MODULARIZACE VÝUKY EVOLUČNÍ A EKOLOGICKÉ BIOLOGIE
CZ.1.07/2.2.00/15.0204

Exprimované geny a přírodní selekce

Produkty funkčních genů a jejich význam v ekologických studiích

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Geny a adaptace

- studium selekčních tlaků daných prostředím a evoluční odpovědi na ně → vznik **adaptací,** tj. **geneticky** podmíněné přizpůsobení se prostředí (vs. fenotypová plasticita)

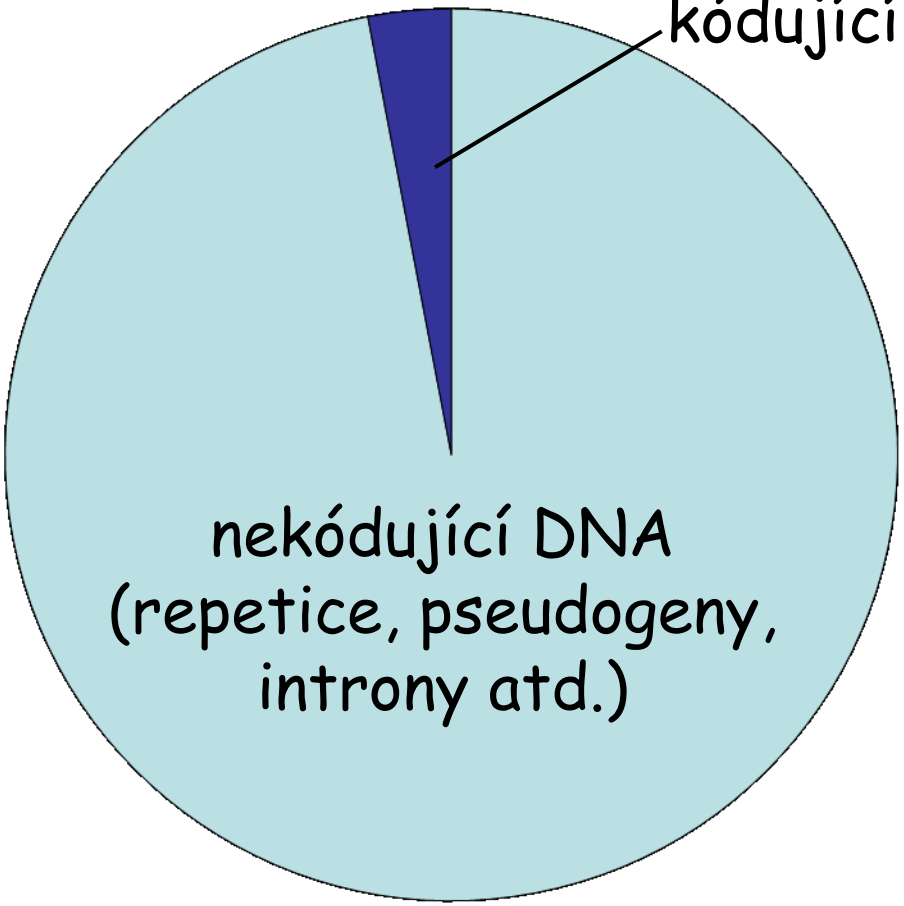
- **např. interakce s abiotickým prostředím**

Proč geny v molekulární ekologii?

- Geny mají funkční význam – geneticky determinovaný polymorfismus
- -> studium **proximátních 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



fenotyp

přírodní výběr

adaptace ke
specifickému
prostředí

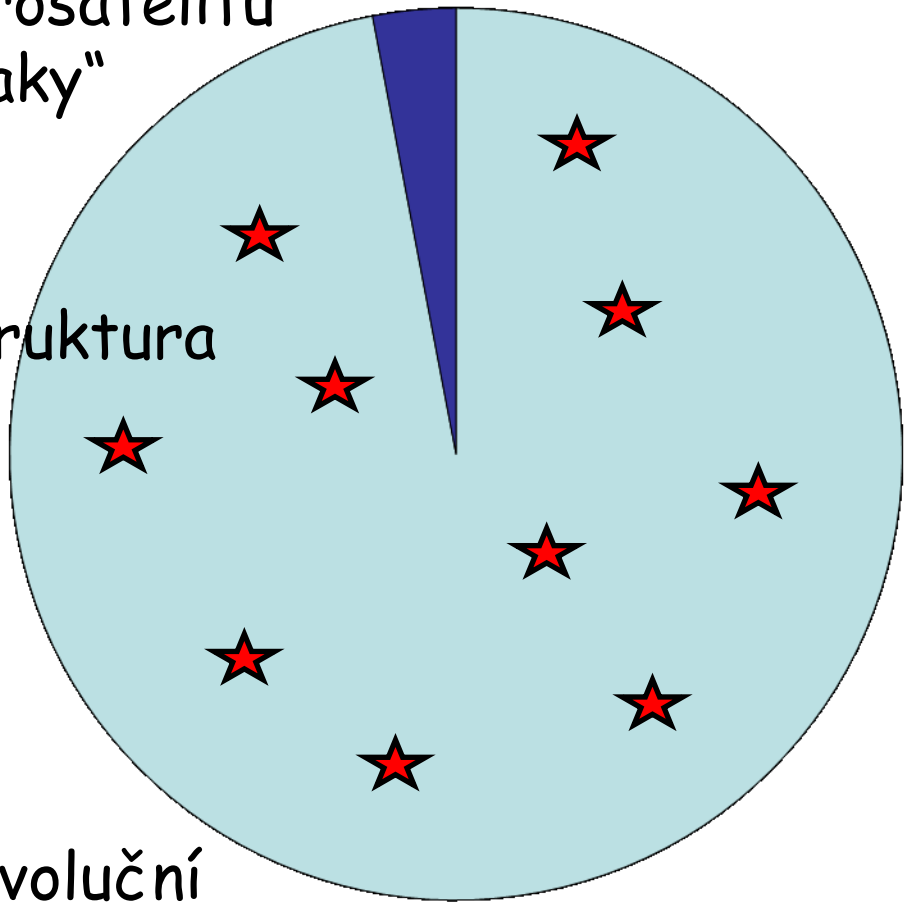
97% lidské DNA nic nekóduje!!!

Jak relevantní je informace získaná z genetických dat

Příklad: 10 microsatelitů
= „neutrální znaky“

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

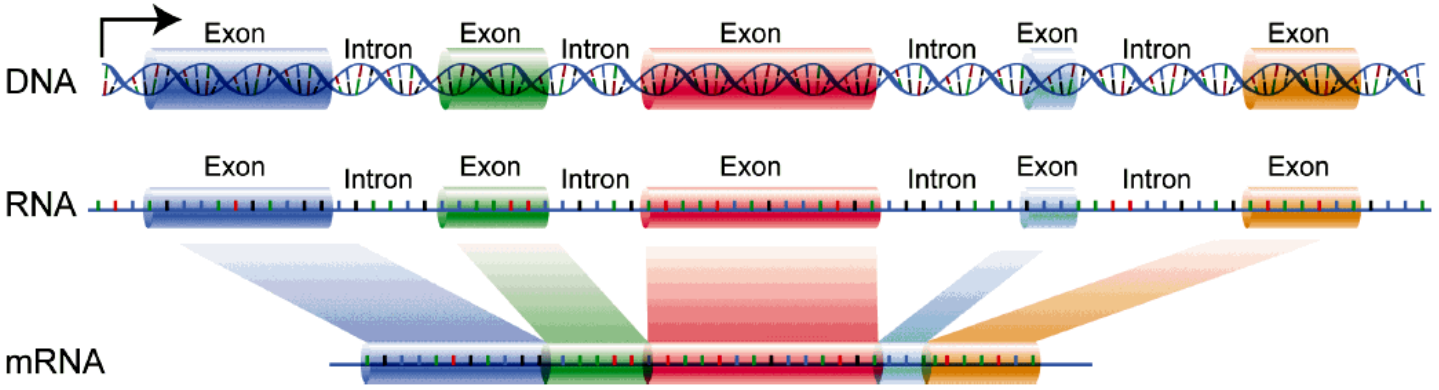
- X adaptace
- X proximátní evoluční mechanismy



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

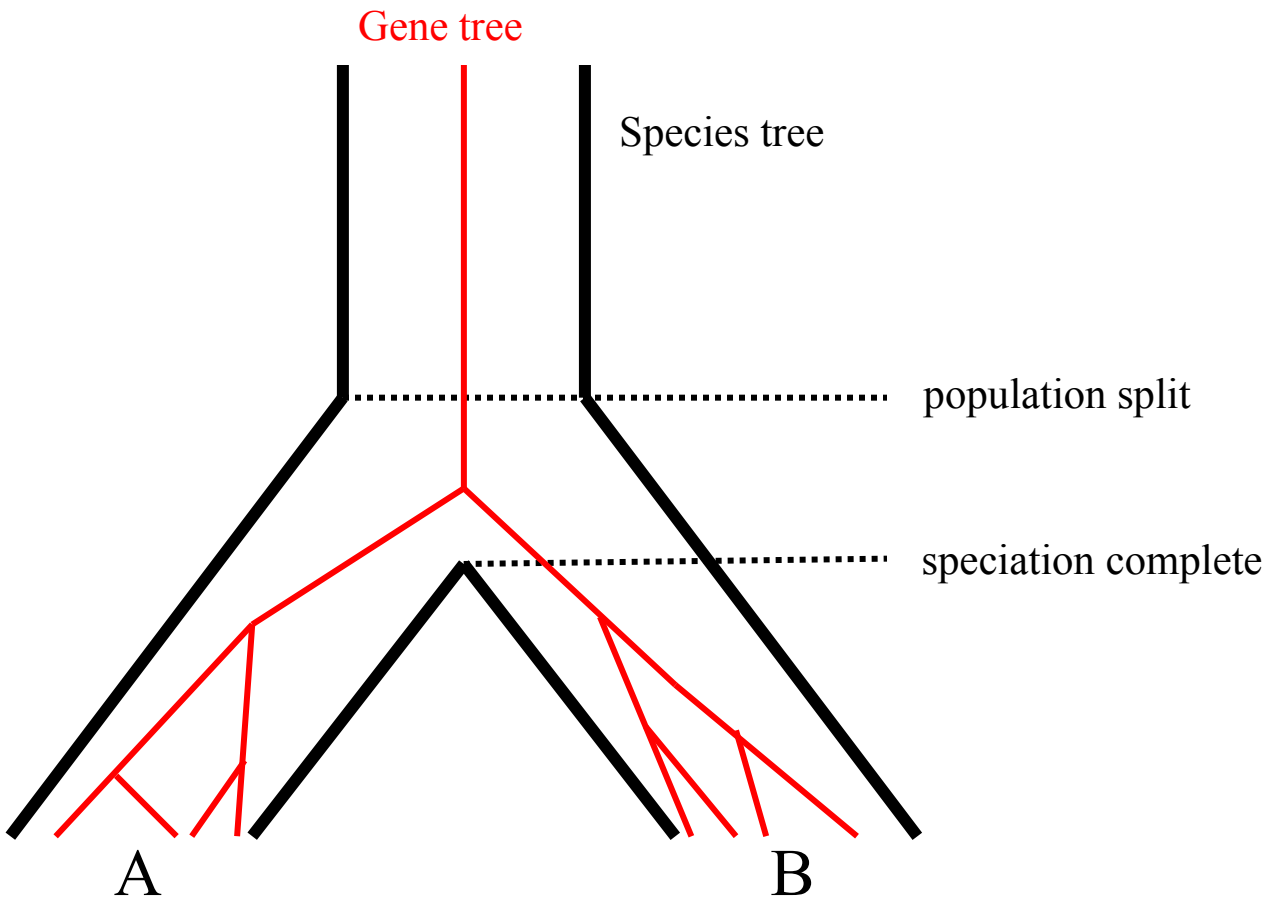
→ 3rd position evolves neutrally
→ 1st and 2nd position under selection

Jak poznat, že na daný gen působí selekce?

- **Fylogenetická analýza** (detekce na úrovni sekvencí)
- **Populačně-genetická analýza** (detekce na úrovni frekvence alel)

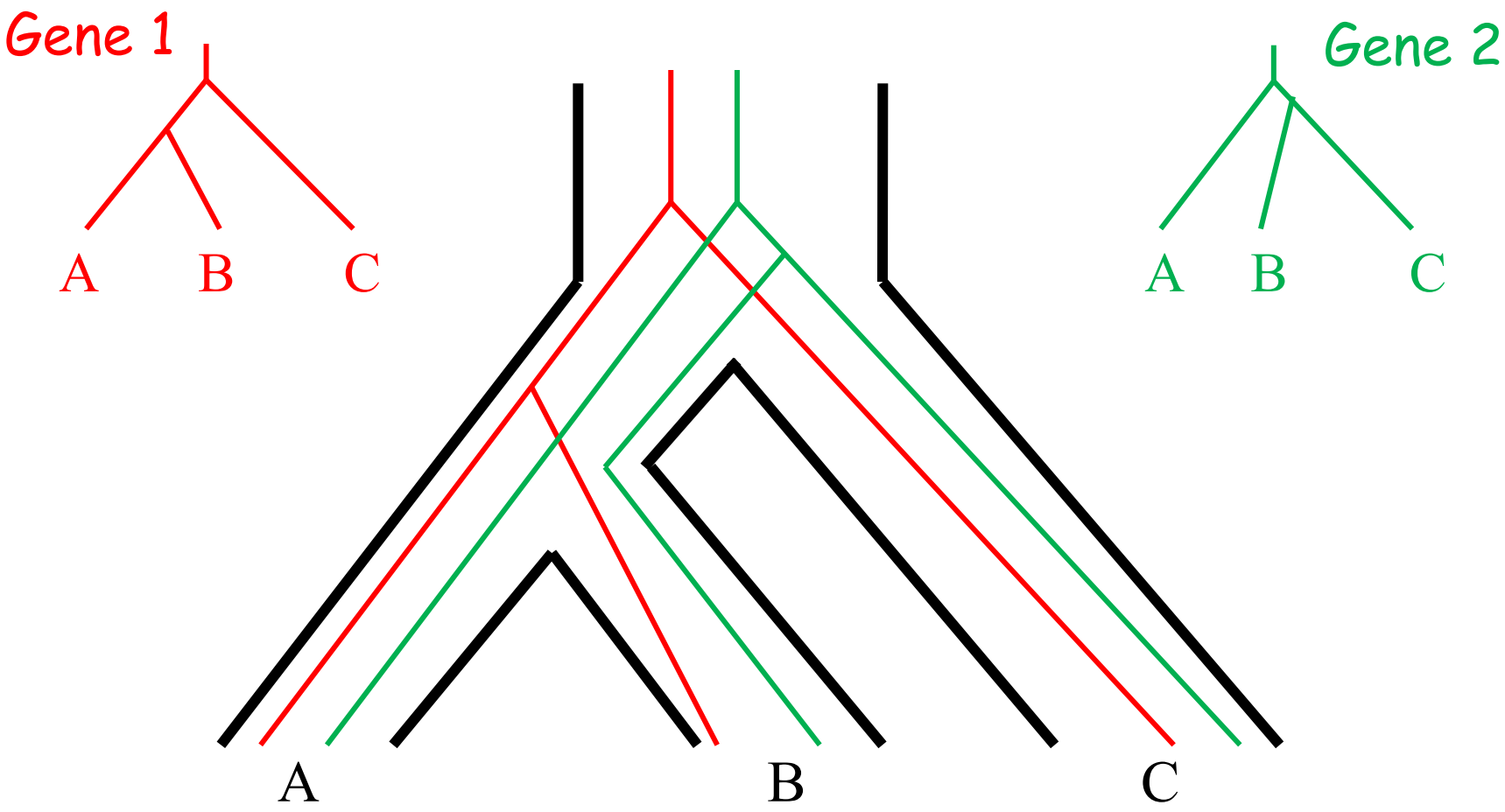
Jak poznat, že na daný gen působí selekce?

- Gene-tree versus species tree



Studium selekce – fylogenetická analýza

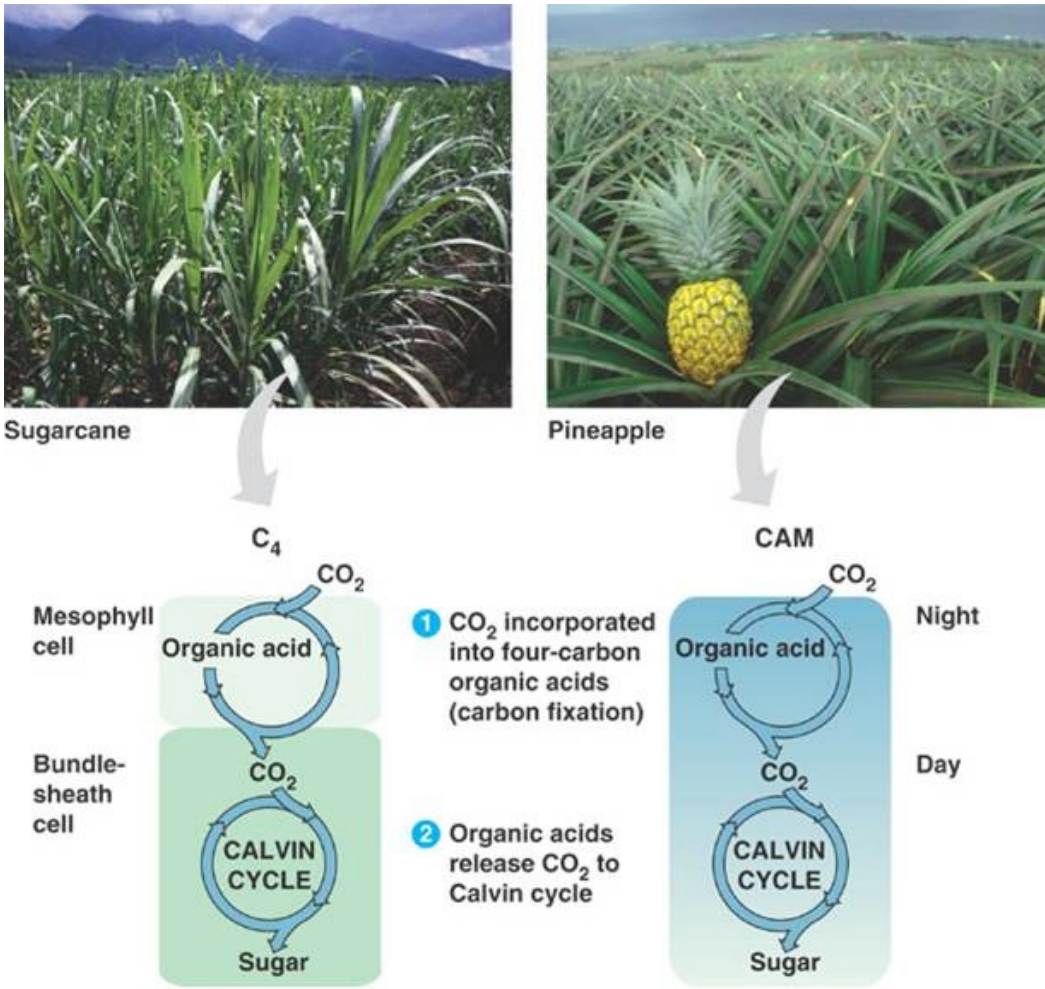
- Gene-tree versus species tree



Studium selekce – fylogenetická analýza

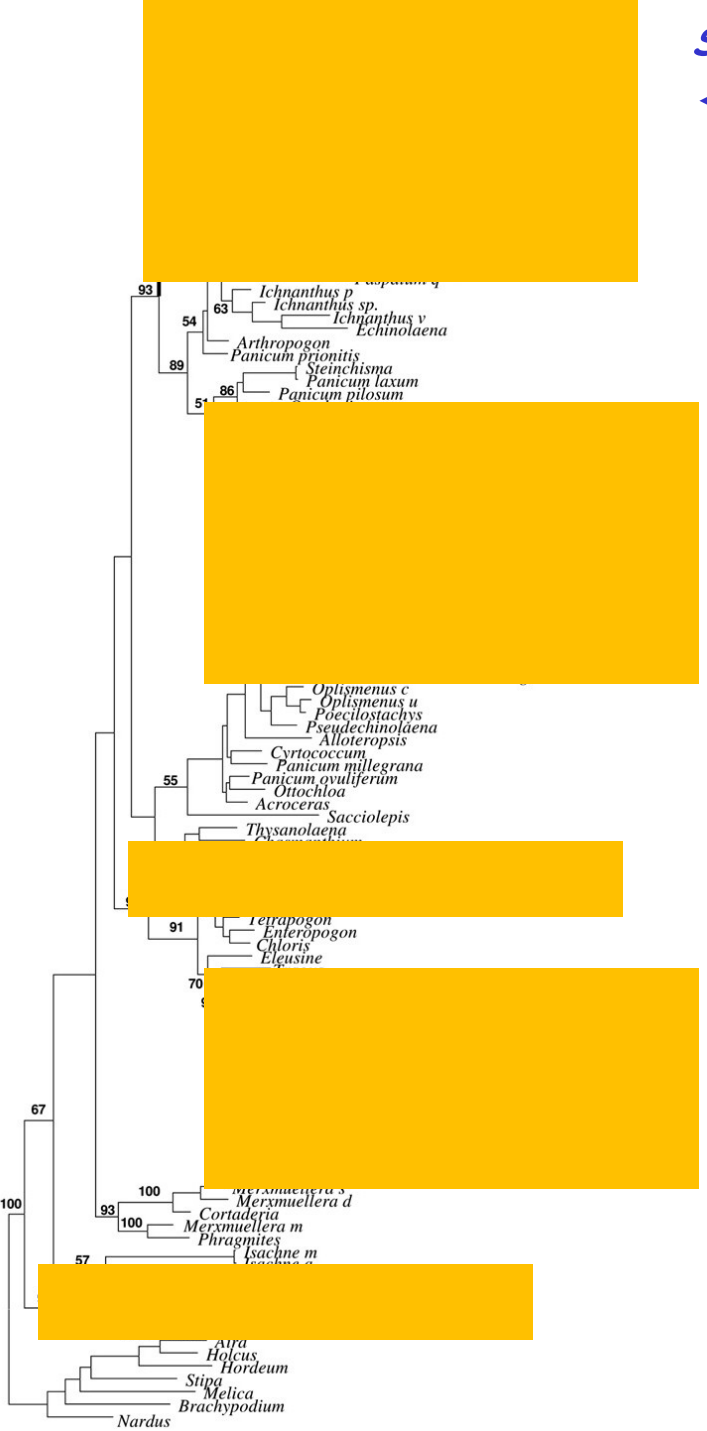
- Gene-trees & Selection: The case of C4 photosynthesis

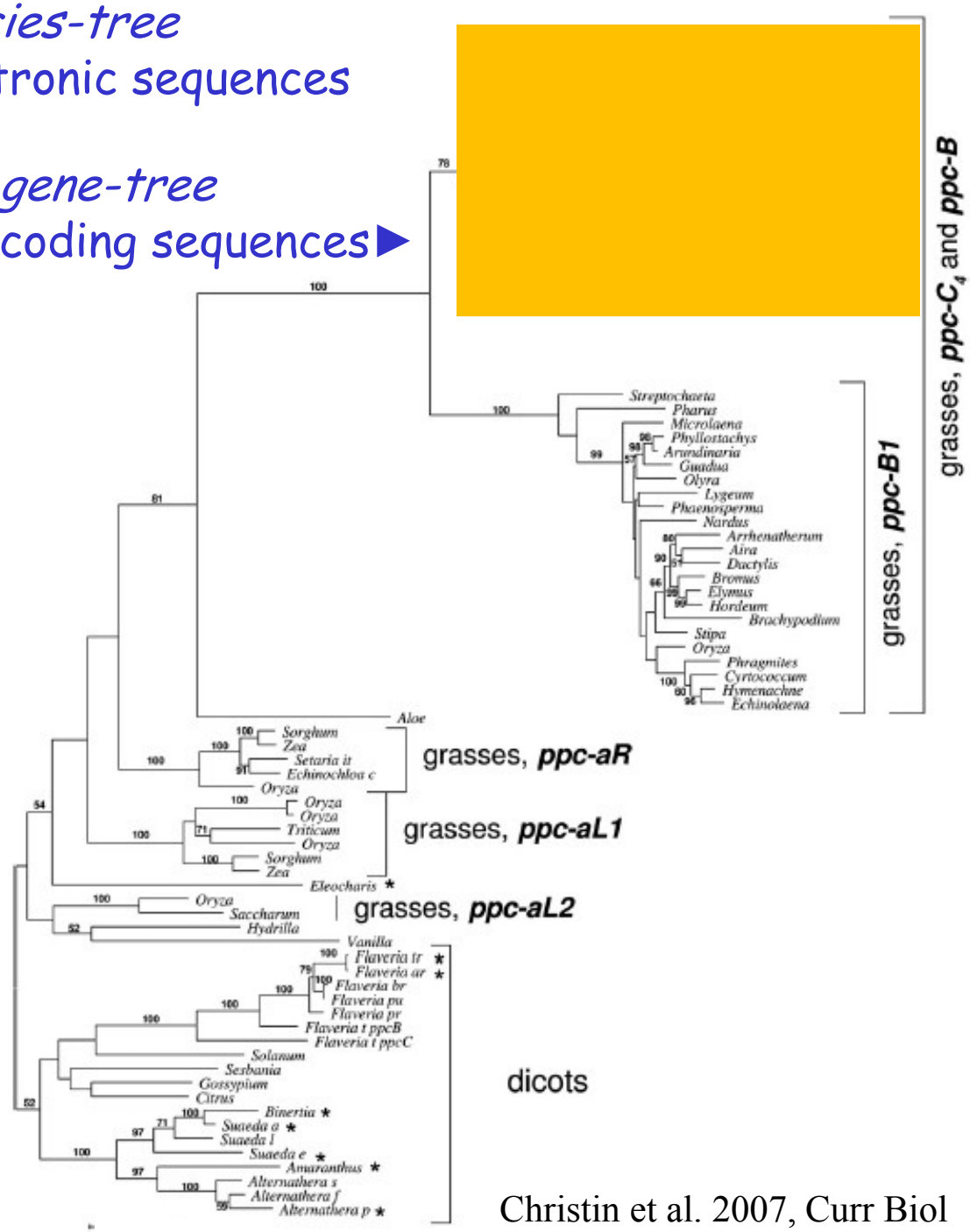
- Christin et al. 2007, Curr Biol
- *PEPC* gene
- →C4 photosynthesis



species-tree
◀intronic sequences

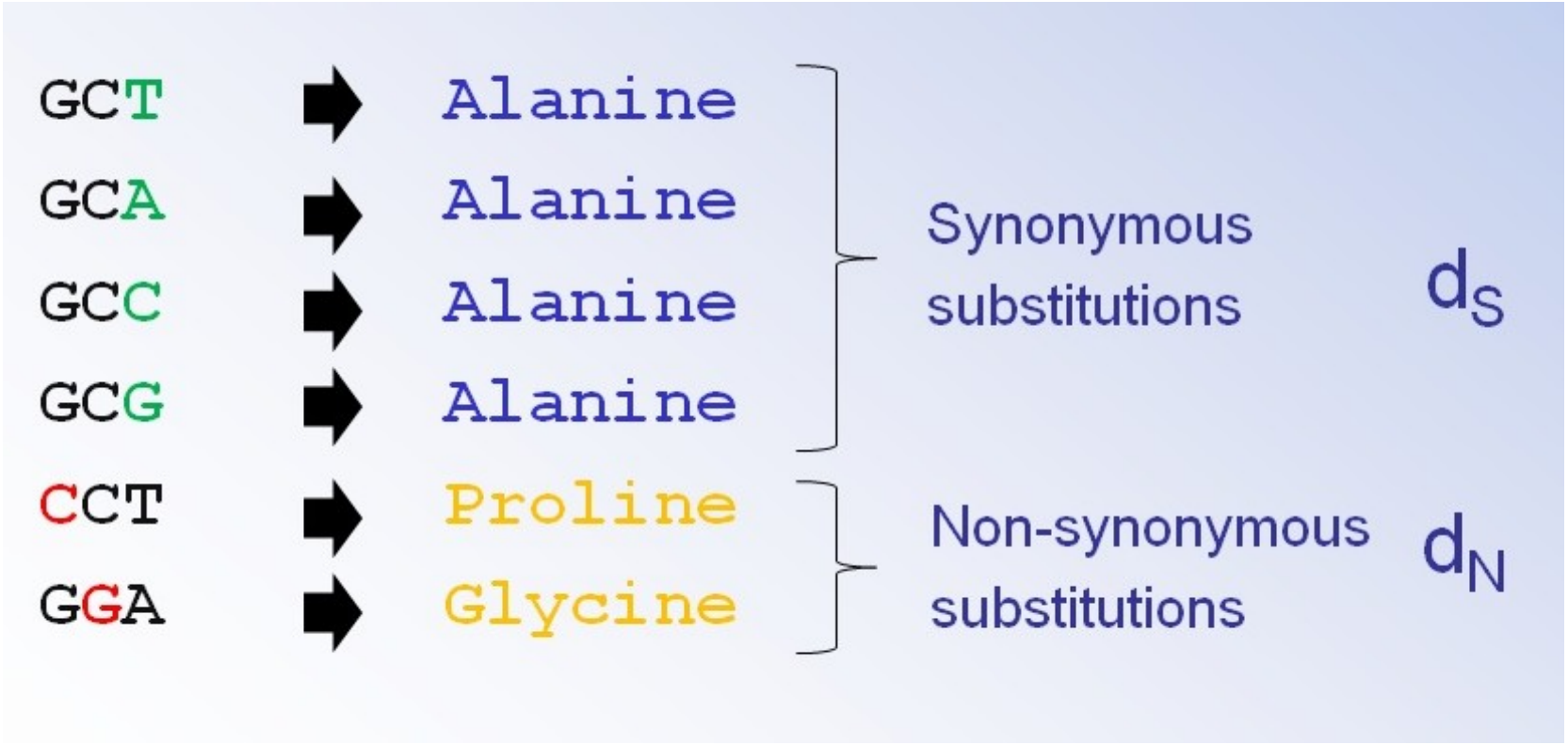
gene-tree
coding sequences▶





Christin et al. 2007, Curr Biol

Selekce na úrovni sekvencí



Selekce na úrovni sekvencí

- Testing for selection: d_N/d_S

d_S Rate of synonsymous substitutions, 'neutral' evolutionary rate

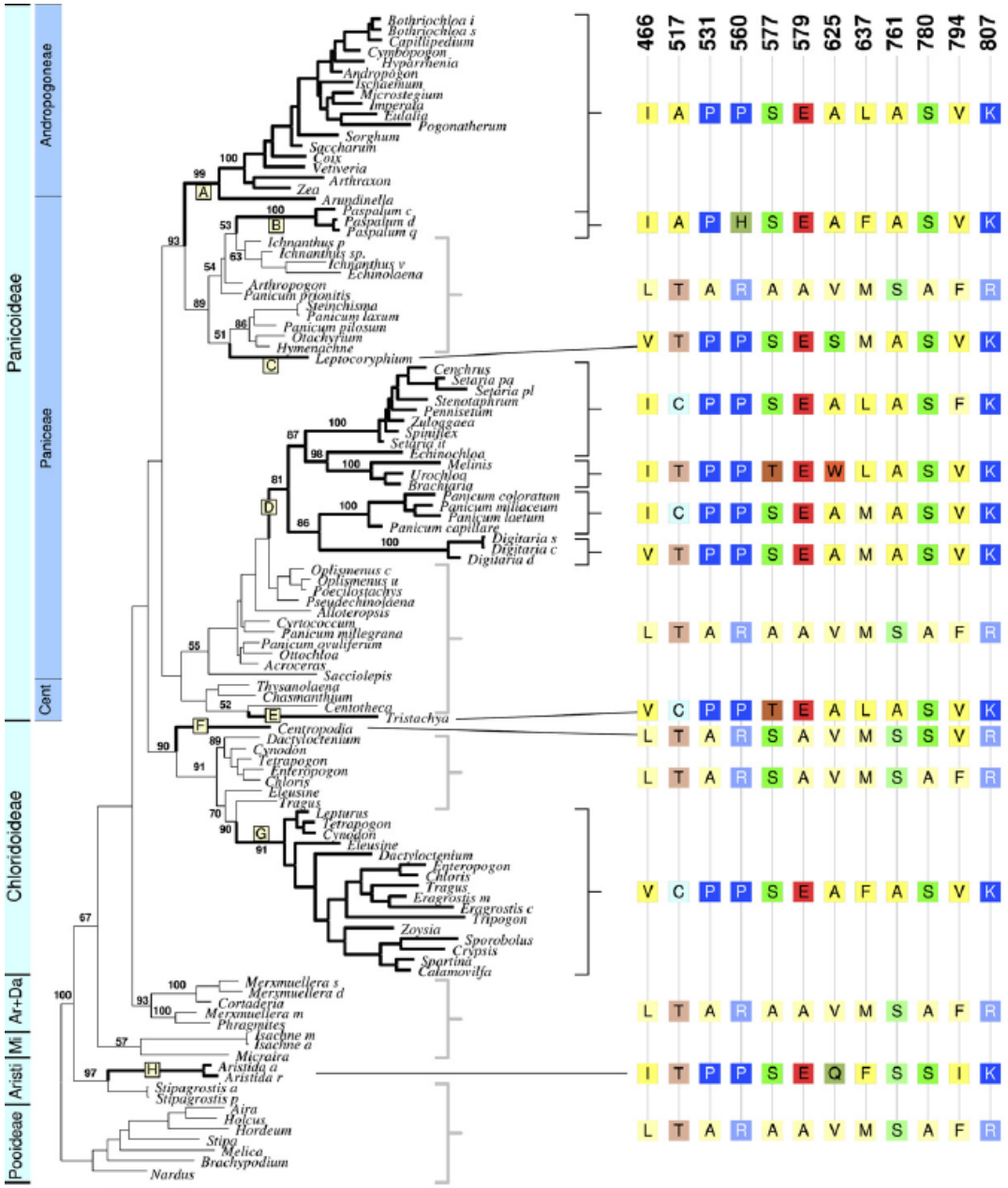
d_N Rate of non-synonsymous substitutions

- $d_N/d_S = 1$ as many syn as non-syn substitutions → neutral evolution
- $d_N/d_S < 1$ less non-syn than syn substitutions → purifying selection
- $d_N/d_S > 1$ more non-syn than syn substitutions → positive selection

◀intronic sequences

coding sequences▶ without positively selected sites

Christin et al. 2007, Curr Biol



PEPC gene

12 codons with $d_N/d_S > 1$

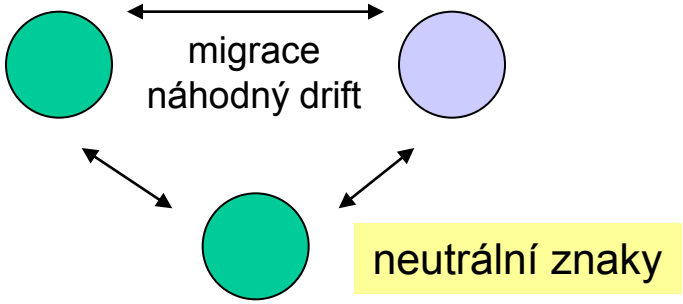
Sequences of unrelated but ecologically similar species more similar at these positions than they are in related species.

→ convergent evolution!

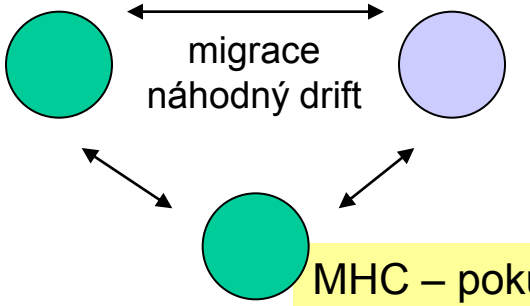
Christin et al. 2007, Curr Biol

Studium selekce – populačně-genetická analýza

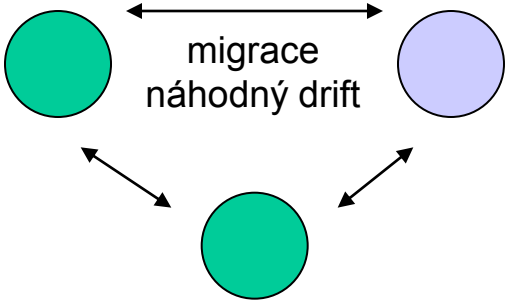
- Srovnání populačně-genetické struktury na MHC genech a neutrálních znacích (mikrosatelity)



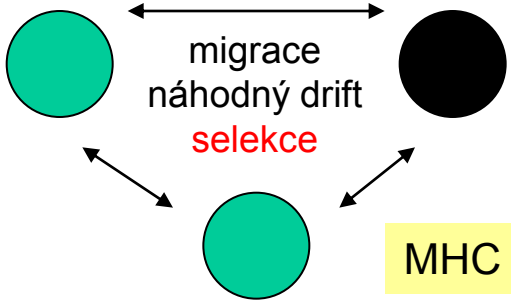
neutrální znaky



MHC – pokud nepůsobí selekce

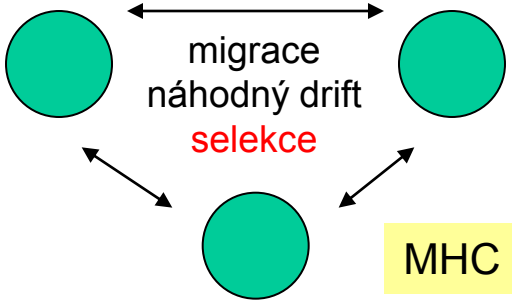


neutrální znaky



MHC

diverzifikující selekce



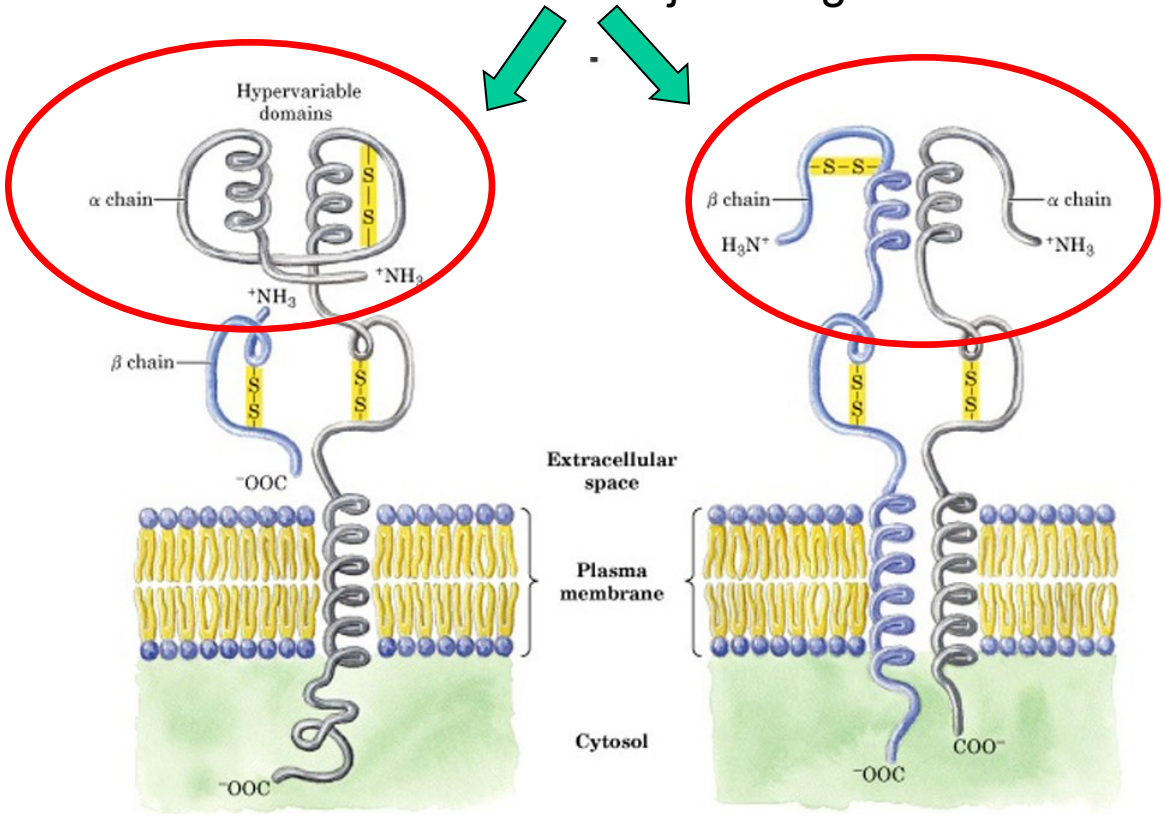
MHC

balancující selekce

Major histocompatibility complex (MHC)

Buňka nabízející antigen spustí imunitní odpověď

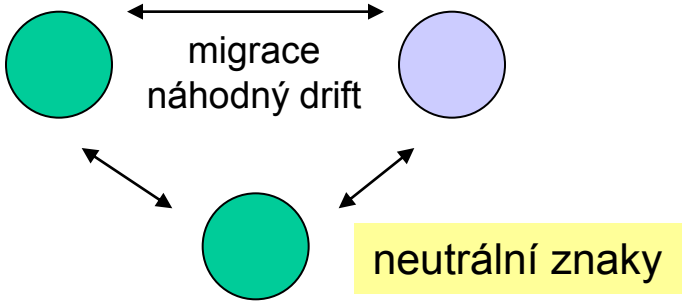
Oblast rozeznávající antigen



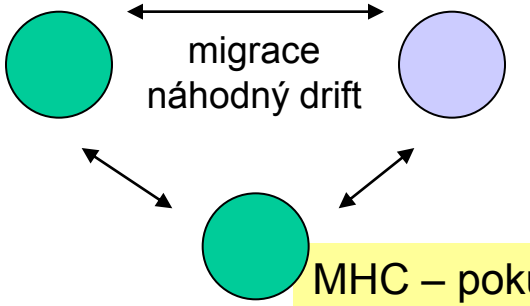
Class I Class II

Studium selekce – populačně-genetická analýza

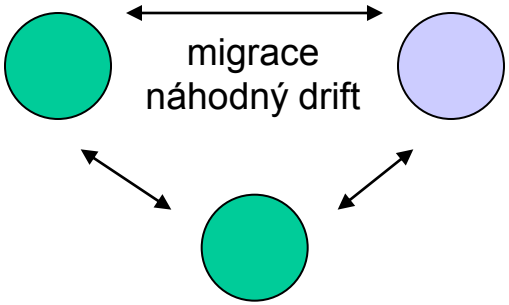
- Srovnání populačně-genetické struktury na MHC genech a neutrálních znacích (mikrosatelity)



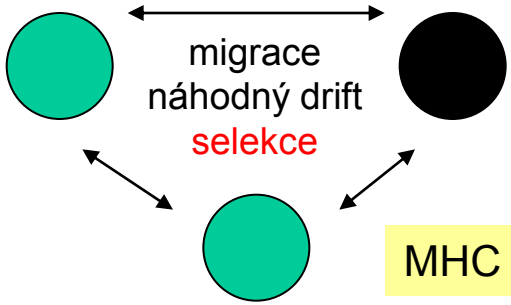
neutrální znaky



MHC – pokud nepůsobí selekce

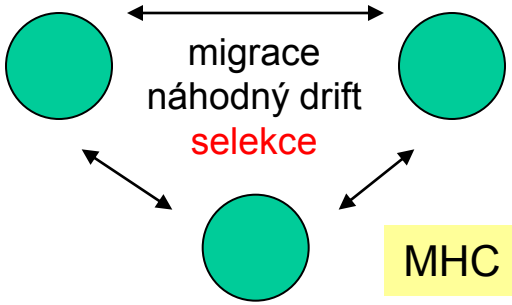


neutrální znaky



MHC

diverzifikující selekce



MHC

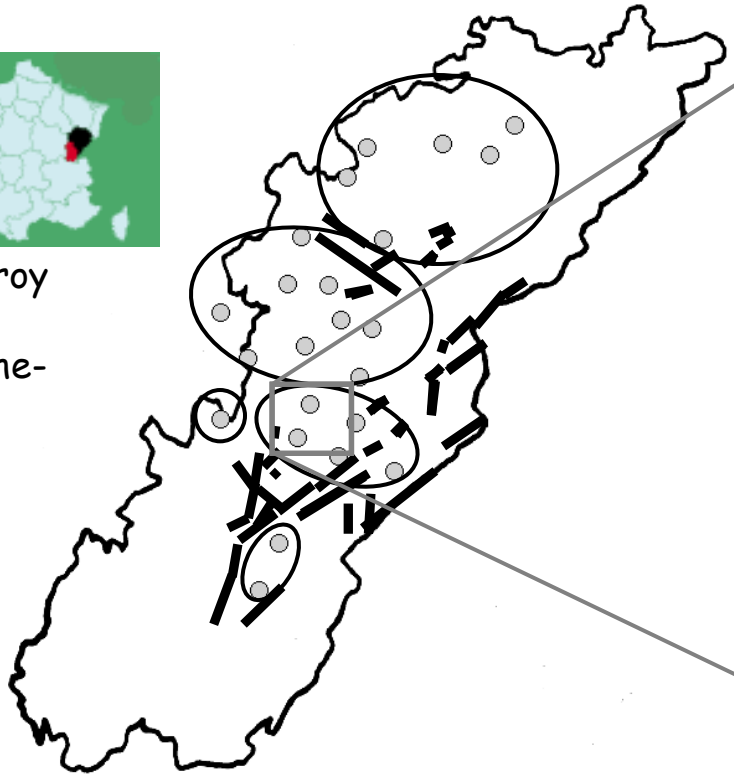
balancující selekce

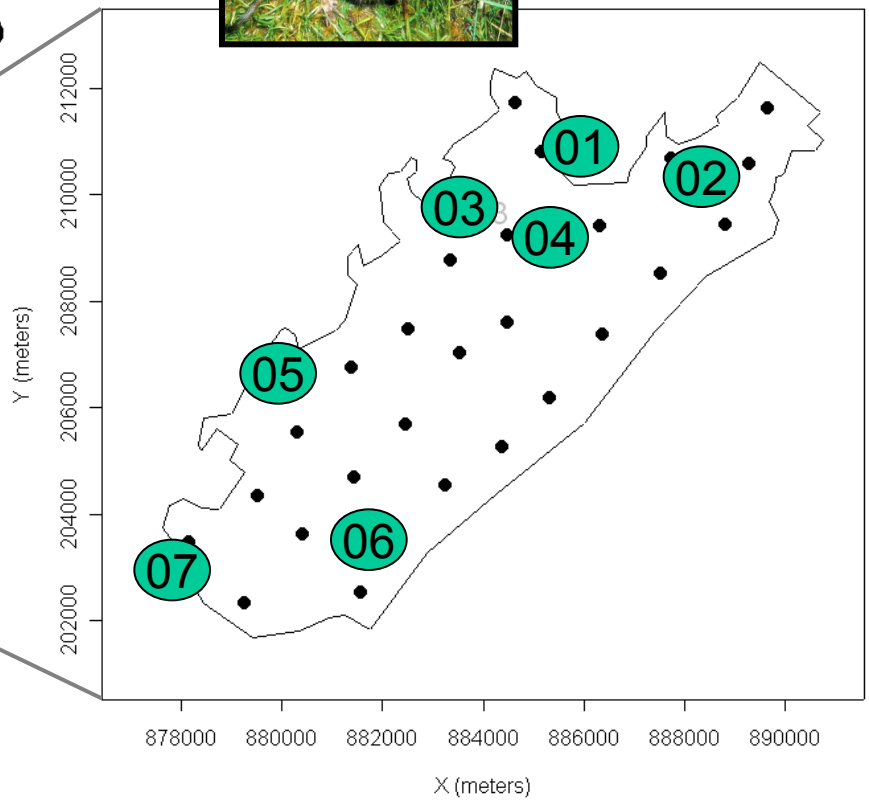
Je možno kvantifikovat např. pomocí F_{ST}

Důkaz přírodního výběru v současnosti: analýza populačně-genetické struktury

- Srovnání neutrálních znaků a MHC

Canton Nozeroy (pohoří Jura, région Franche-Comté)

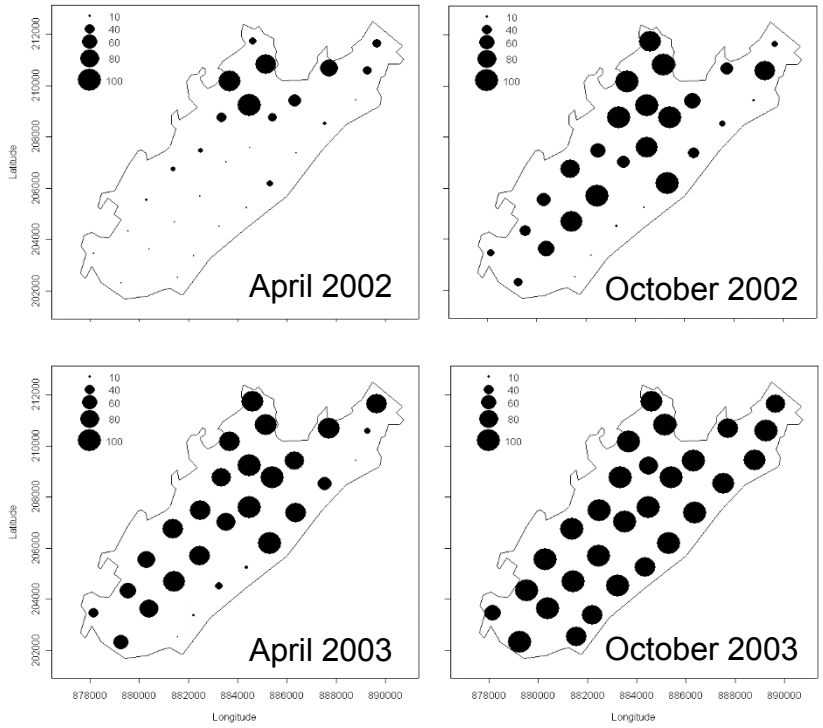


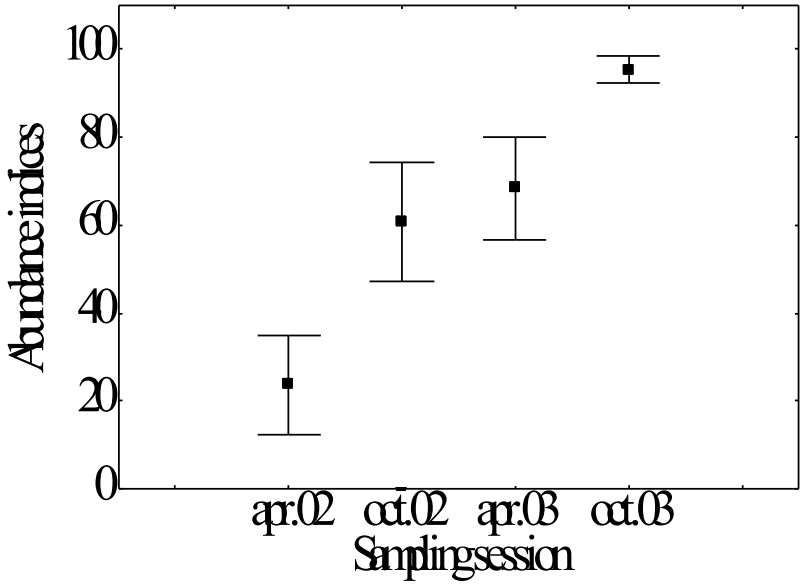


Studované lokality – 7 populací ve stejné fázi populačního cyklu

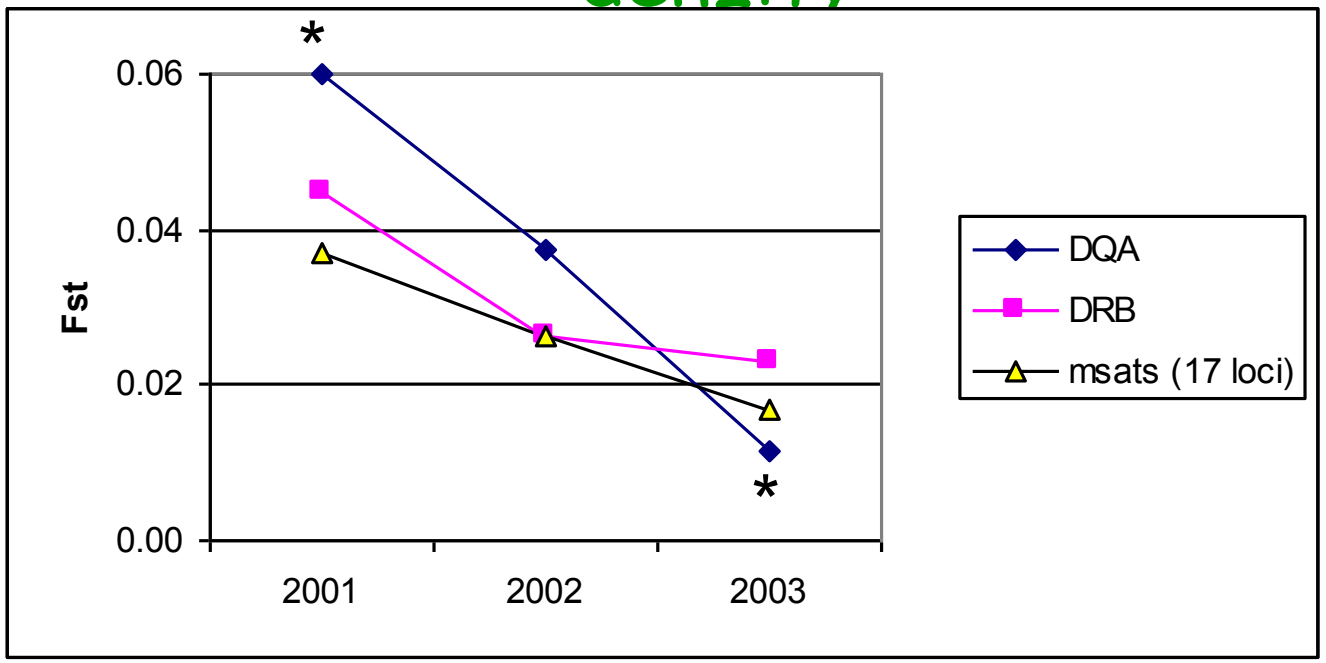
Bryja et al. 2007, Molecular Ecology

→ 2001-2003: fáze růstu populační hustoty





Diferenciace populací v průběhu růstu denzity



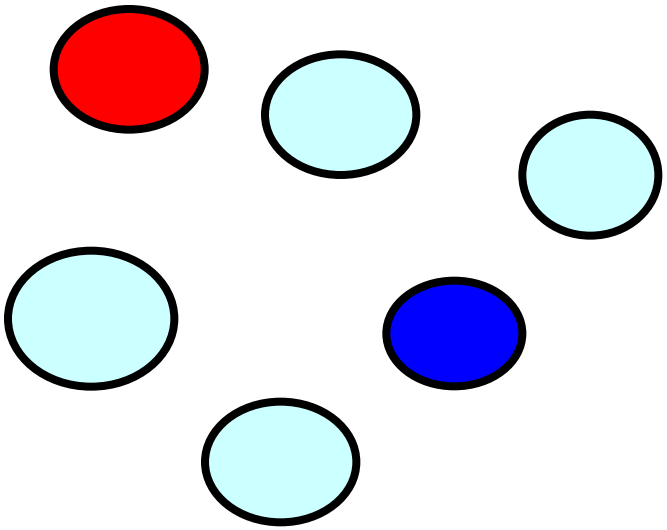
* Signifikantní rozdíl DQA1 vs. mikrosatelity

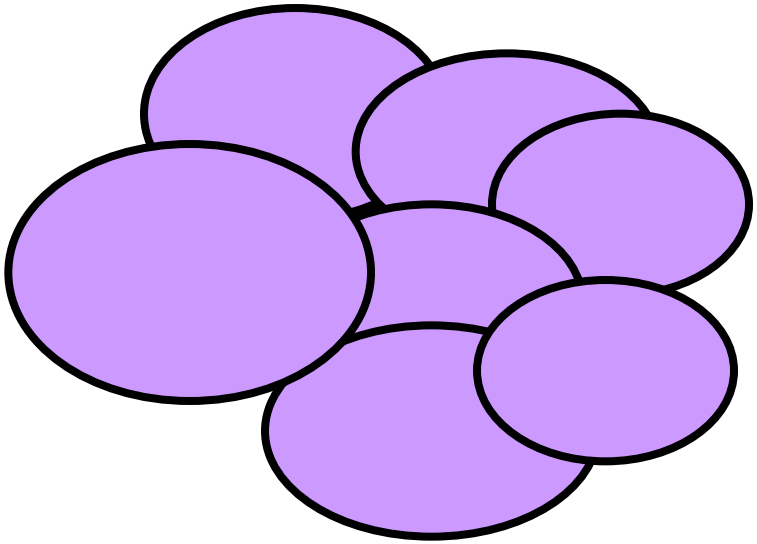
Pokles diferenciace s nárůstem denzity (nárůst disperze, tj. toku genů)

MHC (zejména DQA1) – signifikantně odlišné od mikrosatelitů

Bryja et al. 2007, Molecular Ecology

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

Bryja et al. 2007, Molecular Ecology

Metody studia funkční variability

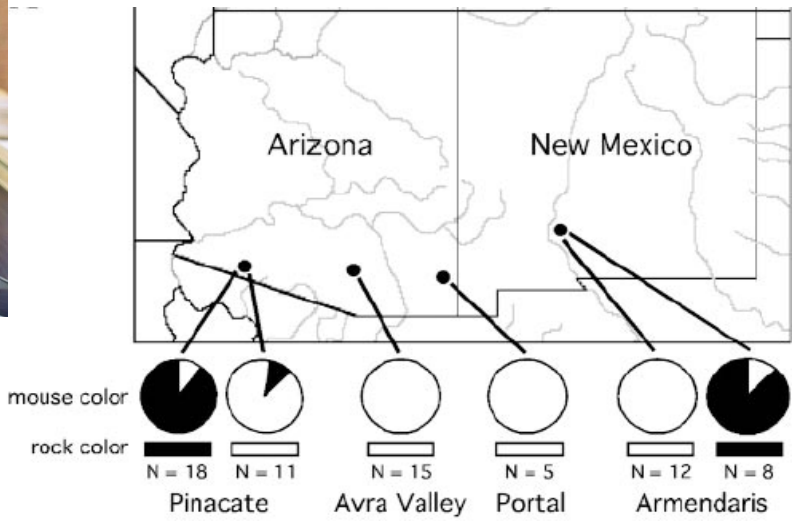
1. Sledování kandidátních genů

2. Genomické přístupy (mnoho genů najednou)

pytlouš

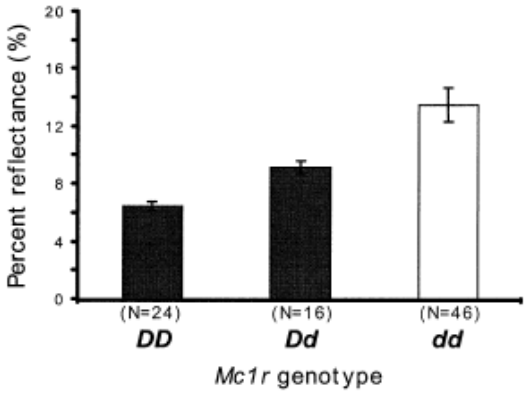
Chaetodipus intermedius

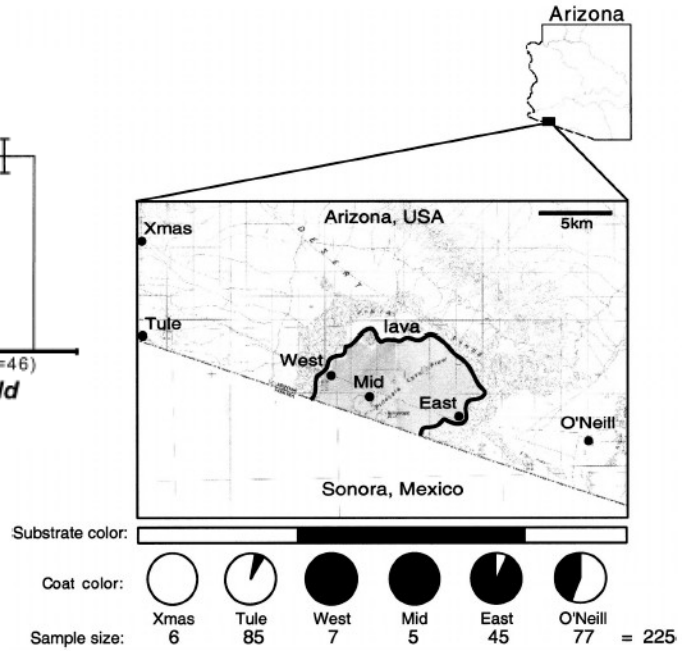
Hoekstra, Nachman et al.



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

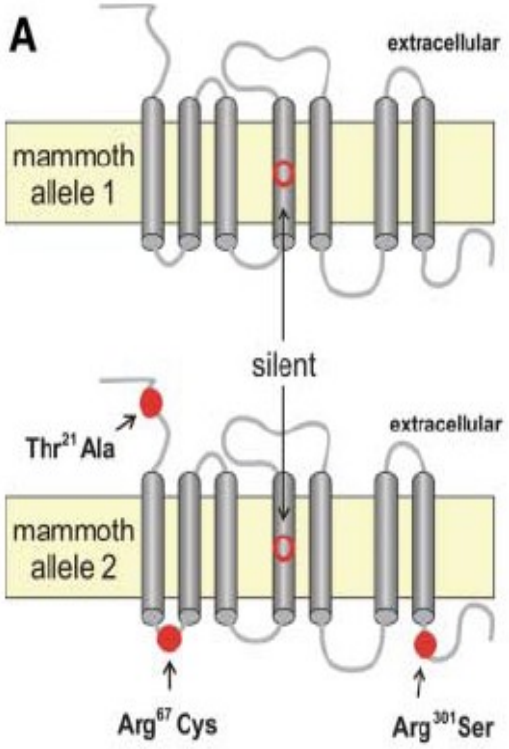
- **Arizona**
- Korelace zbarvení s prostředím i na malé škále
- mtDNA nekoreluje se zbarvením
- Sekvenování kandidátních genů (známých z inbredních myší)
- melanocortin-1 receptor MC1R
- Záměna 4 aminokyselin
- Jednoduchá dědičnost alel a zbarvení





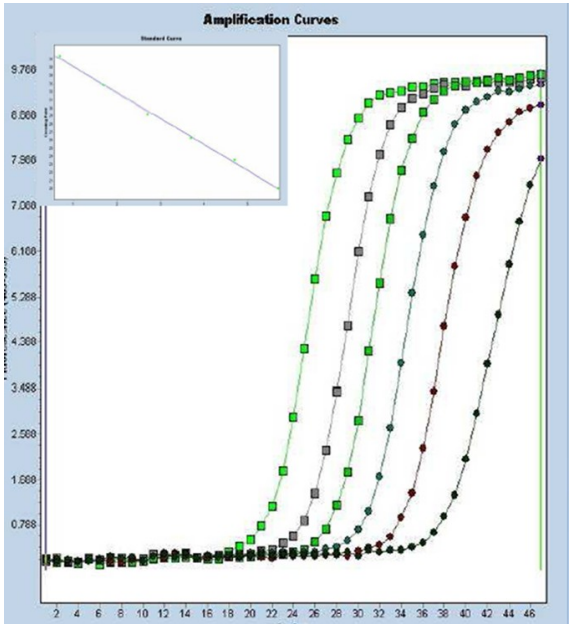
MC1R u člověka, mamuta a dalších

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

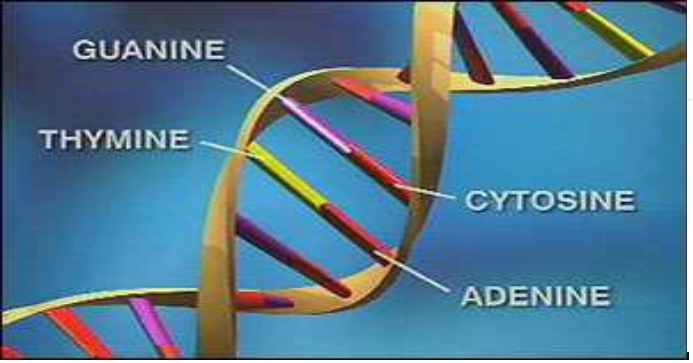


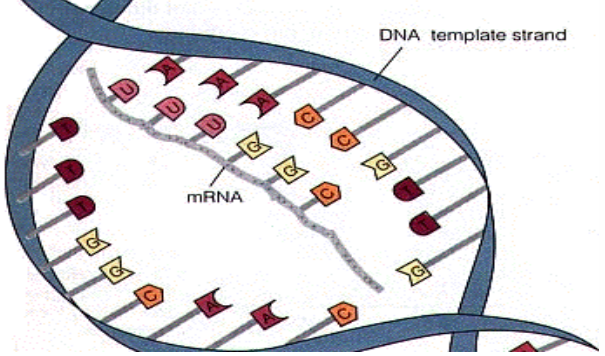
Measuring of expression - qPCR

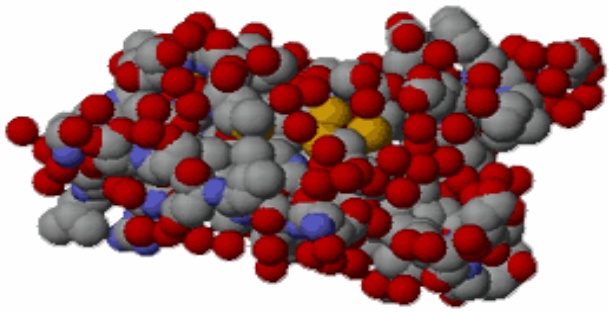
- Relative comparison of quantity of particular DNA, e.g. level of specific gene expression (i.e. particular RNA = cDNA) (e.g. comparison of different tissue types, elevations, treatement vs. non-treatement etc.)
- **housekeeping genes** – use as standard for quantification
- same number of copies in all cells (e.g. genes encoding proteins of cytoskeleton)
- constitutive genes - expressed in all cells, independent on experimental treatment
- validation of housekeeping genes should be performed before their use in gene expression experiments



Sledování mnoha genů najednou







DNA → Transcription → mRNA → Translation → Proteins

Exome

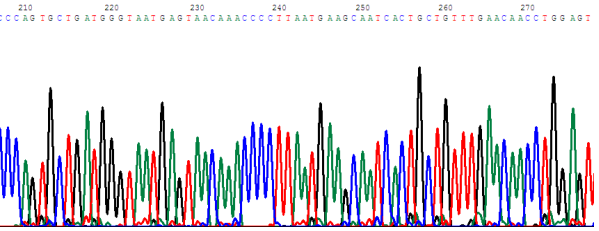
Genome — 3 billion bases

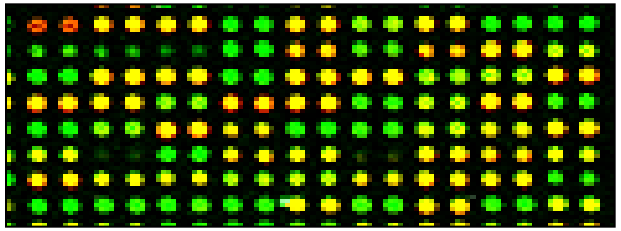
Transcriptome — 20-30,000 genes

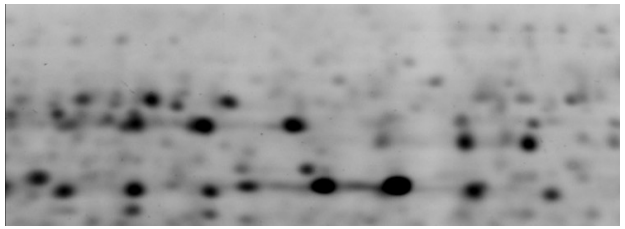
Proteome — ~100,000 proteins

Functional Genomics

Genomics — Transcriptomics — Proteomics



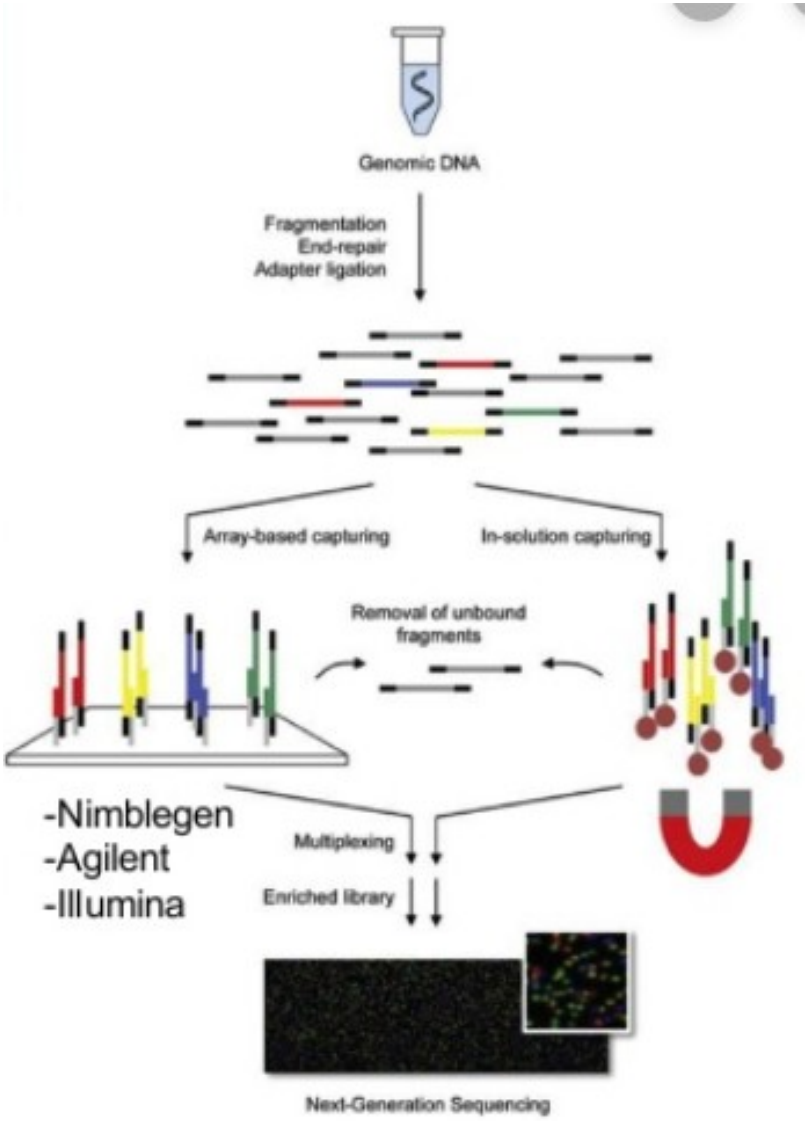




Exome-Seq

Targeted exome capture

- targets ca. 20,000 coding sequences
- high depth of coverage for more accurate variant calling



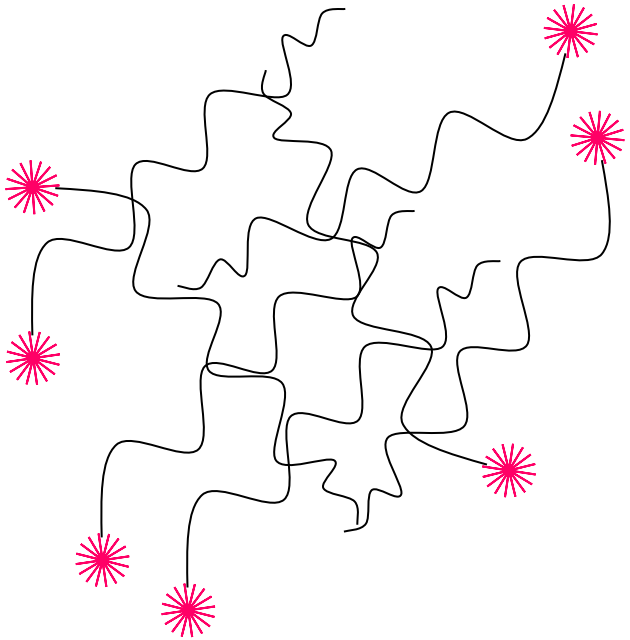
Transcriptomics – analysis of mRNAs

1. microarrays
2. RNA seq (NGS)

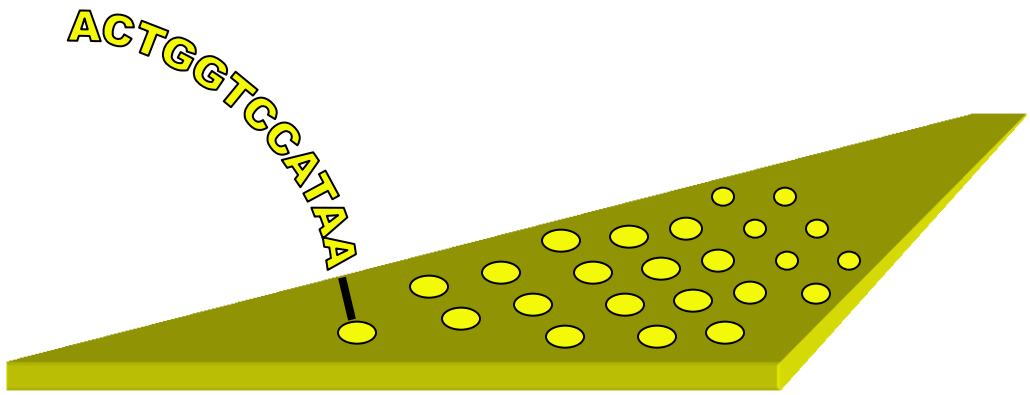
1. Analysis of gene expression by microarrays

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

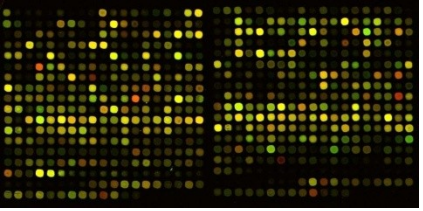
Microarray analysis of transcriptome
(~ specific DNA hybridization)



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



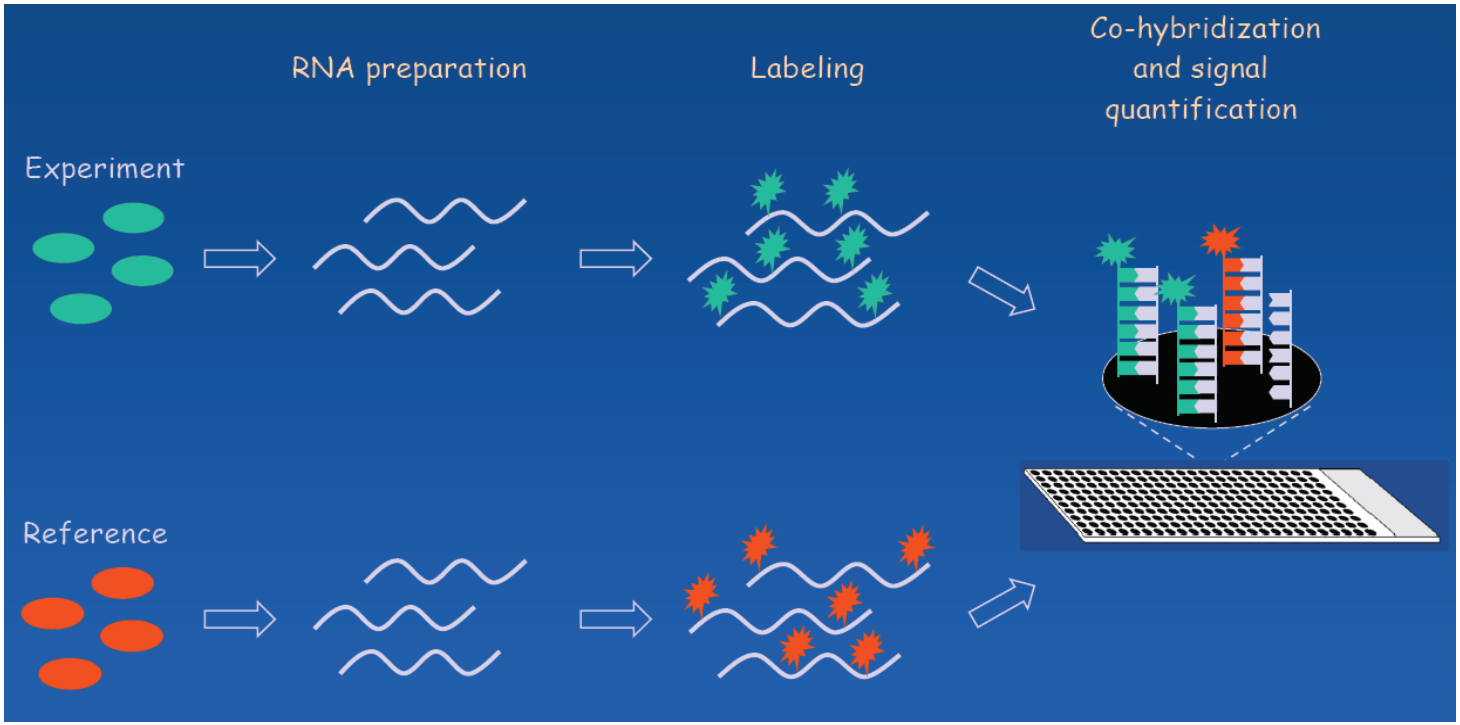
Probe (i.e. synthesized oligonucleotides complementary to particular genes)



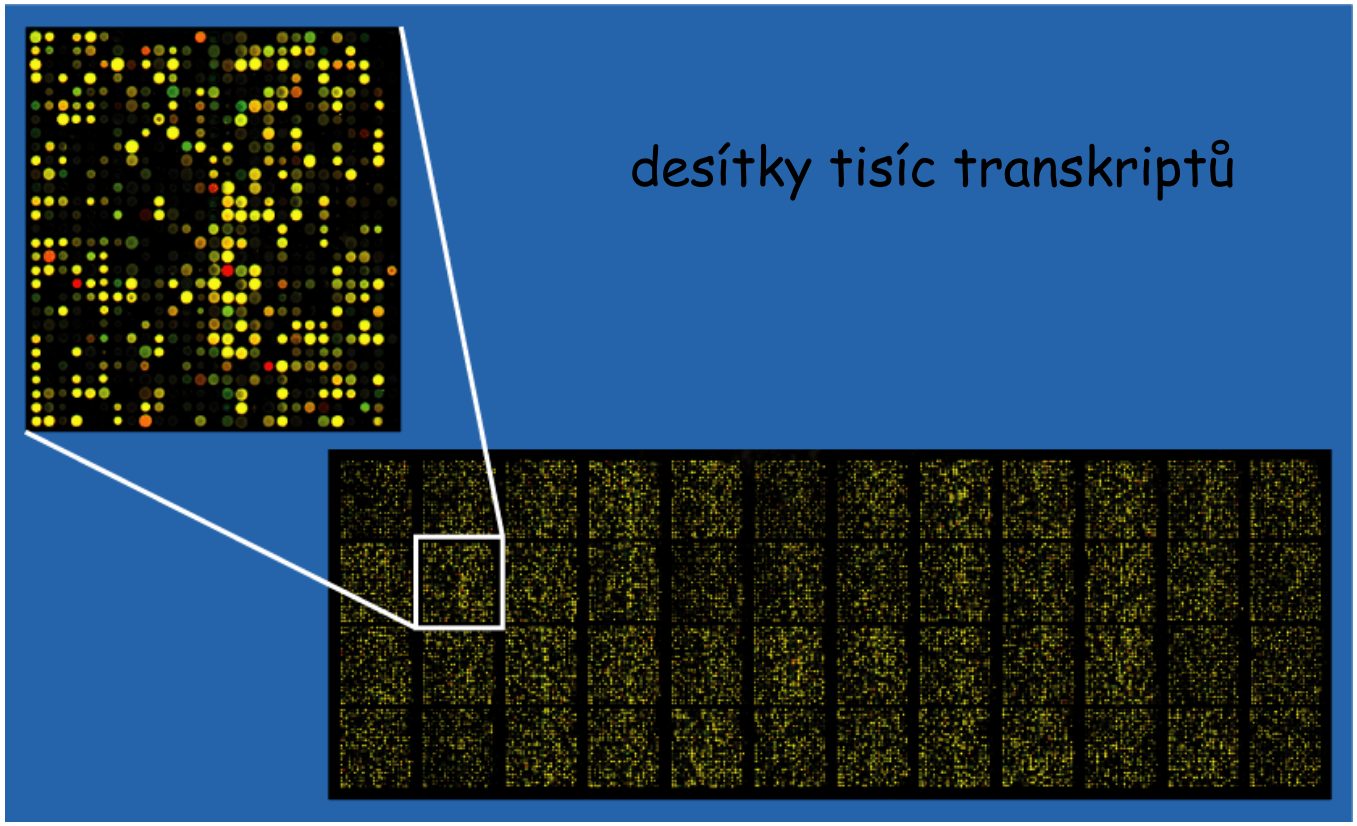
Sledování exprese genů
microarrays

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

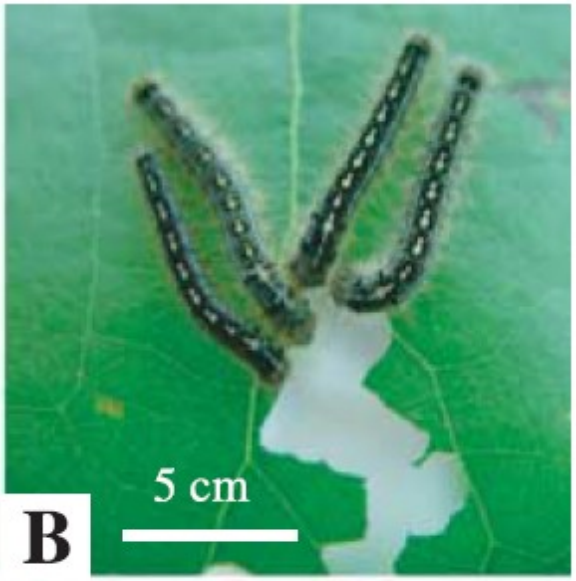
Affymetrix
Agilent Technologies



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



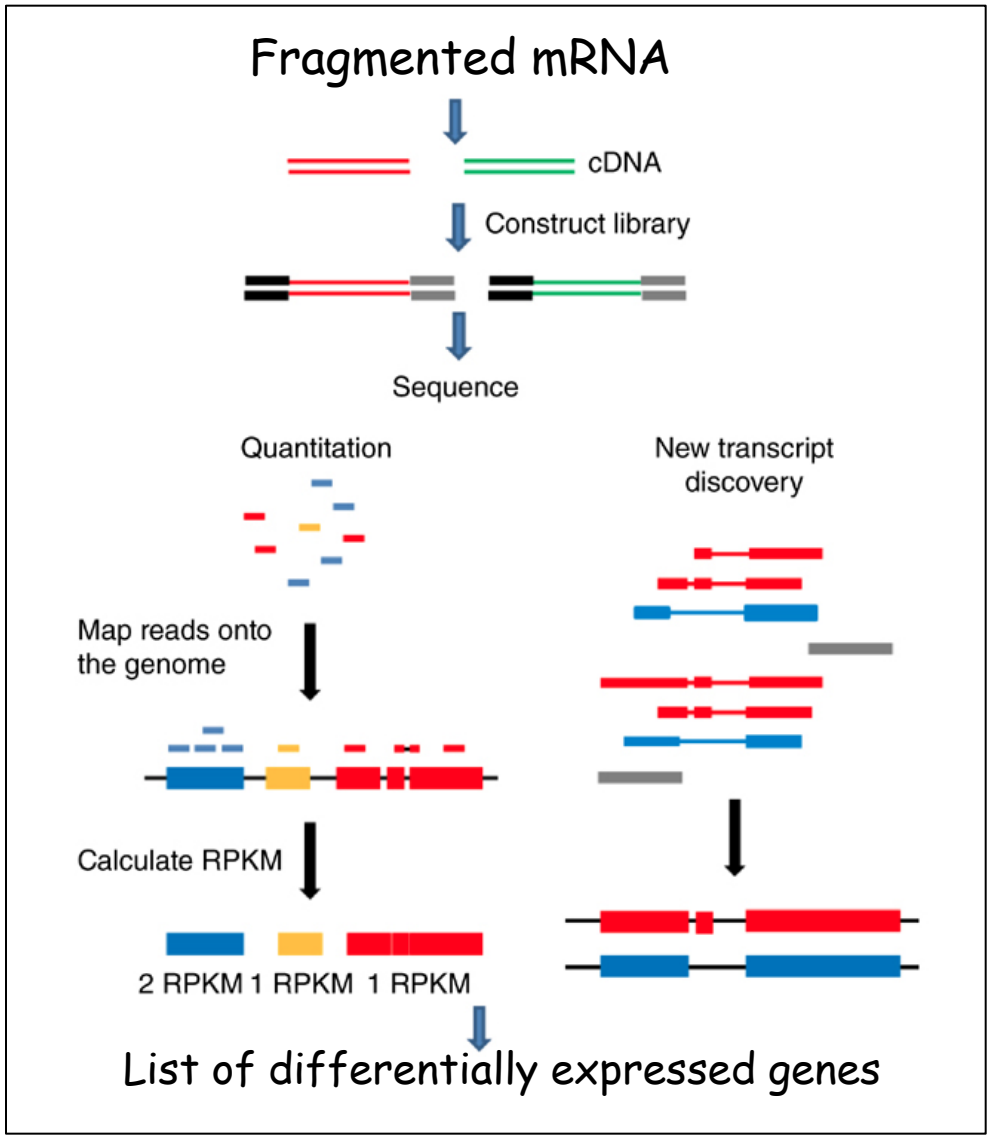
Populus
trichocarpa x *deltoides*
a *Malacosoma disstria* bourovec
Ralph et al. *2006*

- cDNA microarray
- 15496 genů > ¾ genomu
- Po 24 hodinách
  1191 genů up-regulated
  537 down-regulated
- Obrana: endochitinázy, inhibitory proteáz
- Signální funkce
- Transport, metabolismus, regulace transkripce

2. RNAseq

(„high-throughput sequencing of cDNAs")

RNA-Seq workflow for gene expression analysis

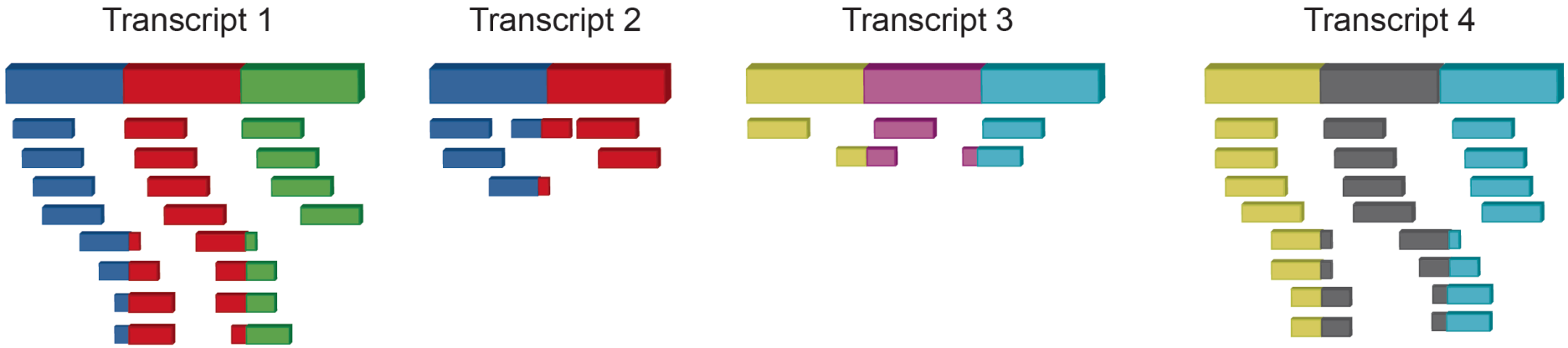


Adapted from Zeng and Mortazavi, *Nature Immunology* **13** (2012)

RNA-Seq quantification

(RPKM = reads per kilobase per million reads)

Actual Read Alignment to Alternative Splice Variants

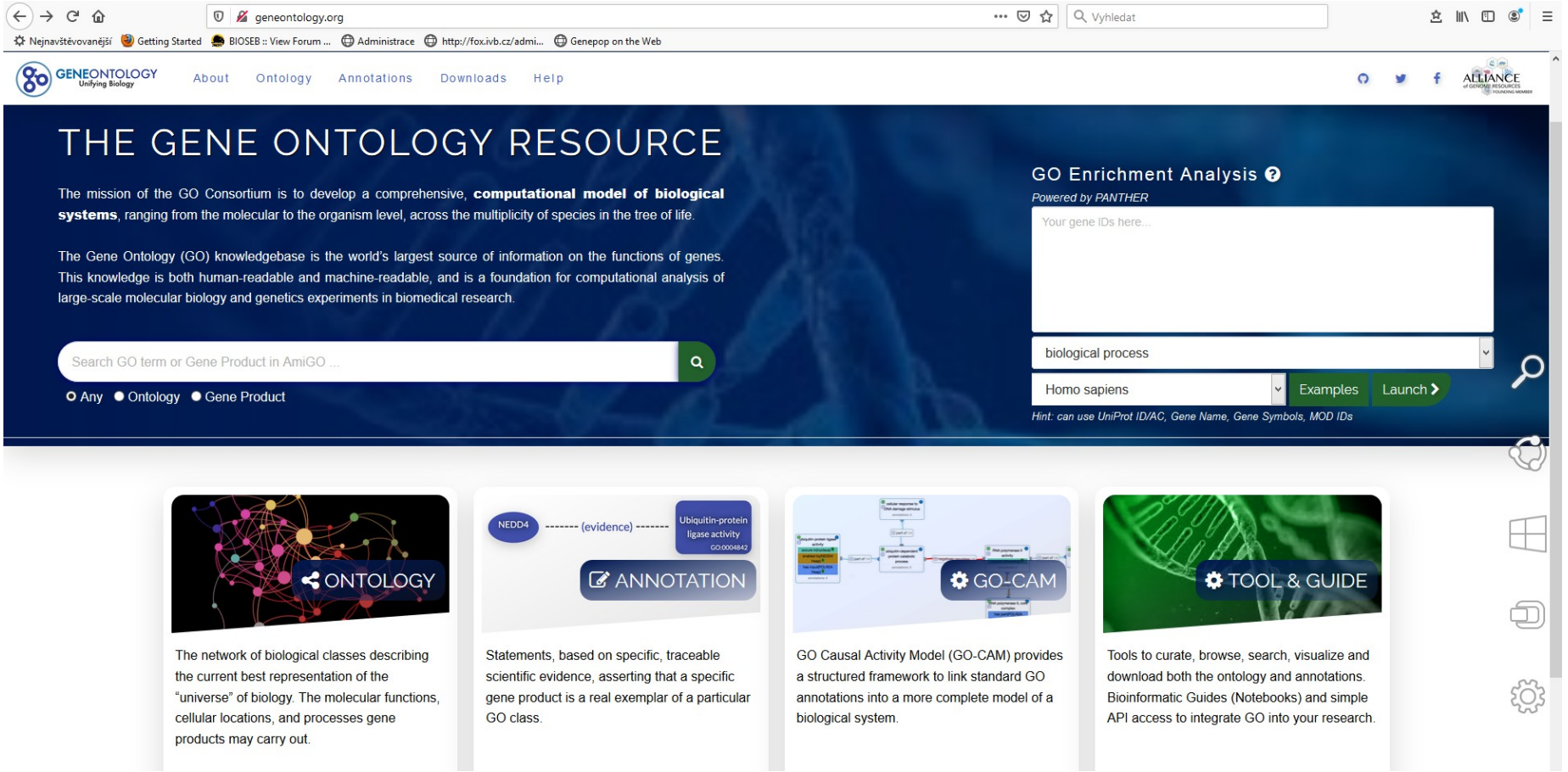


The reference transcriptome is required

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.



Example of GO annotation: **cytochrome c**

- *molecular function*: oxidoreductase activity
- *biological proces*: oxidative phosphorylation
- *cellular component*: mitochondrial matrix

Examples

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

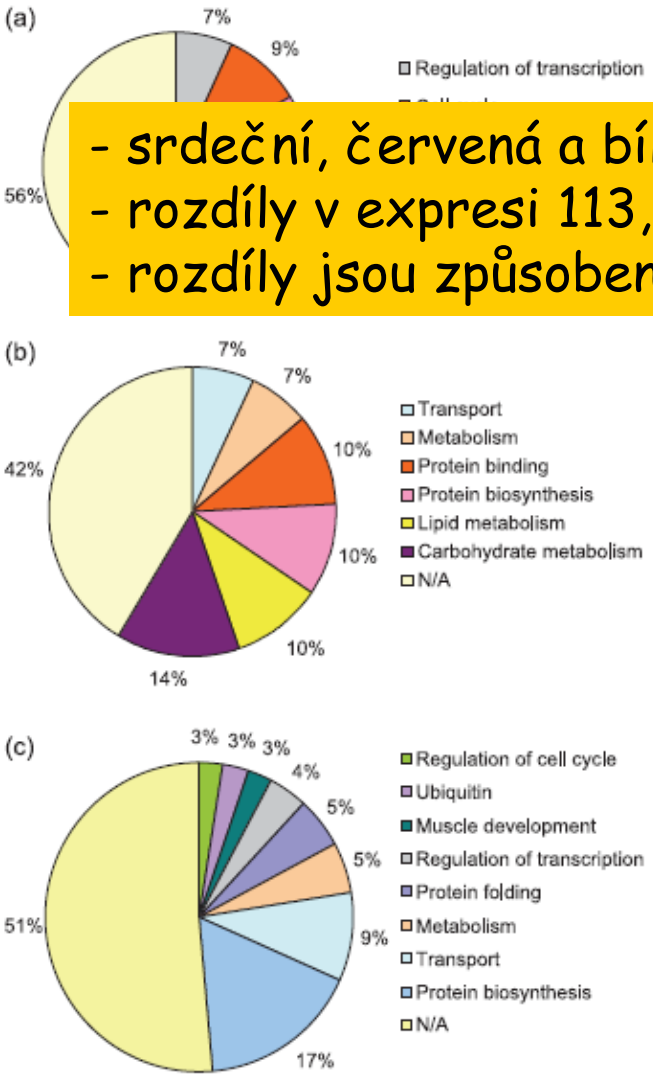


Fig. 1 Percentage of total up-regulated genes identified in the Gene Ontologies (Biological Process) of ventricle (a), red muscle (b) and white muscle (c).

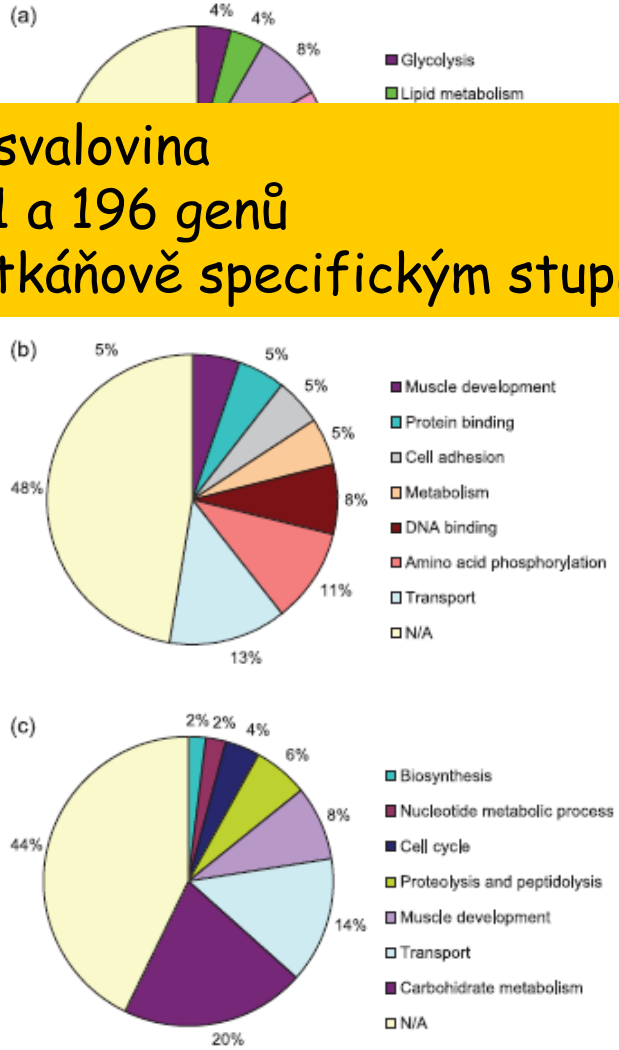


Fig. 2 Percentage of total down-regulated genes identified in the Gene Ontologies (Biological Process) of ventricle (a), red muscle (b) and white muscle (c).

quantitative real-time PCR

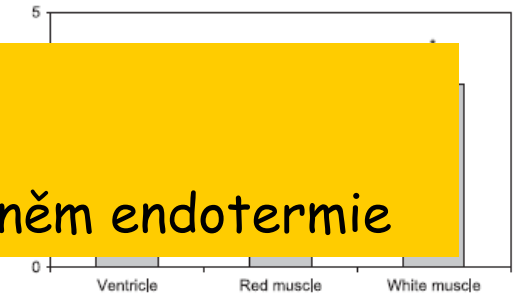


Fig. 3 Relative gene expression level of candidate gene *Hsp70* in cold-stressed Thunnus orientalis ($n = 7$) determined by quantitative real-time PCR. Expression levels were normalized to the howse-keeping gene β-actin. (*) Significant values between means.

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

Ng'oma et al. BMC Genomics 2014, 15:754
http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/754

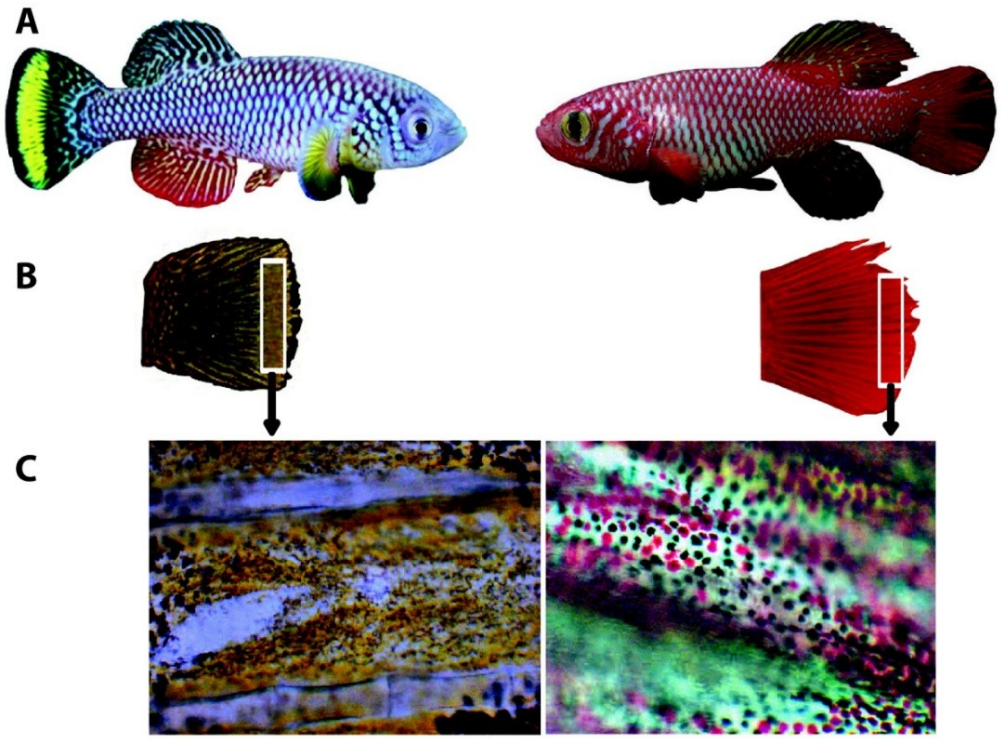
BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

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

Enoch Ng'oma[1], Marco Groth[1], Roberto Ripa[2], Matthias Platzer[1] and Alessandro Cellerino[1,2*]

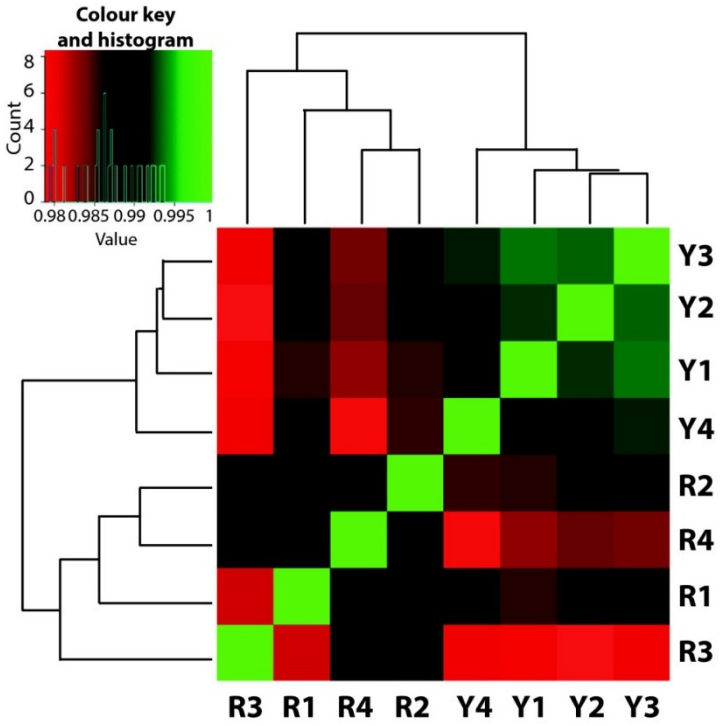
- cca 334 miliónů sekvencí („reads"); 42 mil./sample
- 210 DEGs („differentially expressed genes") – 119 up-regulated, 91 down-regulated u žlutých jedinců



xanthophory

melanophory
erythrophory

Konzistence výsledků



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

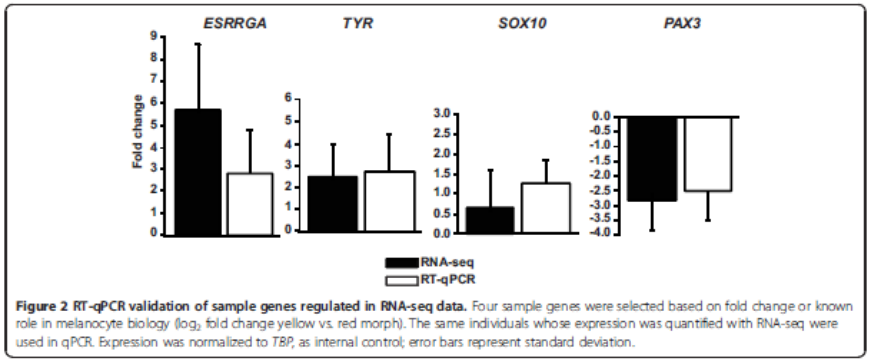


Figure 2 RT-qPCR validation of sample genes regulated in RNA-seq data. Four sample genes were selected based on fold change or known role in melanocyte biology (log_2 fold change yellow vs. red morph). The same individuals whose expression was quantified with RNA-seq were used in qPCR. Expression was normalized to *TBP*, as internal control; error bars represent standard deviation.

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

Functional annotation clustering (= gene ontology)

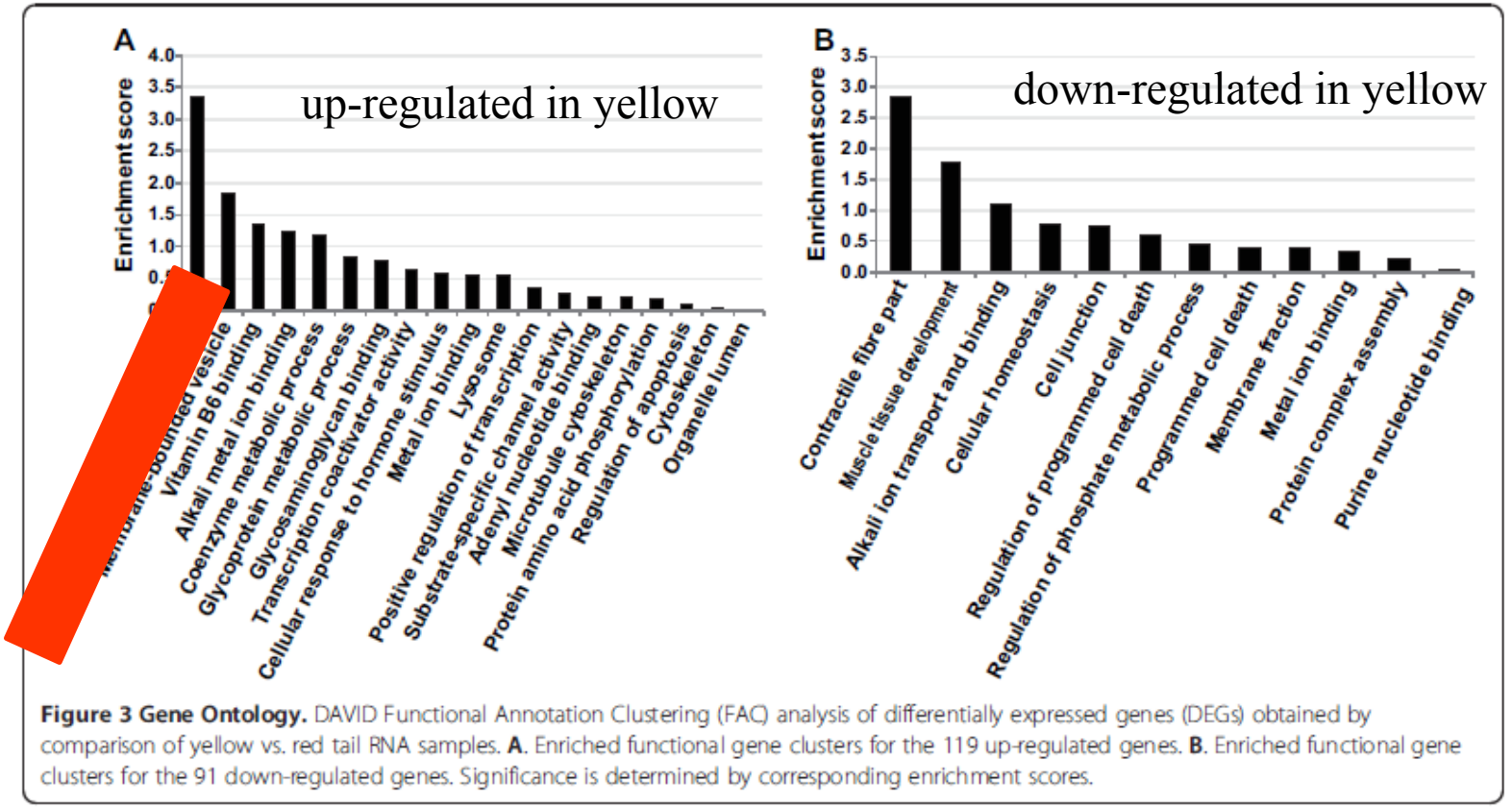
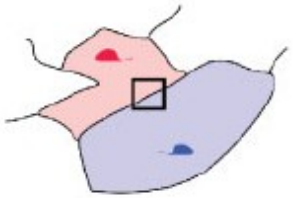


Figure 3 Gene Ontology. DAVID Functional Annotation Clustering (FAC) analysis of differentially expressed genes (DEGs) obtained by comparison of yellow vs. red tail RNA samples. **A**. Enriched functional gene clusters for the 119 up-regulated genes. **B**. Enriched functional gene clusters for the 91 down-regulated genes. Significance is determined by corresponding enrichment scores.

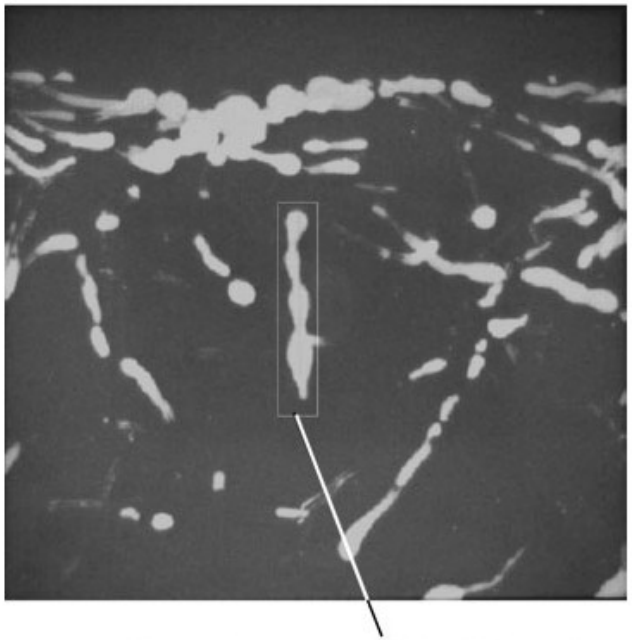
- xanthophory u žlutých jedinců jsou asociovány s melanogenezí
- v dalším kroku je možné studovat roli jednotlivých kandidátních genů

Závěr

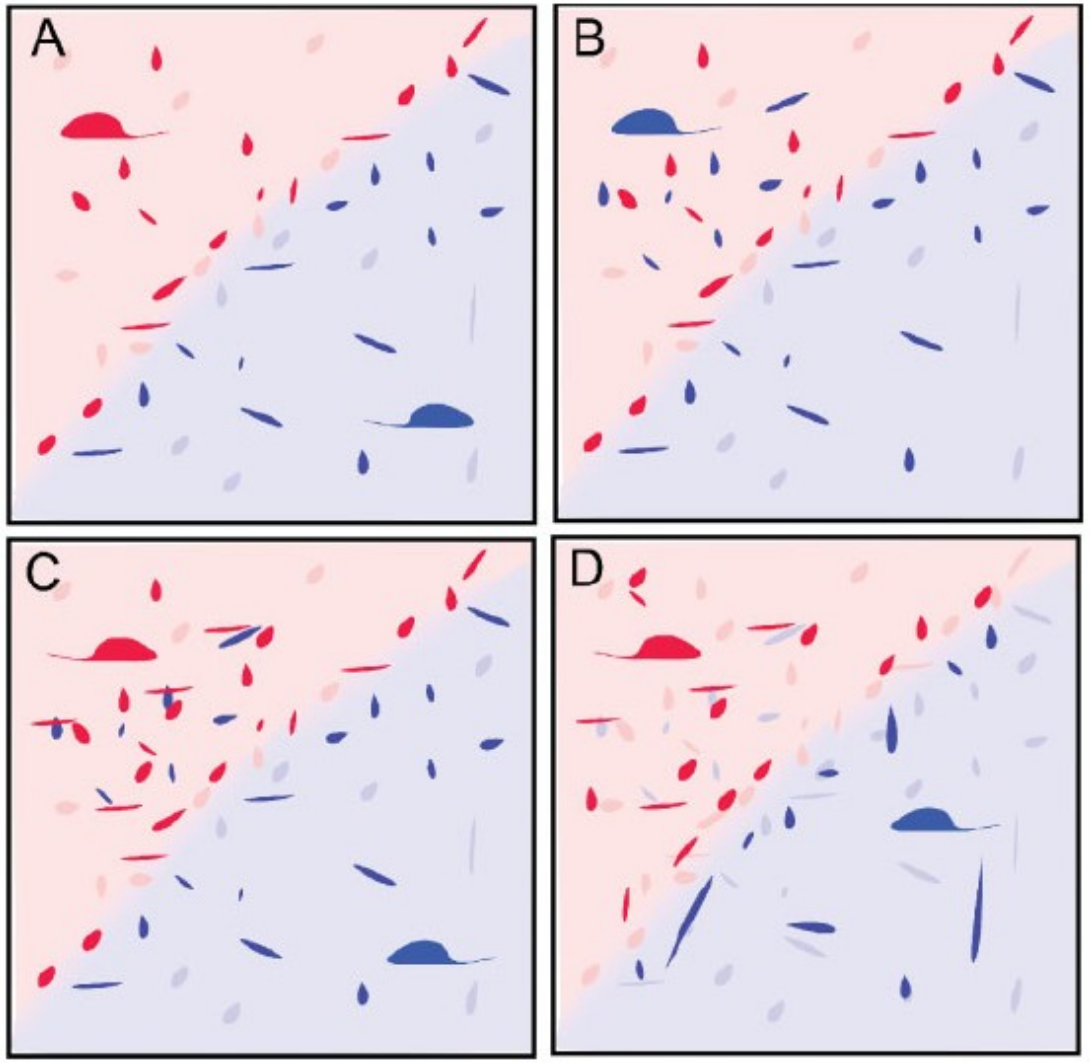
- Molekulární ekologie se rychle vyvíjí
- Metody se zásadně vylepšují a mění
- Co platilo dnes, nemusí platit zítra – těšme se tedy na zítřek



15cm

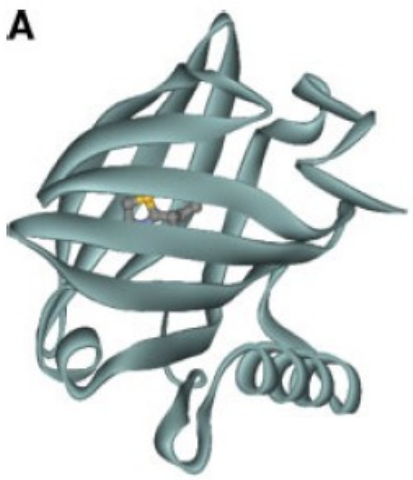


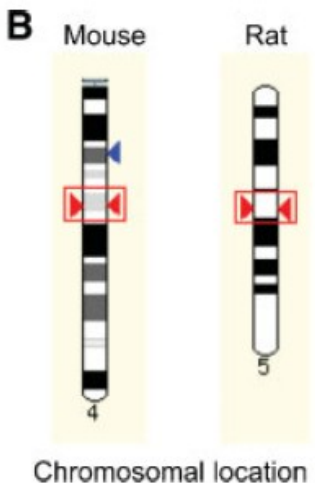
Urine streak presented as stimulus

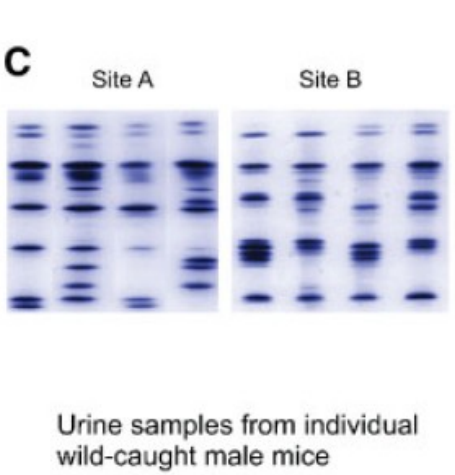


Mus musculus
Značení teritorií pachovými značkami (kapky moči)
Přeznačkovávání
V moči proteiny vážící volatilní molekuly

MUPs

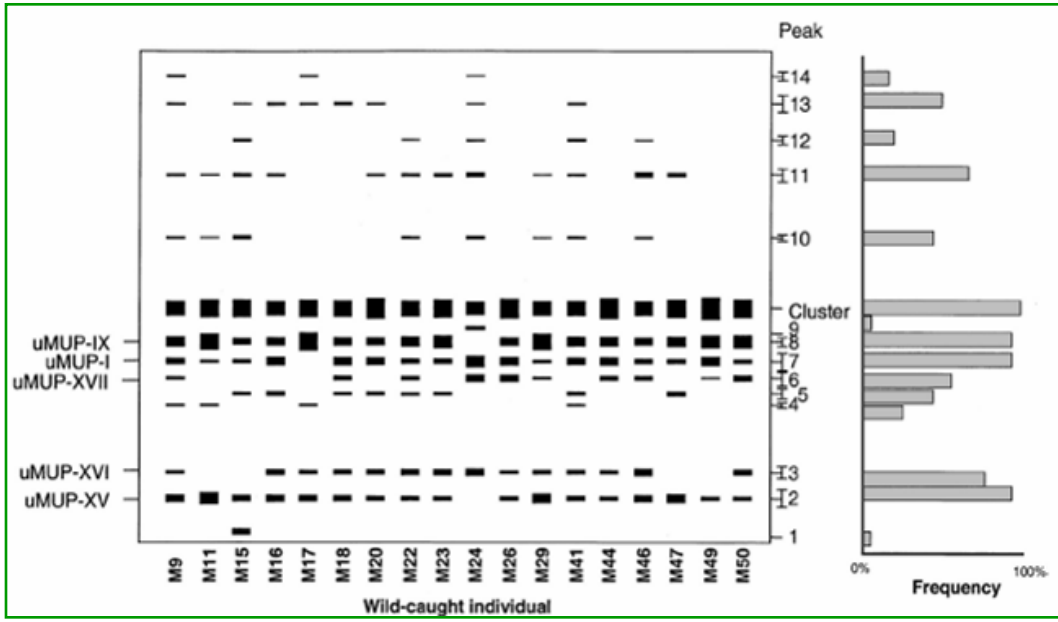






Major Urinary Proteins - komplex velmi podobných genů

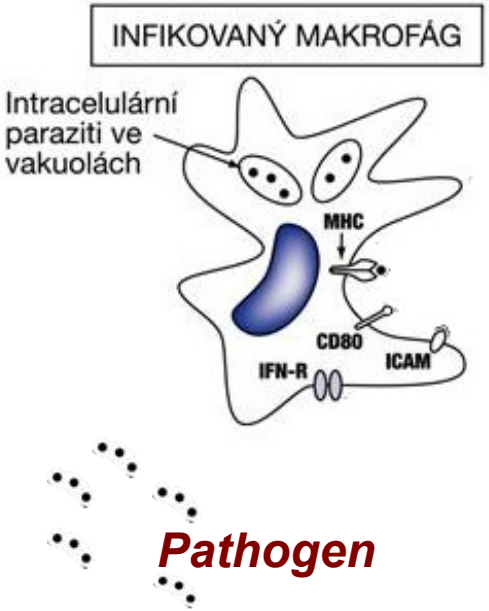
- Obtížně se studují (isoelektrická fokusace)
- Různé alely
- Navíc různá míra exprese
- → individuální profil
- Čárový kód jedince



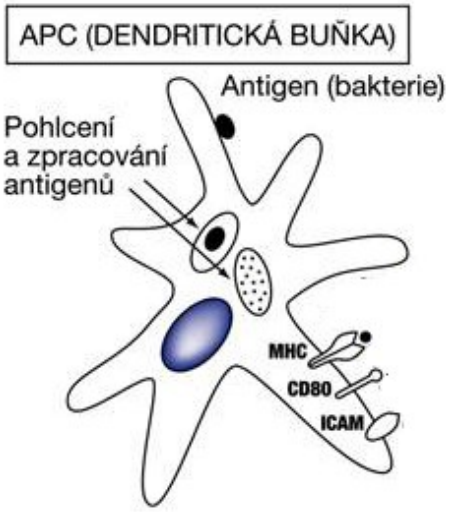
Major histocompatibility complex (MHC)

= adaptivní imunitní odpověď u čelistnatých obratlovců

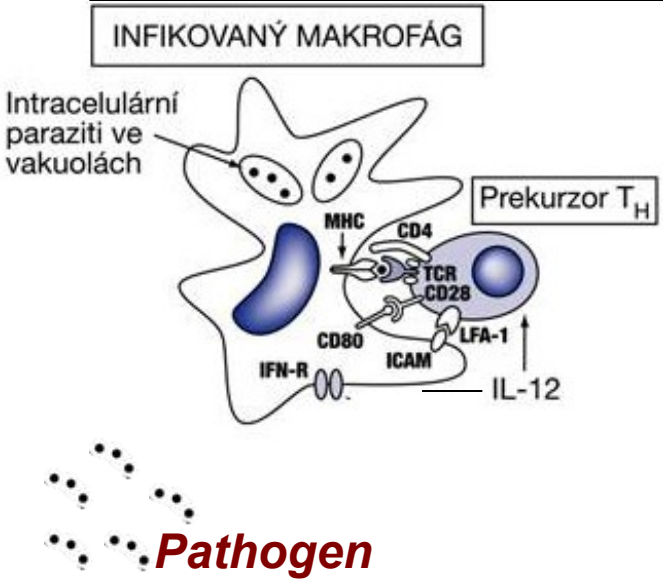
Antigen-specifická imunitní odpověď



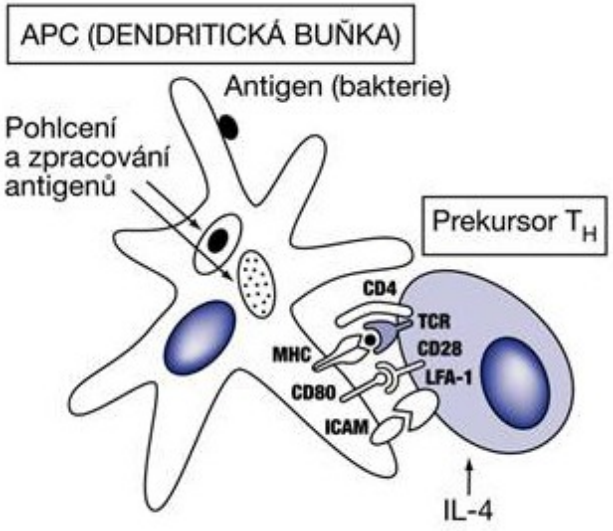
Pathogen



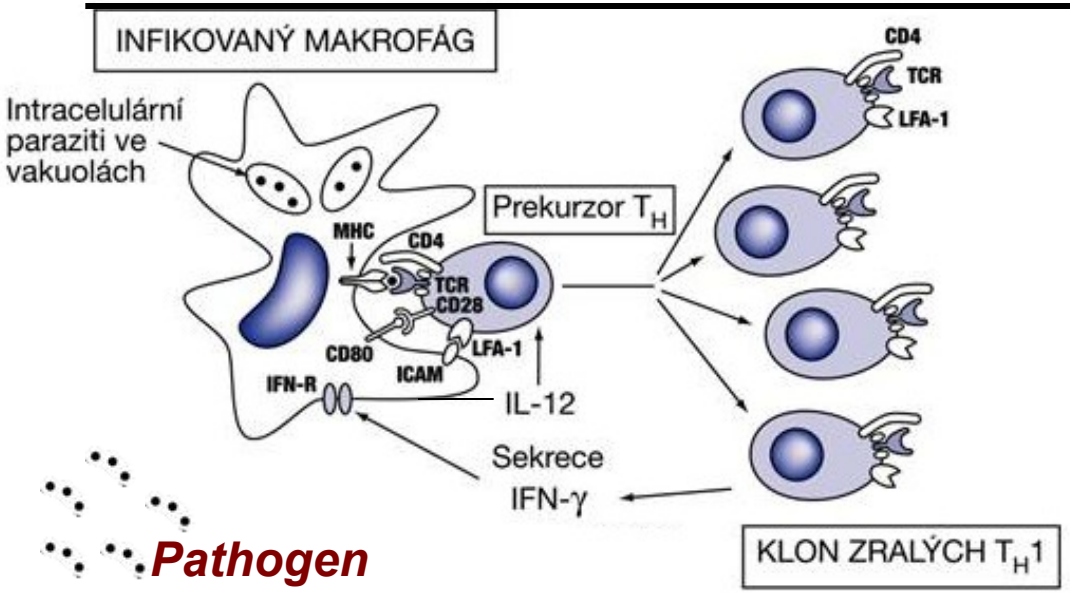
Antigen-specifická imunitní odpověď

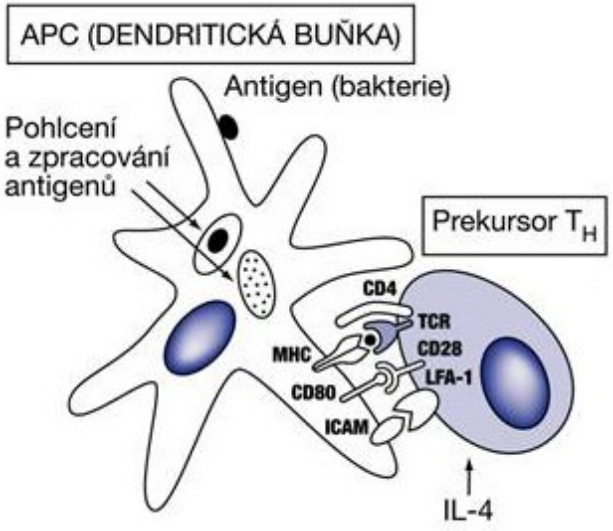


Pathogen

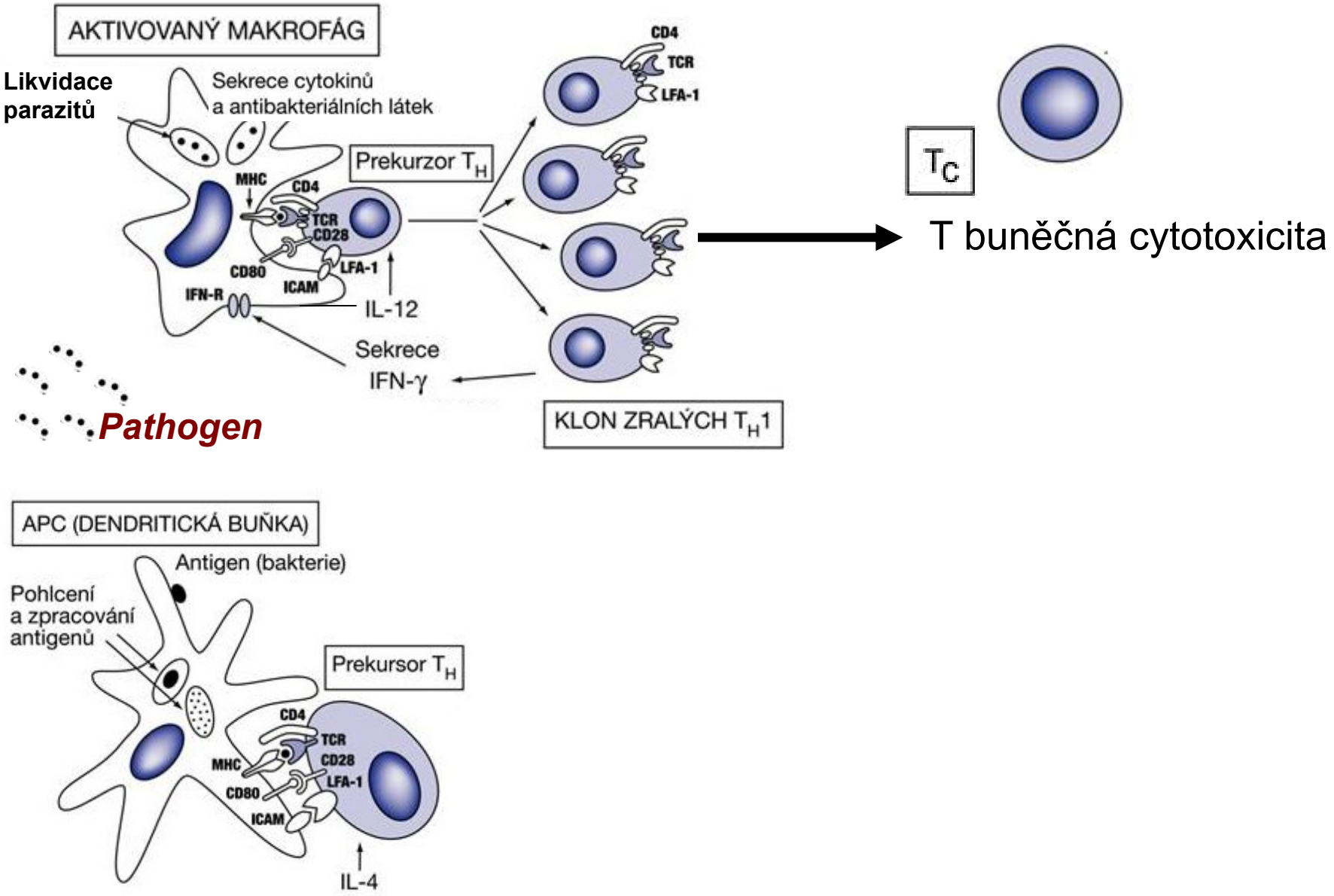


Antigen-specifická imunitní odpověď

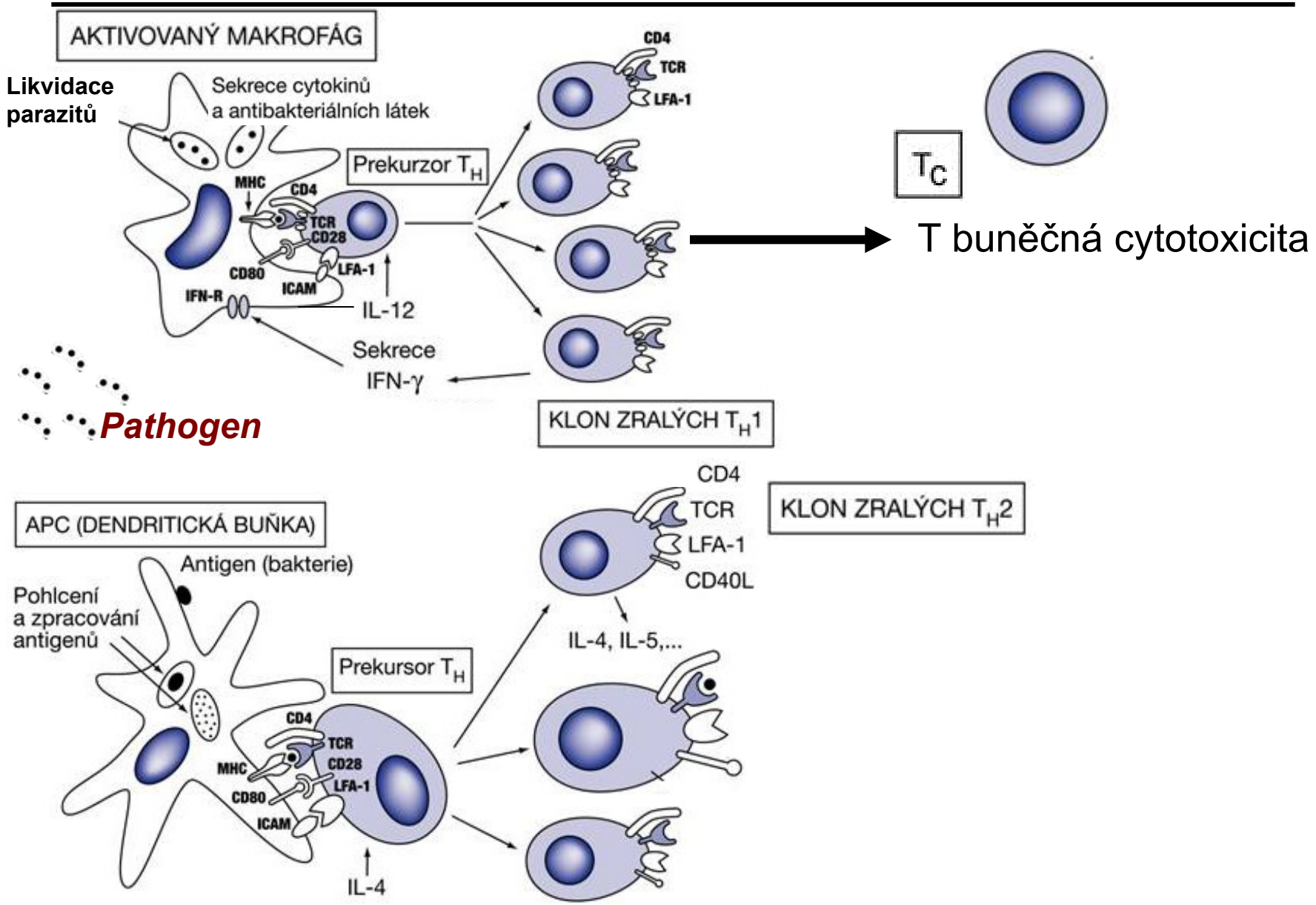




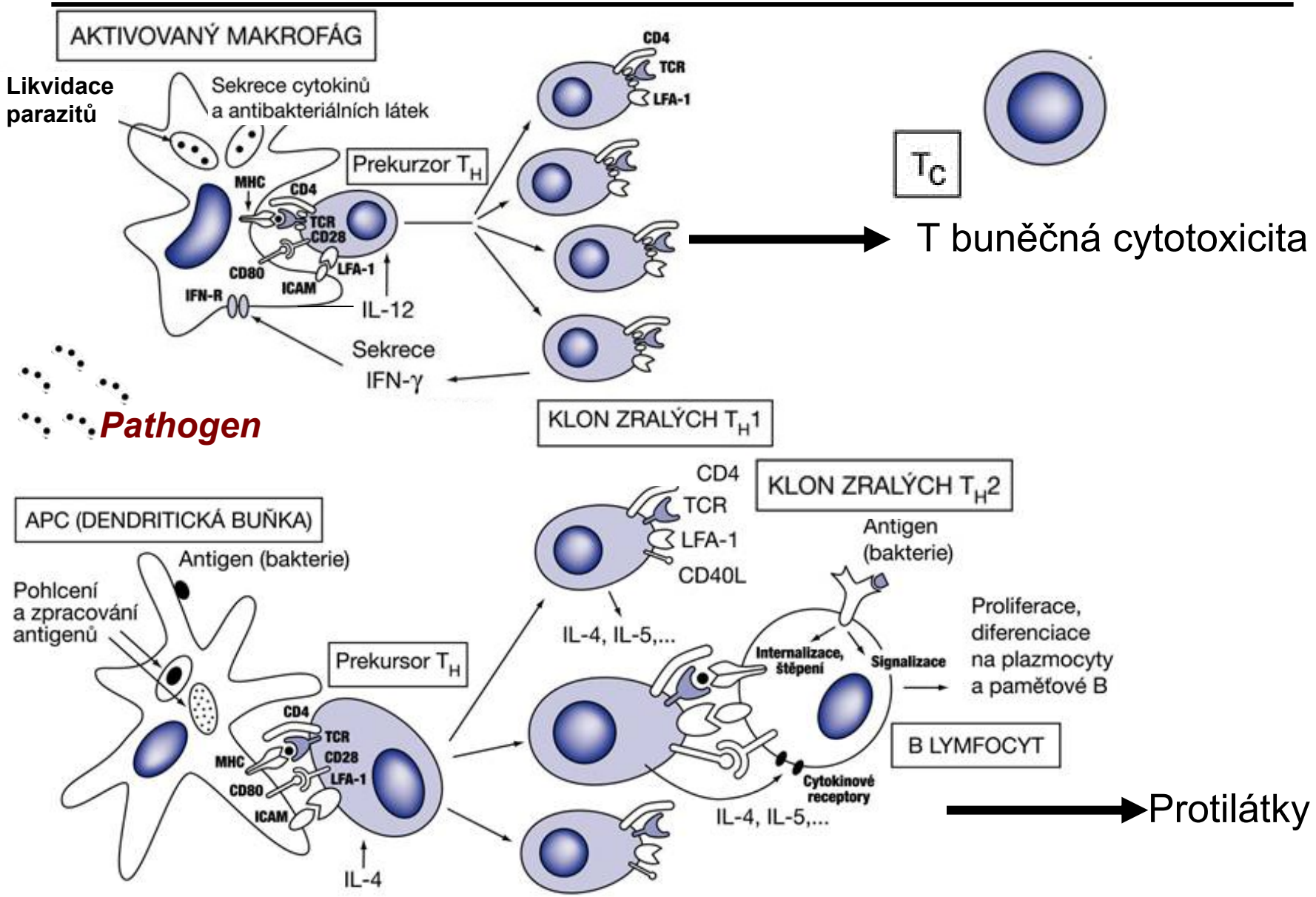
Antigen-specifická imunitní odpověď



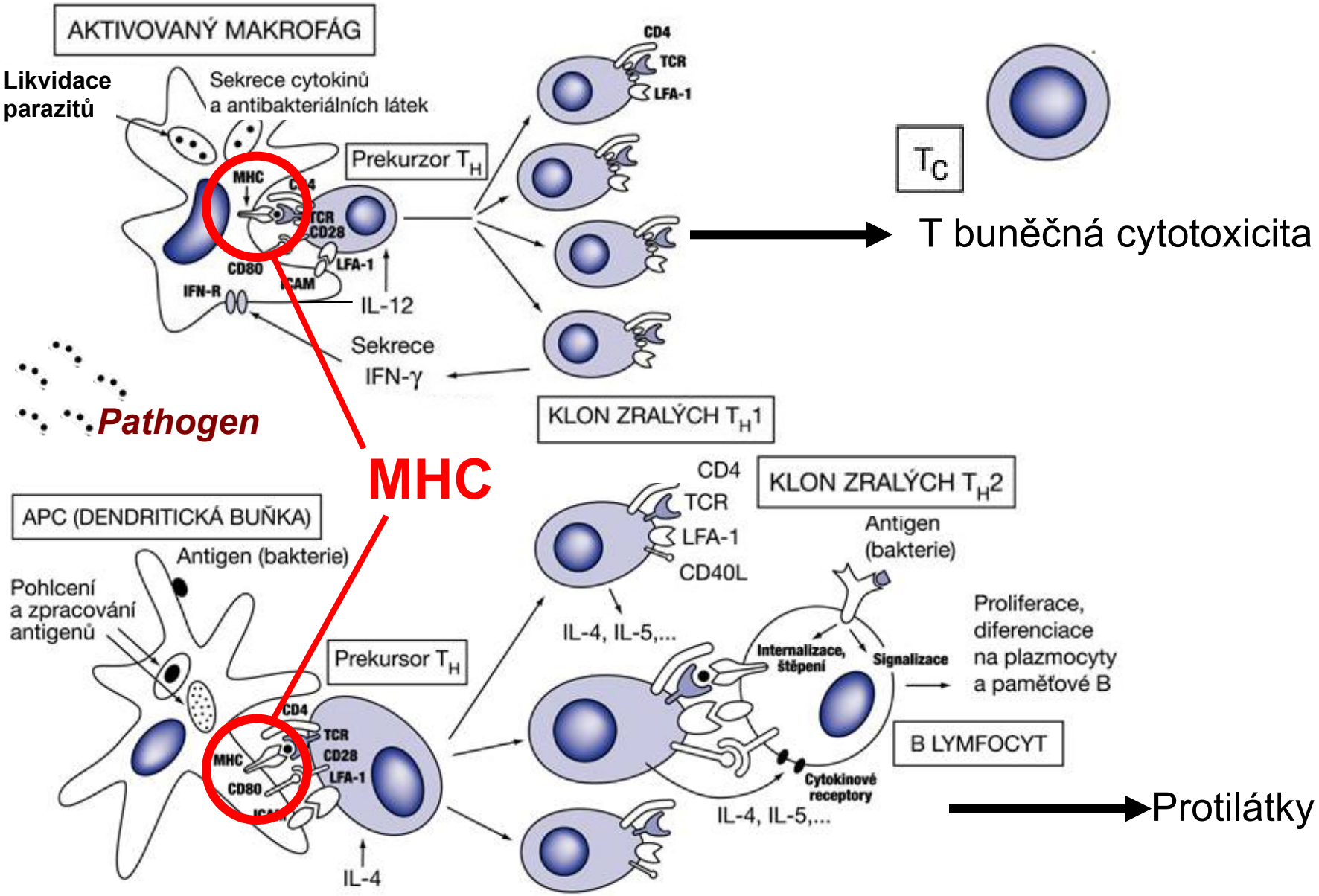
Antigen-specifická imunitní odpověď



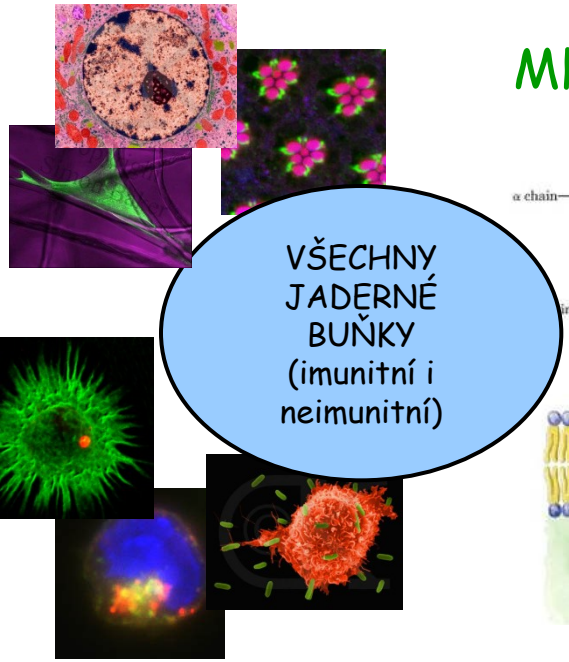
Antigen-specifická imunitní odpověď



Molekulární ekologie: Kdo a jak rozpozná parazita ?

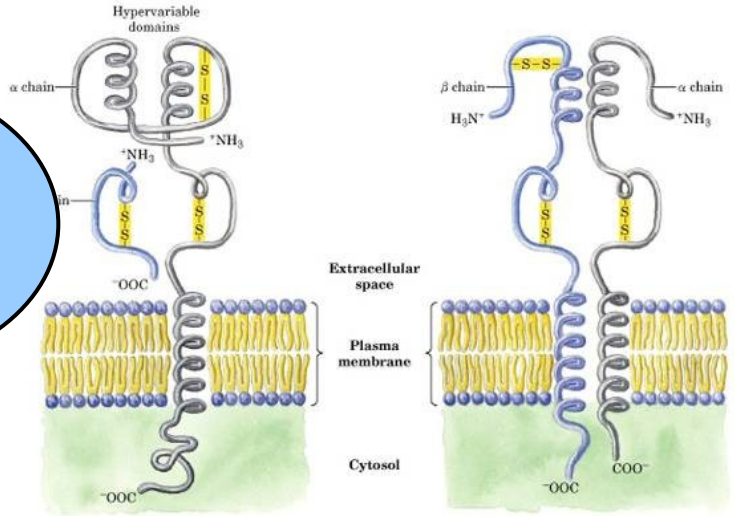


Major histocompatibility complex (MHC)

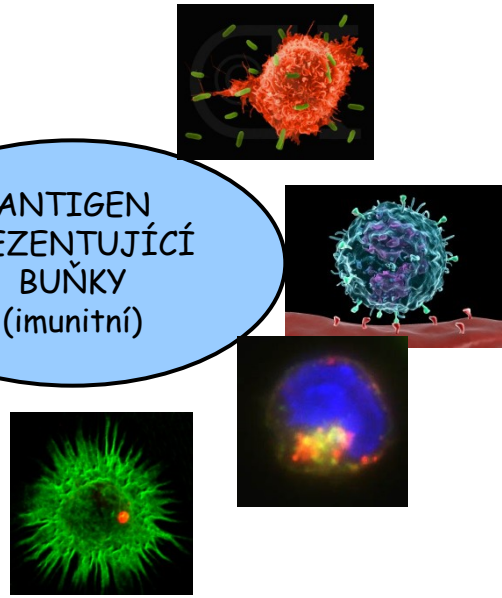


VŠECHNY JADERNÉ BUŇKY (imunitní i neimunitní)

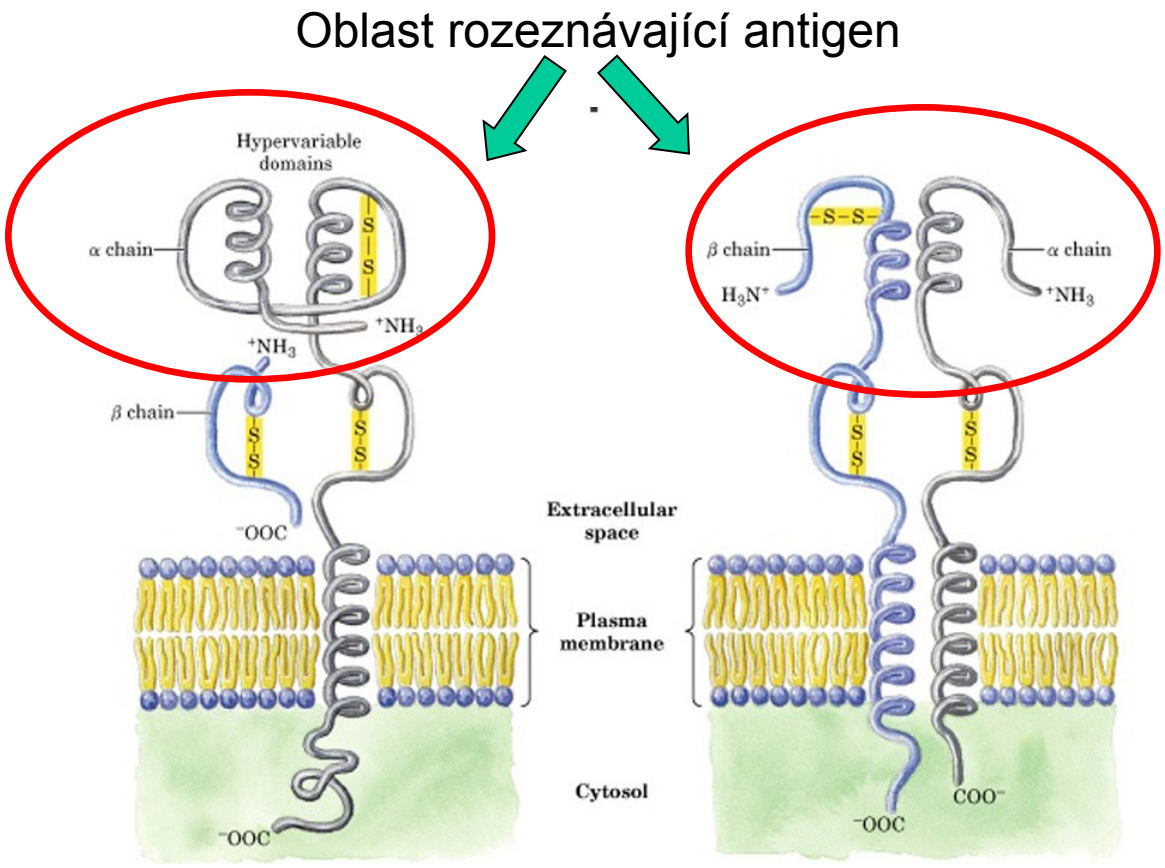
MHC třídy I MHC třídy II



ANTIGEN PREZENTUJÍCÍ BUŇKY (imunitní)

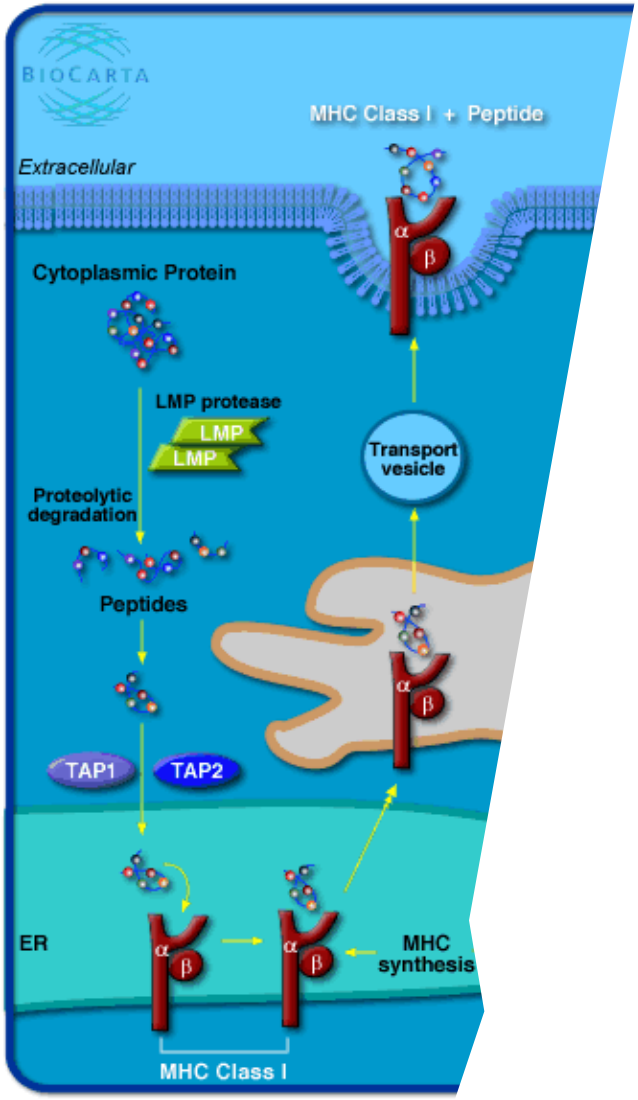


Major histocompatibility complex (MHC)



Class I Class II

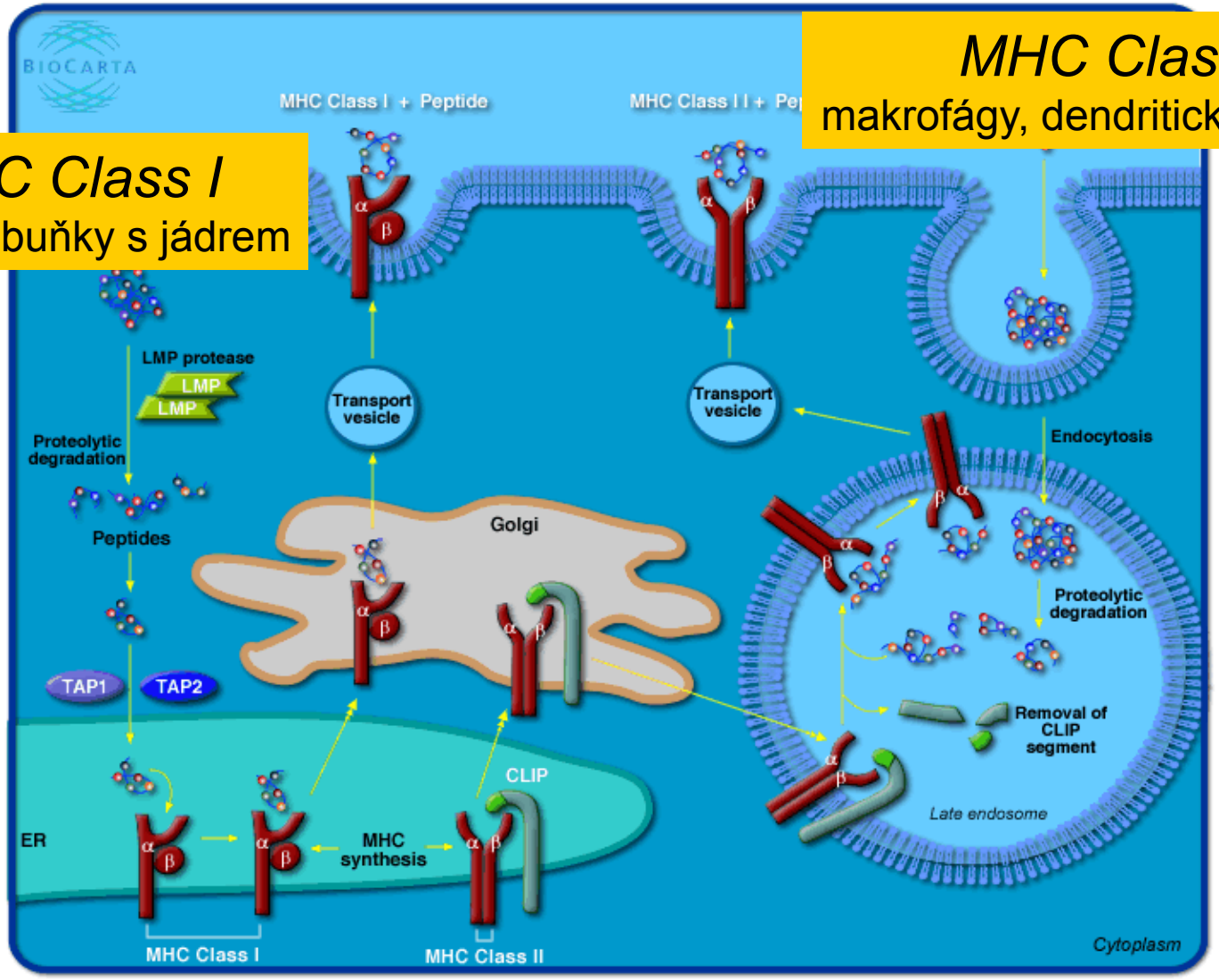
Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu



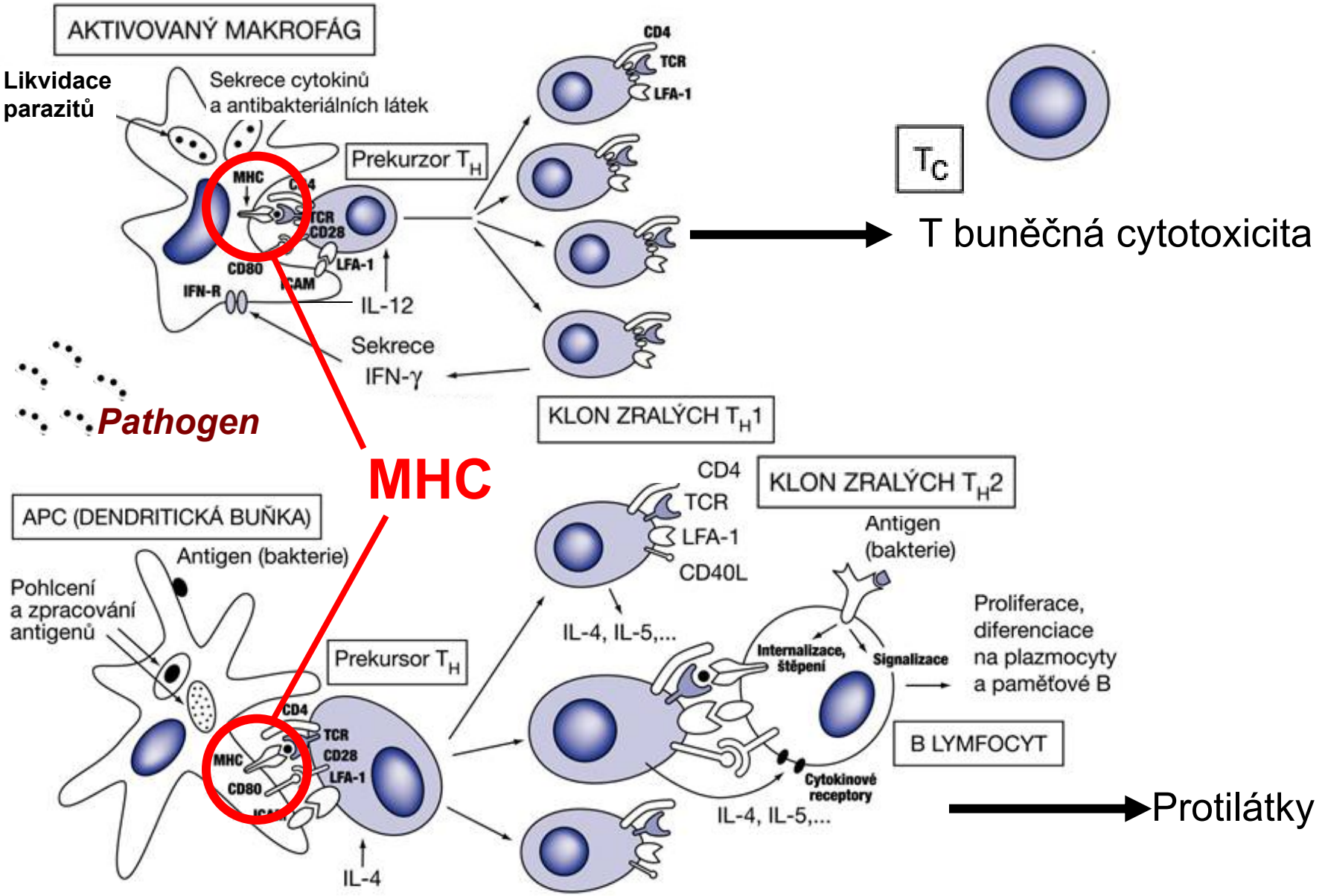
Funkce MHC: rozeznání a prezentace cizorodého antigenu

MHC Class I
všechny buňky s jádrem

MHC Class II
makrofágy, dendritické buňky aj.



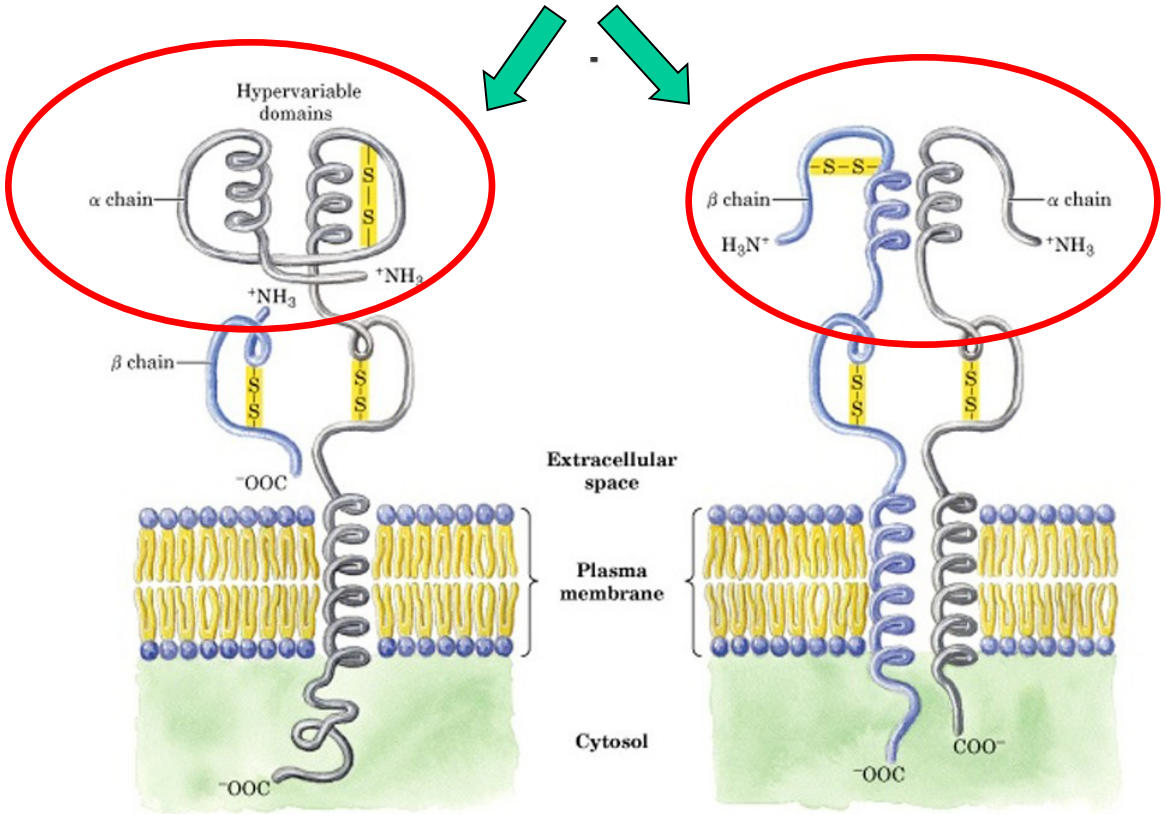
Buňka nabízející antigen spustí imunitní odpověď



Jak zjistit, že je MHC pod selekcí?

Major histocompatibility complex (MHC)

Oblast rozeznávající antigen (antigen-binding sites = ABS)



Class I Class II

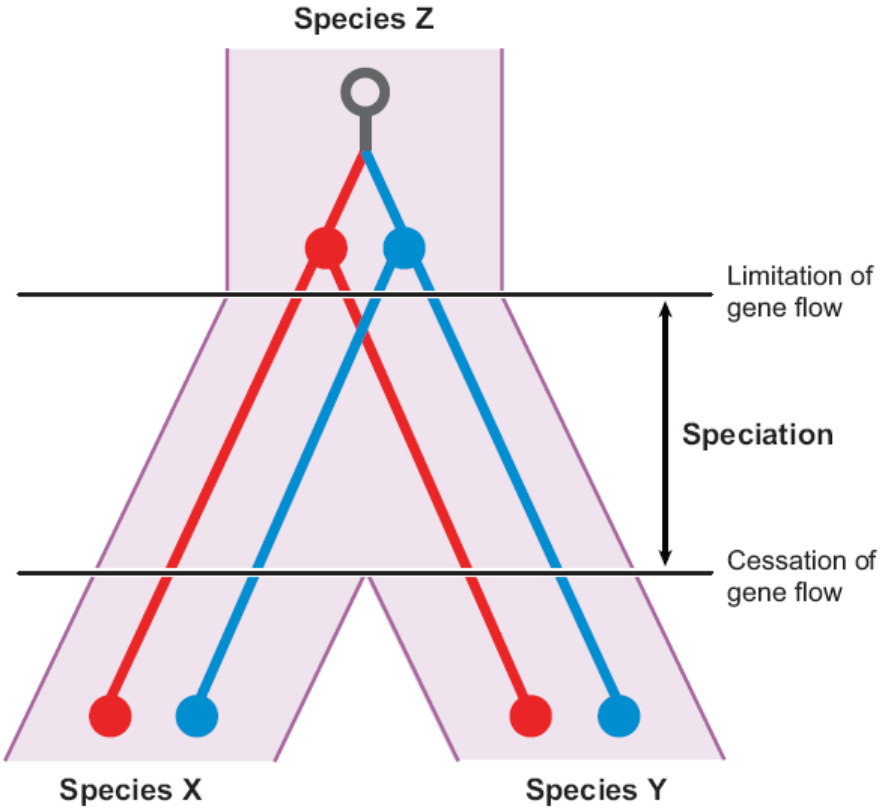
Je variabilita MHC důsledkem přírodního výběru?

Pozitivní selekce - vytvoření a udržení velkého množství funkčních variant

Trans-species polymorfismus

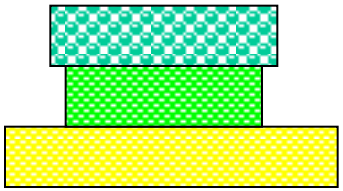
- výhodné alelické linie přetrvávají i po oddělení druhů = detekce selekce fylogenetickou analýzou

- „gene tree" vs. „species tree"



Fylogenetická analýza MHC sekvencí

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



Mus

Rattus

Bryja et al. 2006, Immunogenetics

Pozitivní historická selekce na MHC Class II

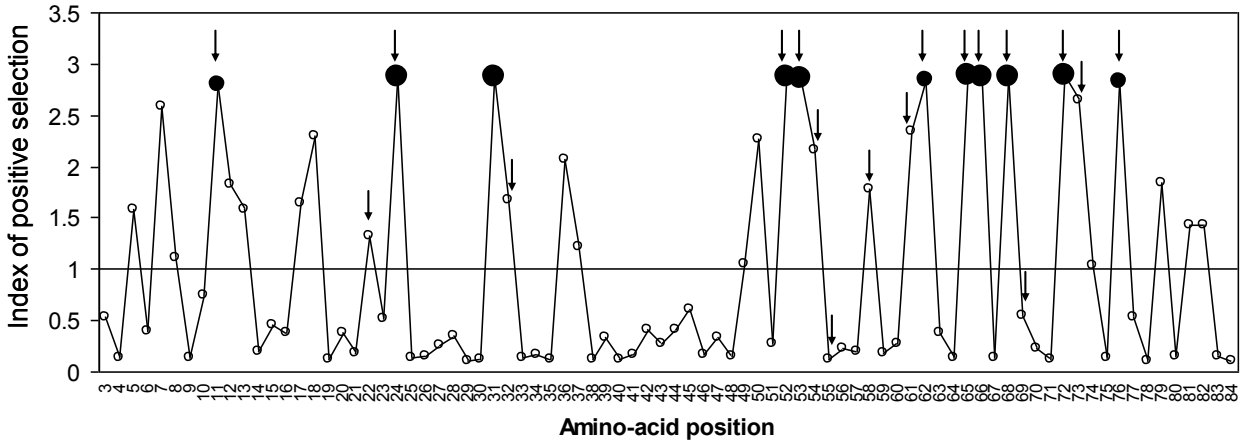
1) Poměr nesynonymních a synonymních mutací (dN/dS) na různých pozicích MHC molekuly

špatně určená pozice ABS (?)

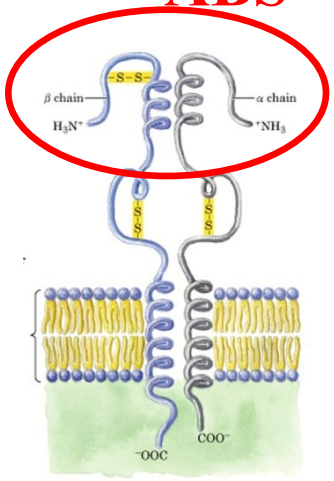
dN/dS	ABS	Non ABS
DRB	5.25	3.00
DQA	**3.16**	**0.33**

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

DQA



ABS



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

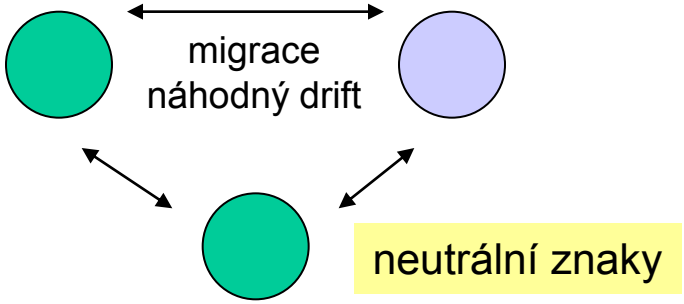
Důkaz a mechanismus recentní selekce

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

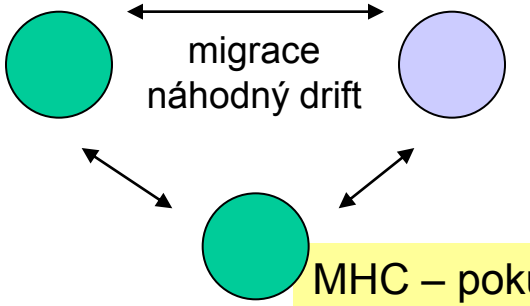
- Asociace MHC genů a výskytu parazitů

1) Analýza populačně-genetické struktury

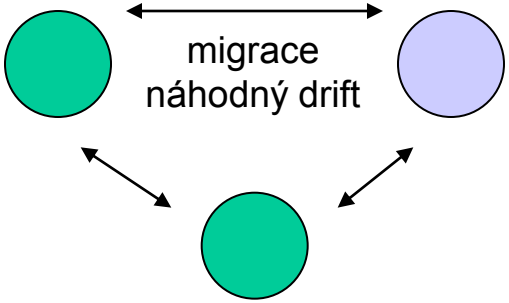
- Srovnání populačně-genetické struktury na MHC genech a neutrálních znacích (mikrosatelity)



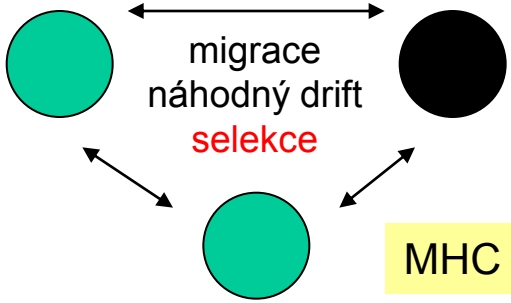
neutrální znaky



MHC – pokud nepůsobí selekce

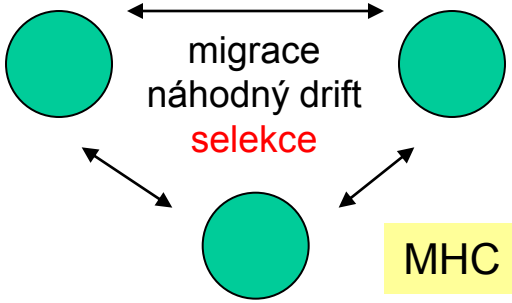


neutrální znaky



MHC

diverzifikující selekce



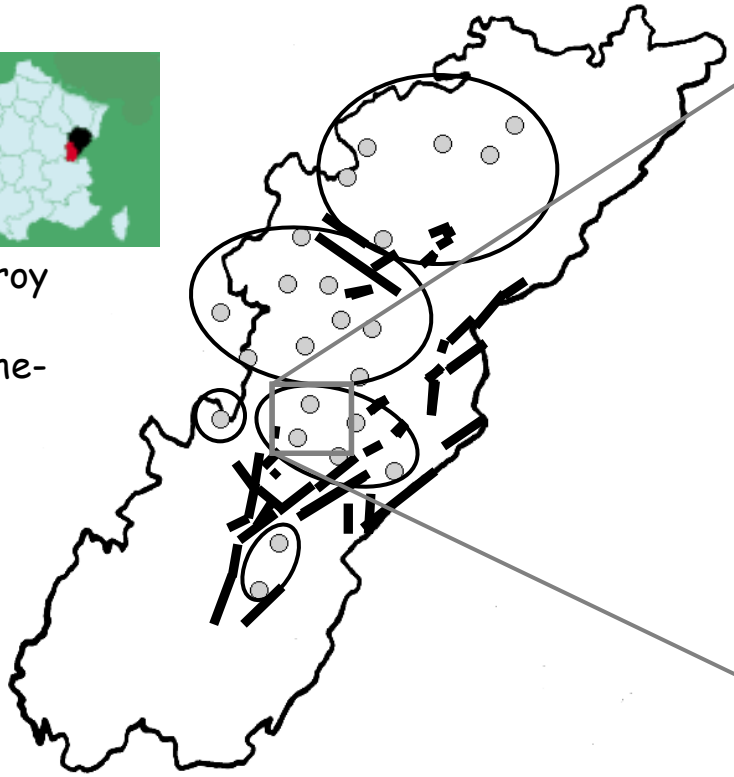
MHC

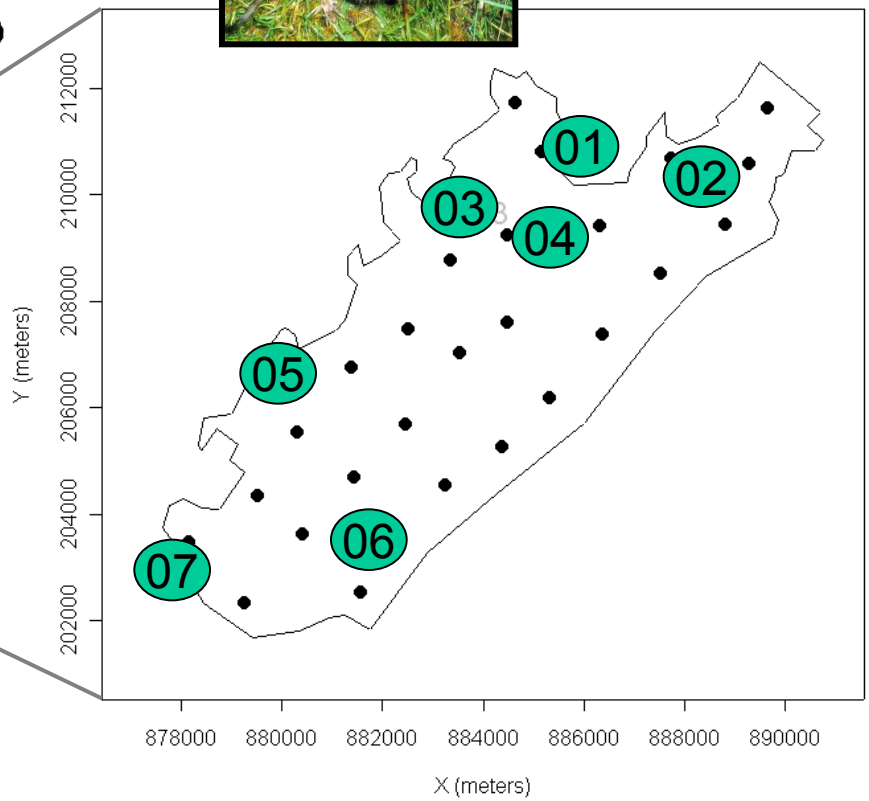
balancující selekce

Důkaz přírodního výběru v současnosti: analýza populačně-genetické struktury

- Srovnání neutrálních znaků a MHC

Canton Nozeroy (pohoří Jura, région Franche-Comté)

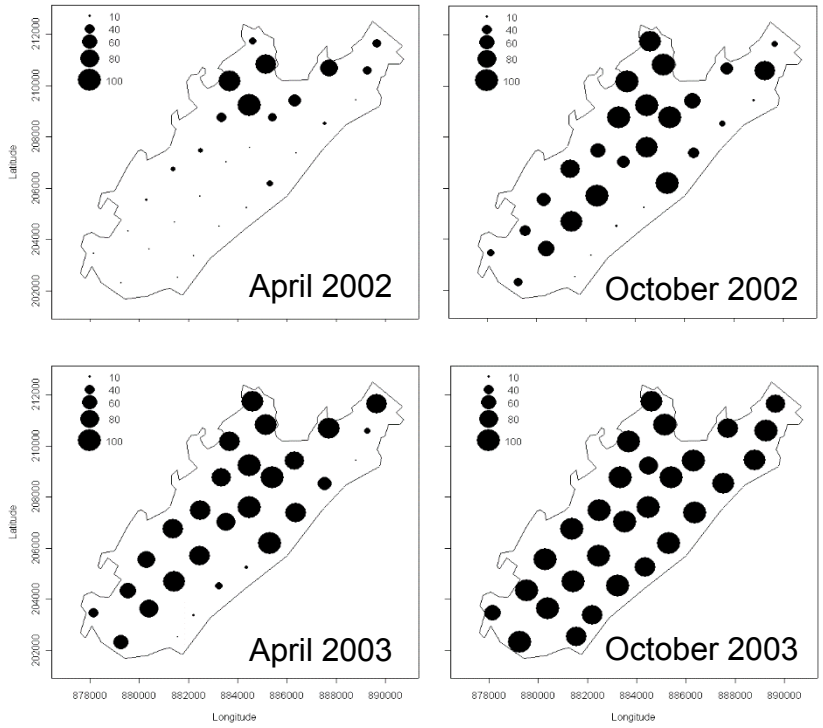


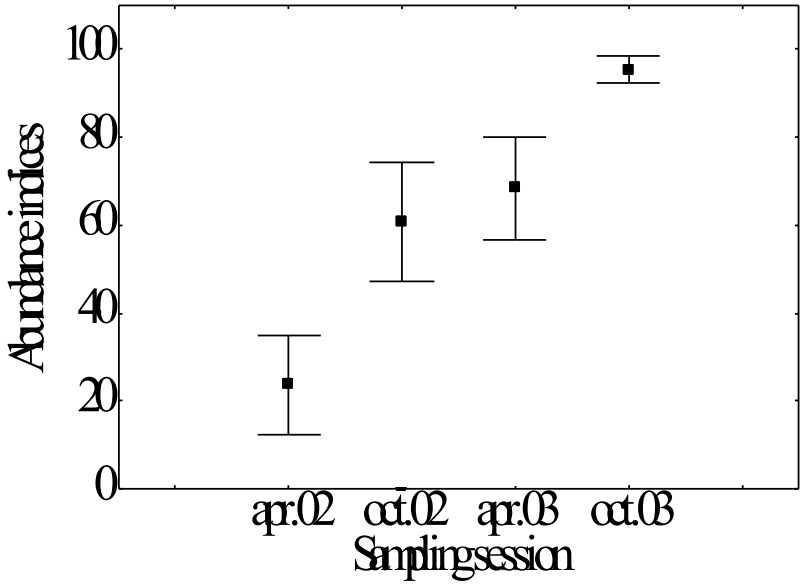


Studované lokality – 7 populací ve stejné fázi populačního cyklu

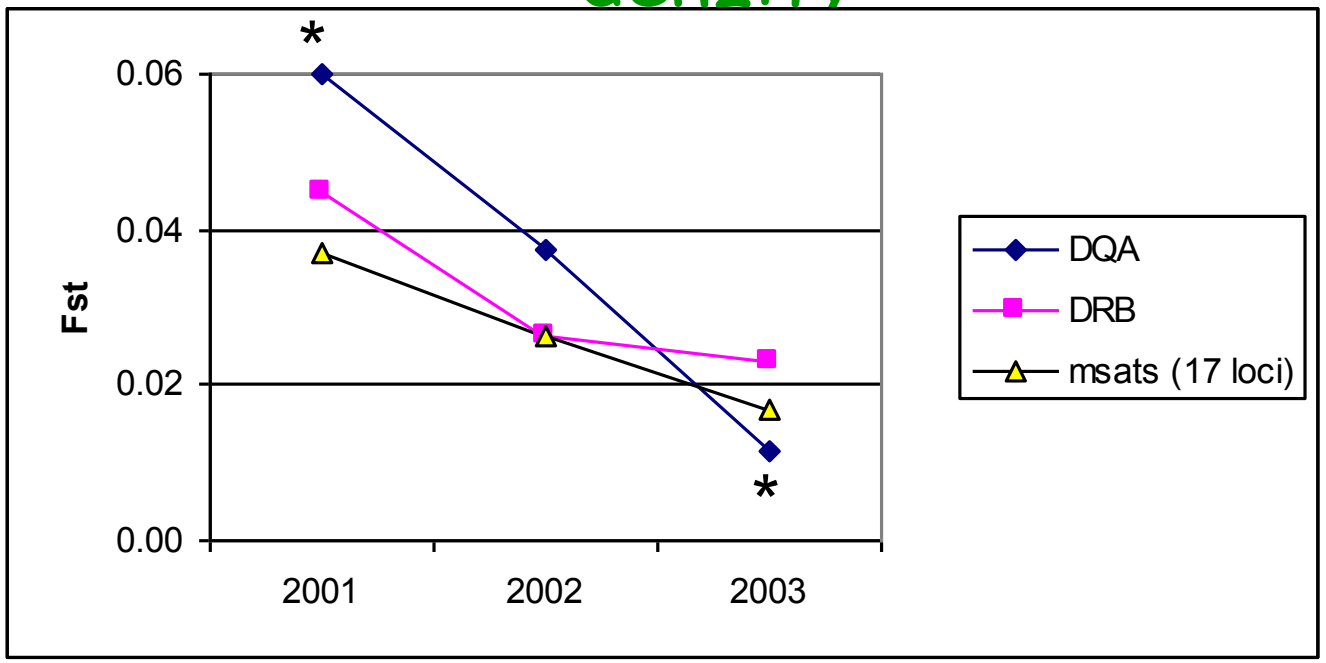
Bryja et al. 2007, Molecular Ecology

→ 2001-2003: fáze růstu populační hustoty





Diferenciace populací v průběhu růstu denzity



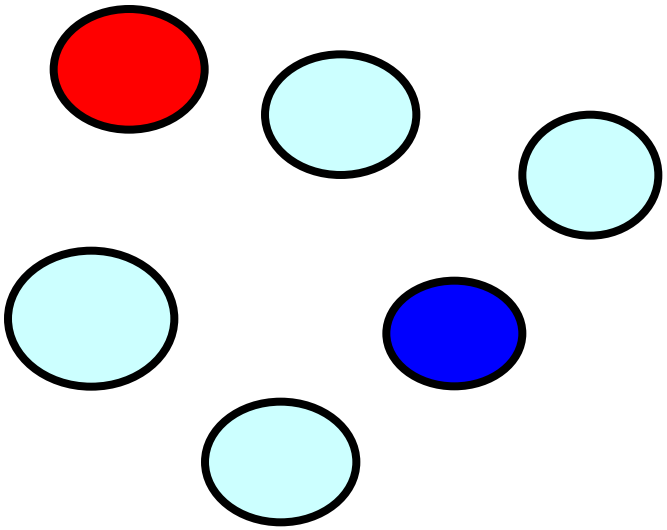
* Signifikantní rozdíl DQA1 vs. mikrosatelity

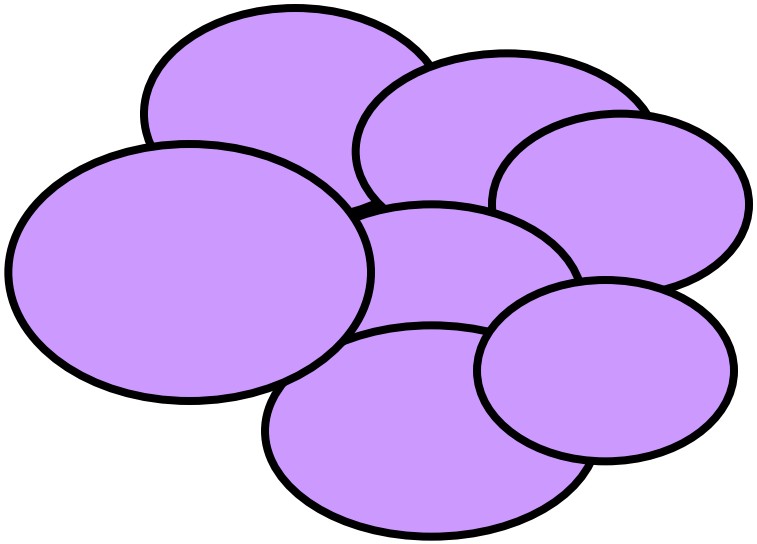
Pokles diferenciace s nárůstem denzity (nárůst disperze, tj. toku genů)

MHC (zejména DQA1) – signifikantně odlišné od mikrosatelitů

Bryja et al. 2007, Molecular Ecology

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

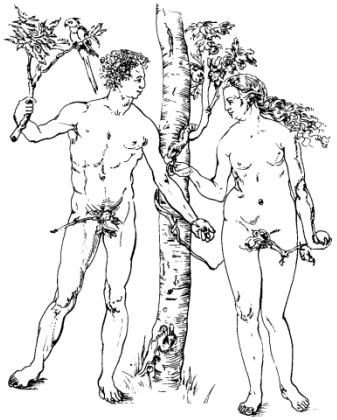
Bryja et al. 2007, Molecular Ecology

Jaké jsou mechanismy přírodního výběru pro udržení vysoké variability MHC?

- Hypotéza výhody heterozygotů (= „overdominance hypothesis“)

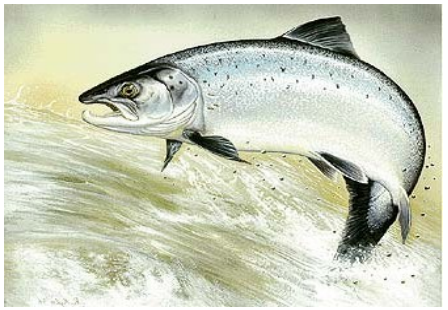
- Výhoda vzácné alely (= selekce negativně závislá na frekvenci)

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

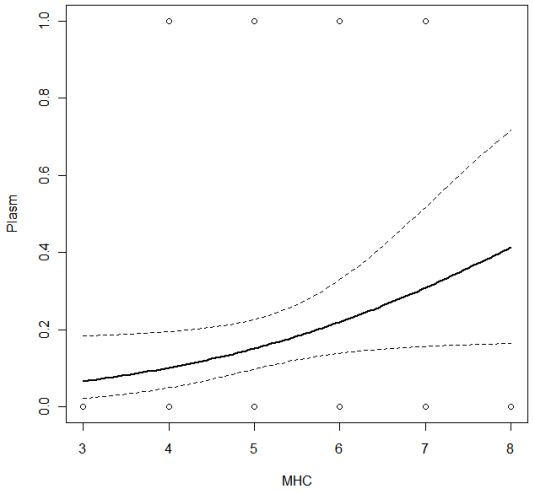


- Člověk – rychlost vývoje onemocnění HIV nebo hepatitidy B je asociována s MHC heterozygotností

- 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

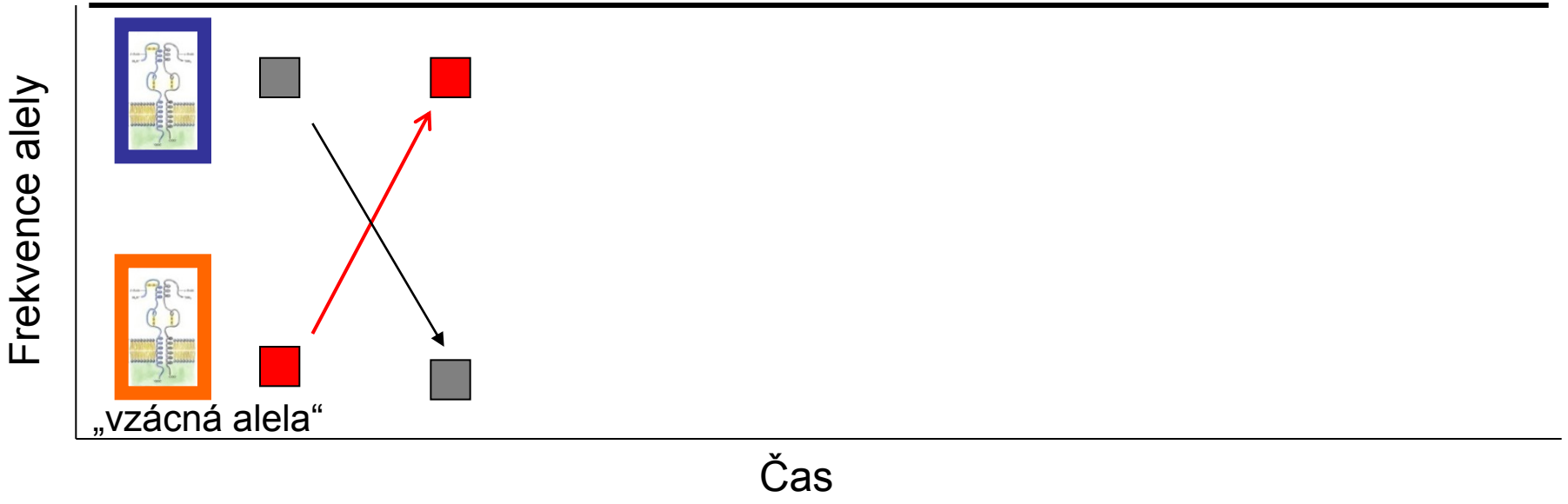


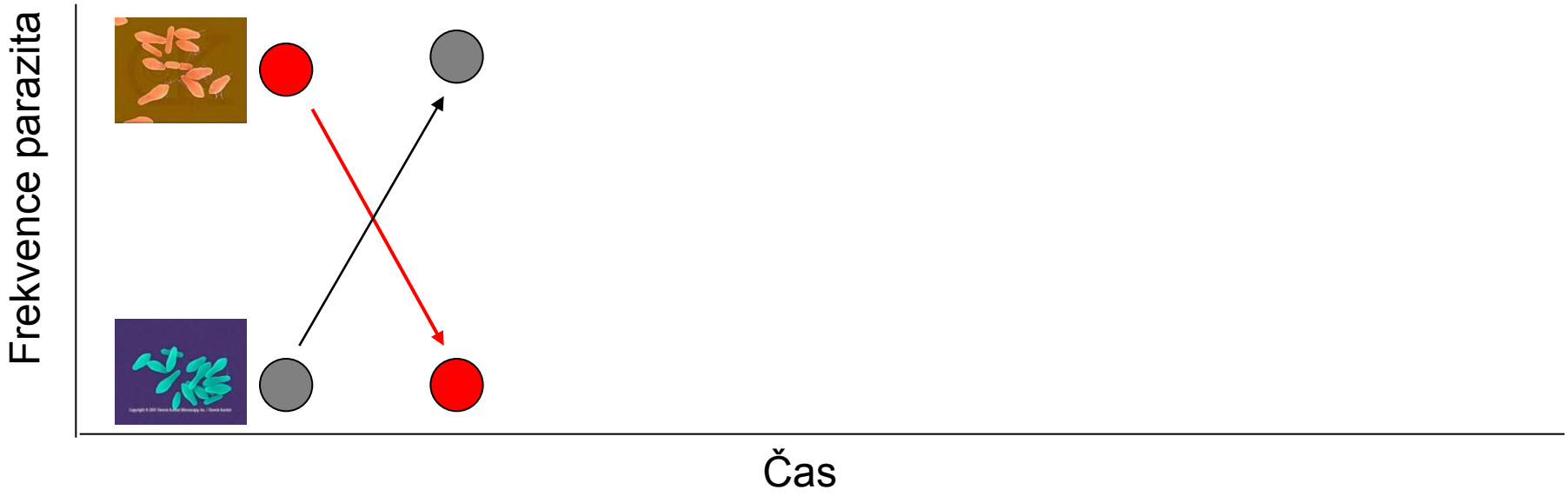
- Nejednoznačné výsledky v mnoha dalších příkladech
- Teoretické modely tuto hypotézu nepodporují ...

Výhoda vzácné (výhodné) alely

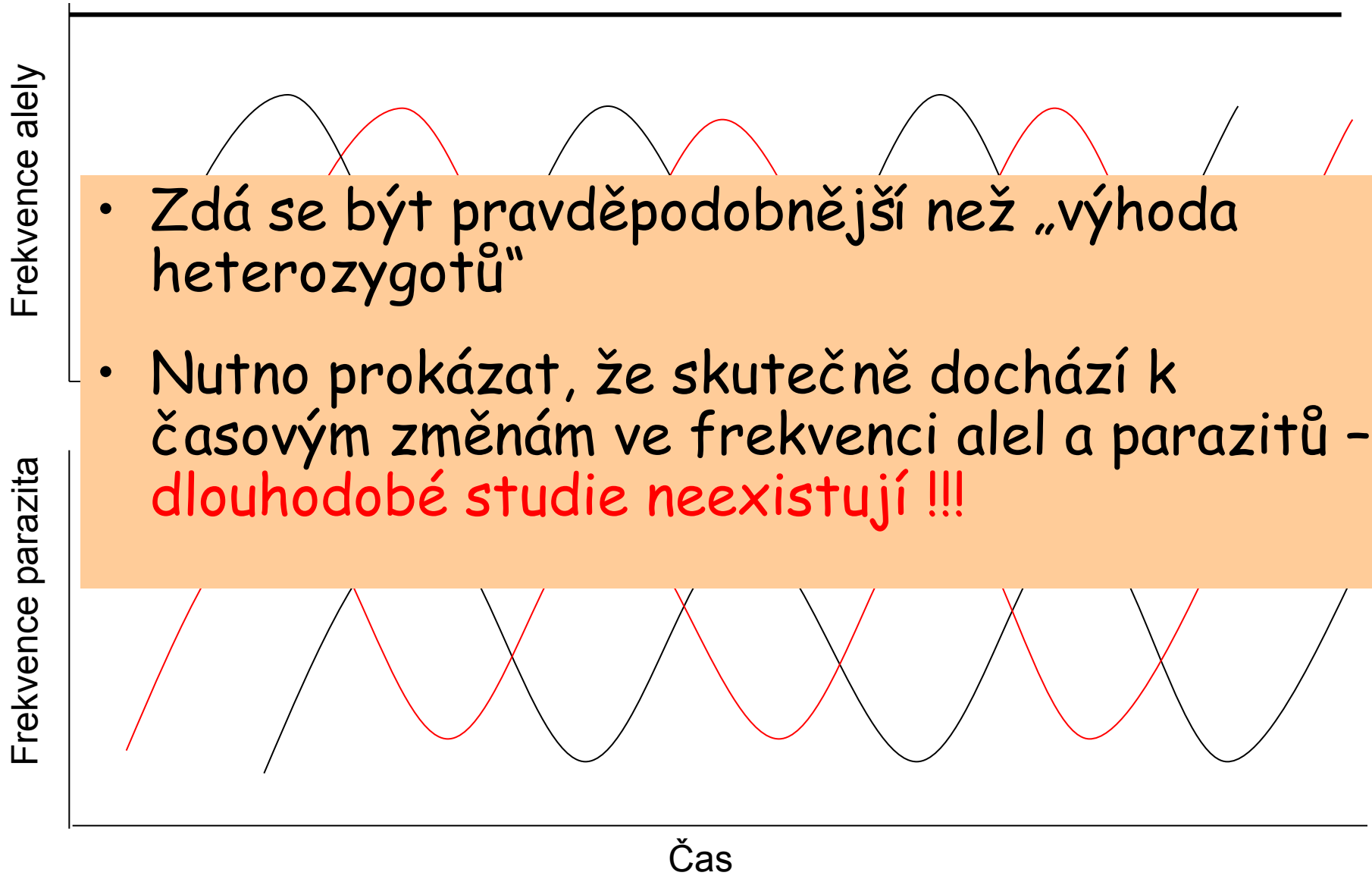
- Dynamická koevoluce mezi hostitelem a parazitem (= hypotéza „červené královny“) = **selekce negativně závislá na frekvenci**

Výhoda vzácné (výhodné) alely



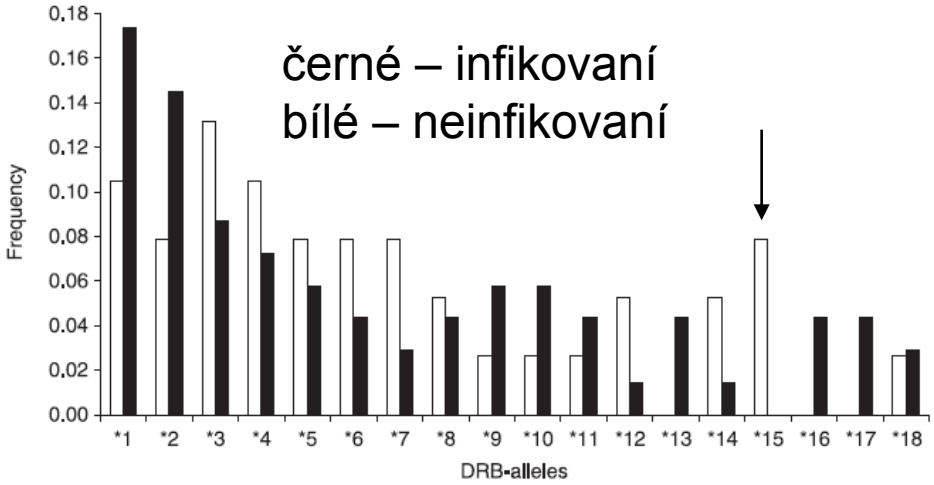


Výhoda vzácné (výhodné) alely



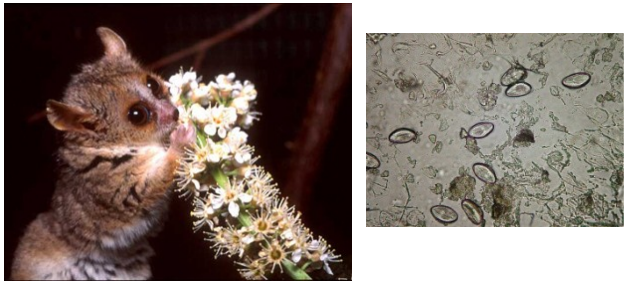
- Zdá se být pravděpodobnější než „výhoda heterozygotů"
- Nutno prokázat, že skutečně dochází k časovým změnám ve frekvenci alel a parazitů – dlouhodobé studie neexistují !!!

Asociace MHC genů a parazitů



vajíčka Nematoda v trusu

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

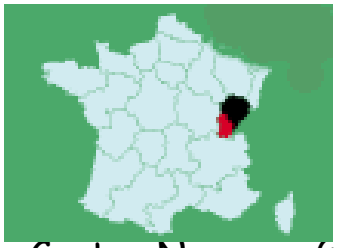


Microcebus murinus
(Schad et al., Evolution 2005)

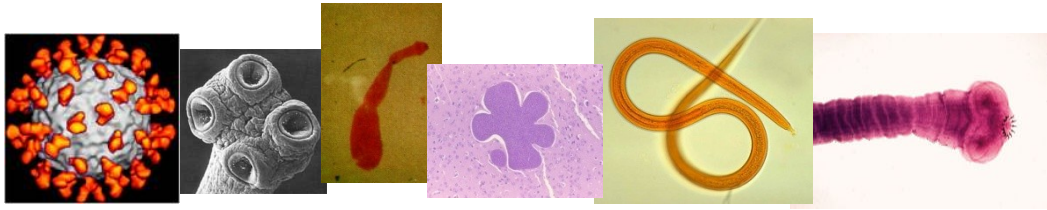
Apodemus flavicollis
(Meyer-Lucht & Sommer, Mol. Ecol. 2005)

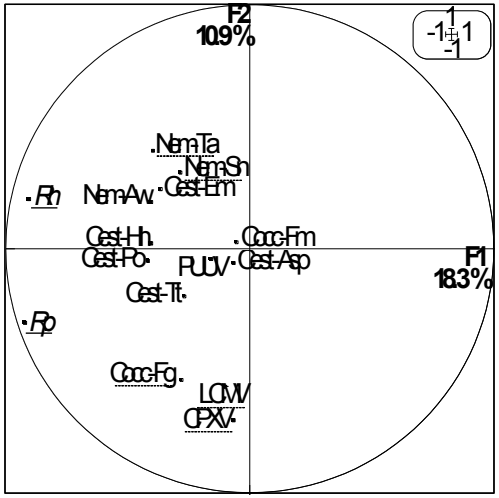
- Velké množství testů, riziko "false positives" → využití vícerozměrných metod

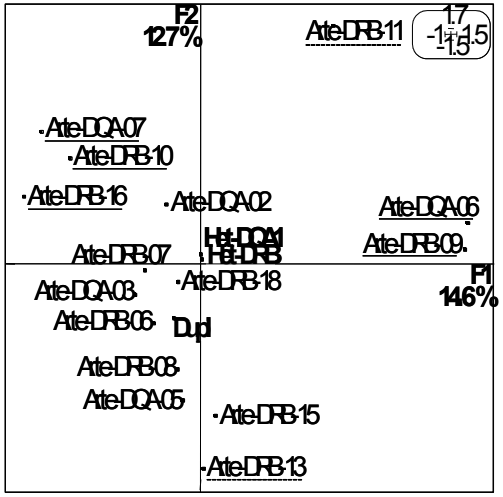
Př. Arvicola terrestris – hryzec vodní



Canton Nozeroy (pohoří Jura, région Franche-Comté)

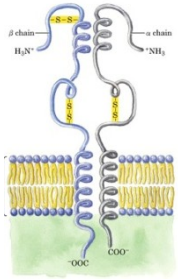


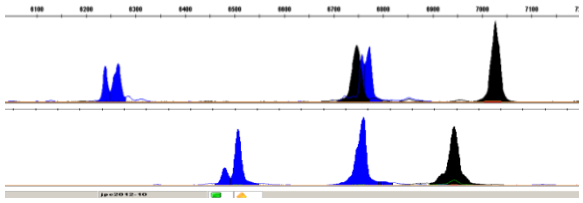




- 6 populací, 3 roky
- téměř kompletní parazitologická analýza (včetně některých virů)
- vícerozměrné analýzy

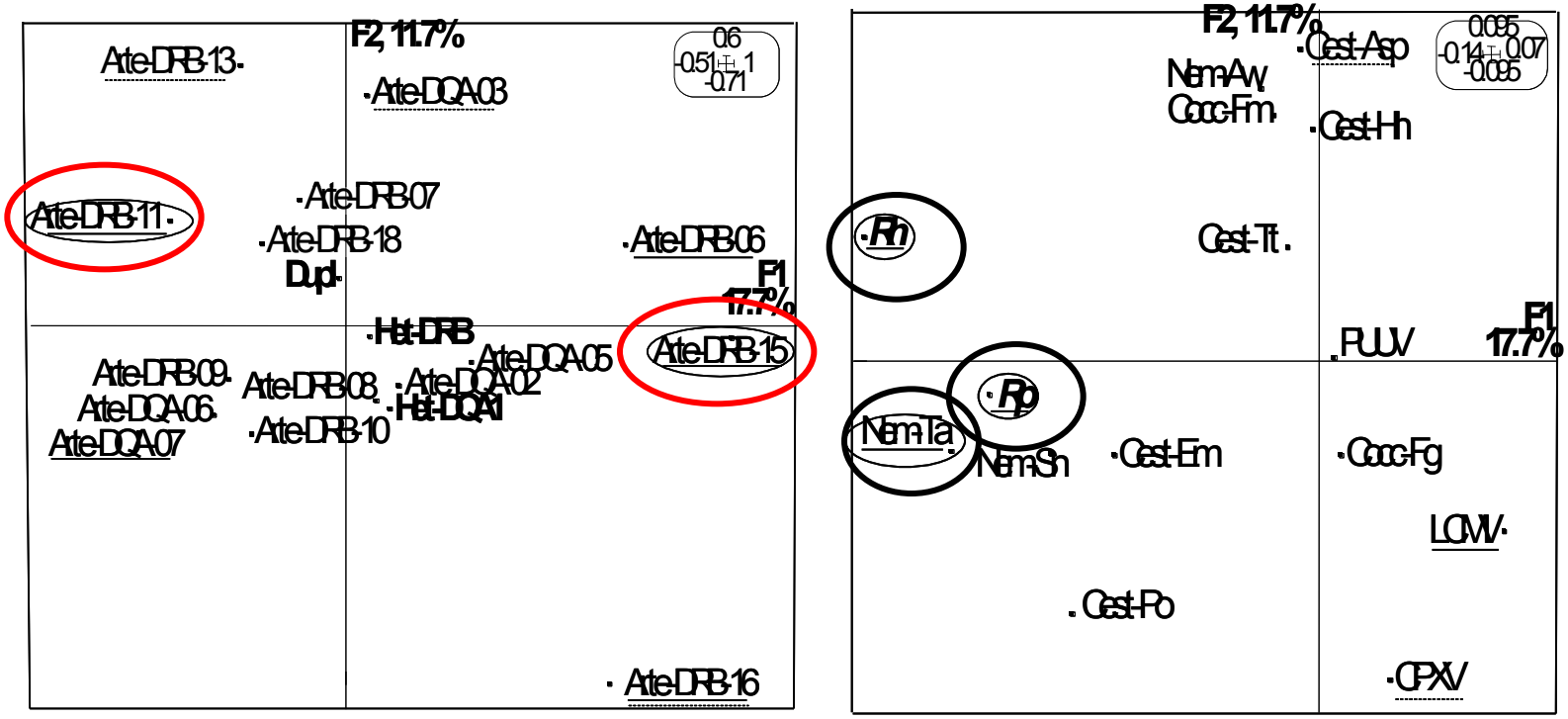
SSCP analýza



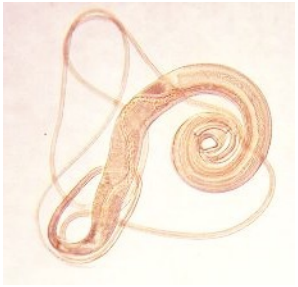


Tollenaere, Bryja, et al., Journal of Evolutionary Biology (2008)

Analýza koinercie (co-inertia analysis)



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



Tollenaere, Bryja, et al., Journal of Evolutionary Biology (2008)

Opinion TRENDS in Ecology and Evolution Vol.21 No.8

Full text provided by www.sciencedirect.com

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