

```
      *  *          *          *
1    ACCCG AATTC CAATC CGGTT
2    AACTG AATTC GAATC CGGTT
3    AACTG AATTC CAATC CGGTT
4    ACCTG AATTC TAATC CGGAT
```

párová srovnání:
1-2: 3 rozdíly
1-3: 2 rozdíly
1-4: 3 rozdíly
2-3: 1 rozdíl
2-4: 3 rozdíly
3-4: 3 rozdíly
prům. π = (3+2+3+1+3+3)/6 = 2,5

S = 4 segregující pozice

Θ = 4/(1/1 + 1/2 + 1/3) = 4/1,83 = 2,186 $\hat{\pi}$ - Θ = 2,5 – 2,186 = 0,314

$D < 0$:

nadbytek polymorfismů s nízkou frekvencí vzhledem k teoretickému předpokladu $\Rightarrow$ purifikující selekce, *selective sweep*
(+ populační expanze!)

$D > 0$:

nadbytek polymorfismů s nízkou i vysokou frekvencí vzhledem k předpokladu $\Rightarrow$ balancující selekce (+ redukce populační velikosti!)

Signifikance?

nelze použít klasické *P*

Tajima (1989): parametrická aproximace beta rozdělením

Hudson (1990): generování náhodných vzorků za předpokladu neutrality a populační stability $\rightarrow$ hodnota *P* = podíl náhodných výsledků $\leq$ vypočtené *D*

Value of Tajima's *D*	Mathematical reason	Biological interpretation 1	Biological interpretation 2
Tajima's *D*=0	Pi equivalent to Theta (Observed= Expected). Average Heterozygosity= # of Segregating sites.	Observed variation similar to expected variation	Population evolving as per mutation-drift equilibrium. No evidence of selection
Tajima's *D*<0	Pi less than Theta (Observed<Expected). Fewer haplotypes (lower average heterozygosity) than # of segregating sites.	Rare alleles present at low frequencies	Recent selective sweep, population expansion after a recent bottleneck, linkage to a swept gene
Tajima's *D*>0	Pi greater than Theta (Observed>Expected). More haplotypes (more average heterozygosity)than # of segregating sites.	Multiple alleles present, some at low, others at high frequencies	Balancing selection, sudden population contraction

McDonaldův-Kreitmanův test

John H. McDonald and Martin Kreitman (1991):

srovnání vnitrodruhového polymorfismu a mezidruhové divergence

D_s = počet synonymních substitucí*) na sekvenci
D_n = počet nesynonymních substitucí na sekvenci
P_s = počet synonymních polymorfních pozic na sekvenci
P_n = počet nesynonymních polymorfních pozic na sekvenci

H_0: $D_n/D_s = P_n/P_s \Rightarrow$ neutrální evoluce

H_1: $D_n/D_s \neq P_n/P_s \Rightarrow$ selekce

*) substituce = u 2 druhů fixována odlišná báze

negativní (purifikující) selekce:

škodlivé mutace silně ovlivňují polymorfismus

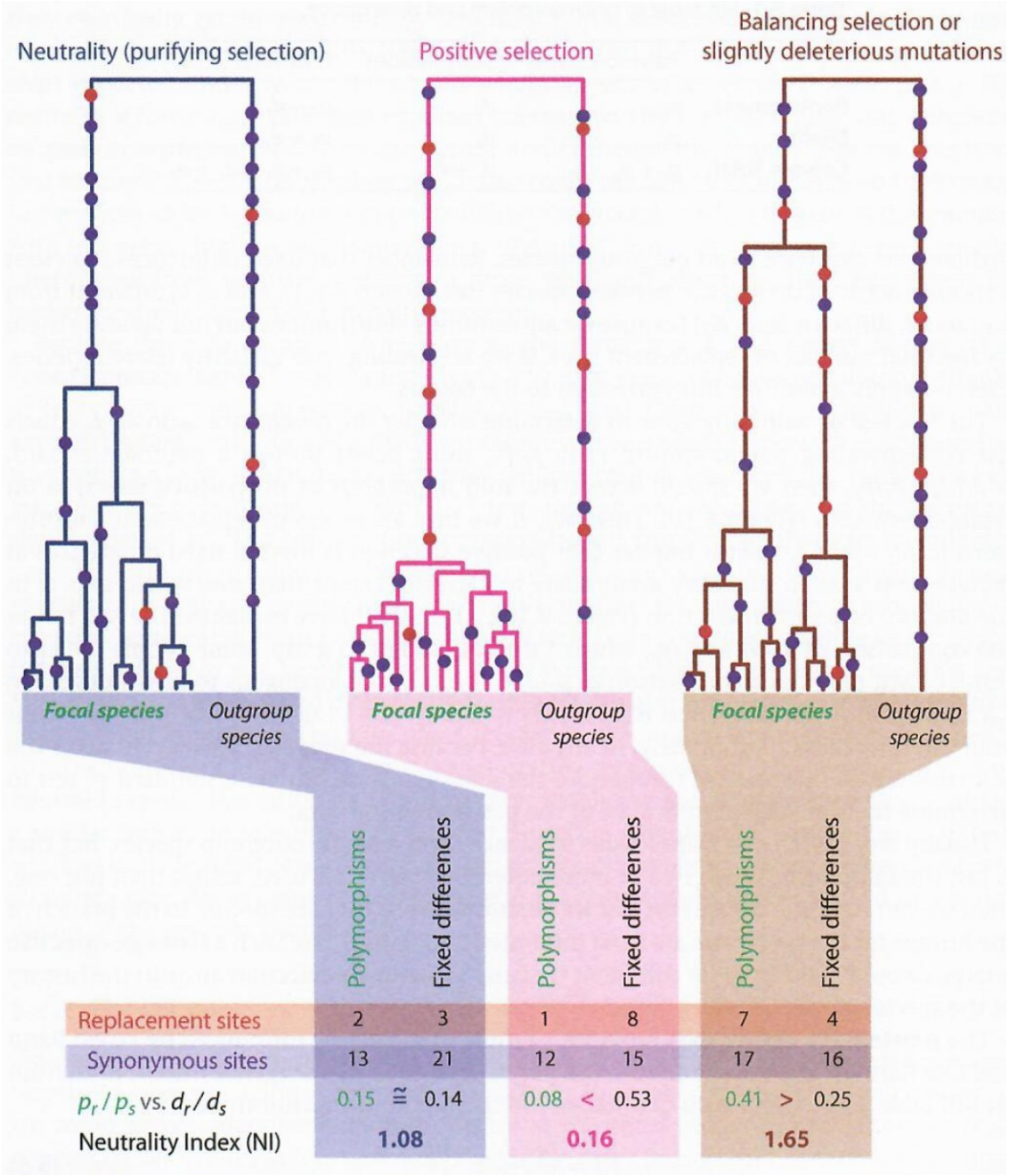
$D_n/D_s < P_n/P_s$, tj. poměr nesynonymní/synonymní variability mezi druhy je nižší než poměr nesynonymní/synonymní variability uvnitř druhů

pozitivní selekce:

prospěšně mutace se rychle šíří $\Rightarrow$ neovlivňují polymorfismus, ale mají vliv na mezidruhovou divergenci

$D_n/D_s > P_n/P_s$, tj. poměr nesynonymní/synonymní variability mezi druhy je vyšší než poměr nesynonymní/synonymní variability uvnitř druhů

podíl substitucí fixovaných selekcí: $\alpha = 1 - \frac{D_s P_n}{D_n P_s}$


Neutrality (purifying selection)
Positive selection
Balancing selection or slightly deleterious mutations
Focal species
Outgroup species
Focal species
Outgroup species
Focal species
Outgroup species
Polymorphisms
Fixed differences
Polymorphisms
Fixed differences
Polymorphisms
Fixed differences
Replacement sites
2
3
1
8
7
4
Synonymous sites
13
21
12
15
17
16
p_r / p_s vs. d_r / d_s
0.15 ≅ 0.14
0.08 < 0.53
0.41 > 0.25
Neutrality Index (NI)
1.08
0.16
1.65

Problémy MKT:

podhodnocení α v důsledku existence mírně škodlivých mutací,
odlišných mutačních rychlostí v různých částech genomu,
proměnlivosti v koalescenčních historiích různých částí genomu,
změn v efektivní velikosti populace

$\times$ tyto problémy ale neznamenají, že MKT považován za nespolehlivý

další potenciální problém: *infinite-sites model*

$\rightarrow$ často odchylky od modelu uvnitř druhů, tím větší v mezidruhových srovnáních

Detekce selekce na úrovni kodonů

Které kodony pod pozitivní/negativní selekcí?

substituční model, fylogenetický strom, výpočet *dN/dS* pro každý kodon

v případě sekvencí složených z více jedinců (např. viry) odhad pozitivní selekce na úrovni populace

Kdy v minulosti selekce působila?

dN/dS mapováno na jednotlivé větve fylogenetického stromu

Působí selekce uvnitř rekombinujících fragmentů?

např. program CODEML, balík Datamonkey

(http://www.datamonkey.org)