

Využití molekulárních markerů v systematice a populační biologii rostlin

3. Analýza isoenzymů

Co jsou to enzymy ?

- proteiny (bílkoviny) – minimálně 100 aminokyselin spojených peptidickou vazbou
- funkce – katalyzátory chemických reakcí (umožňují přeměnu substrátu)
- je známo více než 2000 enzymů
- *isoenzymy* (isozymy) – enzymy se stejnou funkcí v metabolismu, katalyzující stejnou reakci, mají ale odlišnou (primární) strukturu
- *allozymy* – produkty kódované různými allelami jednoho genu – navzájem velmi podobné

Struktura enzymů

- aminokyseliny – záporně nebo kladně nabitý, příp. neutrální (amfiont) – záleží na pH
- *primární struktura* – sekvence aminokyselin, určena geneticky
- *sekundární a tercierní struktura* (tvar molekuly) – ovlivněna velikostí molekuly, nábojem a stupněm hydrofility – udržována S-S můstky, H-můstky, iontovými a hydrofobními interakcemi
- *kvartérní struktura* – složení z více podjednotek, monomer až tetramer apod.

Co lze pomocí isoenzymů zjistit?

- geneticky dané (dědičné) rozdíly
 - tj. rozdíly v primární struktuře
- rozdíly se odrážejí v
 - celkovém náboji molekuly
 - tvaru a velikosti molekuly
- tj. odlišnou pohyblivost jednotlivých isozymů v elektrickém poli

Jak studujeme izozymy

1. extrakce

- z čerstvého materiálu
- homogenizace s extrakčním pufrem
- centrifugace
- supernatant možno zmrazit na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uchovat

2. separace – elektroforéza

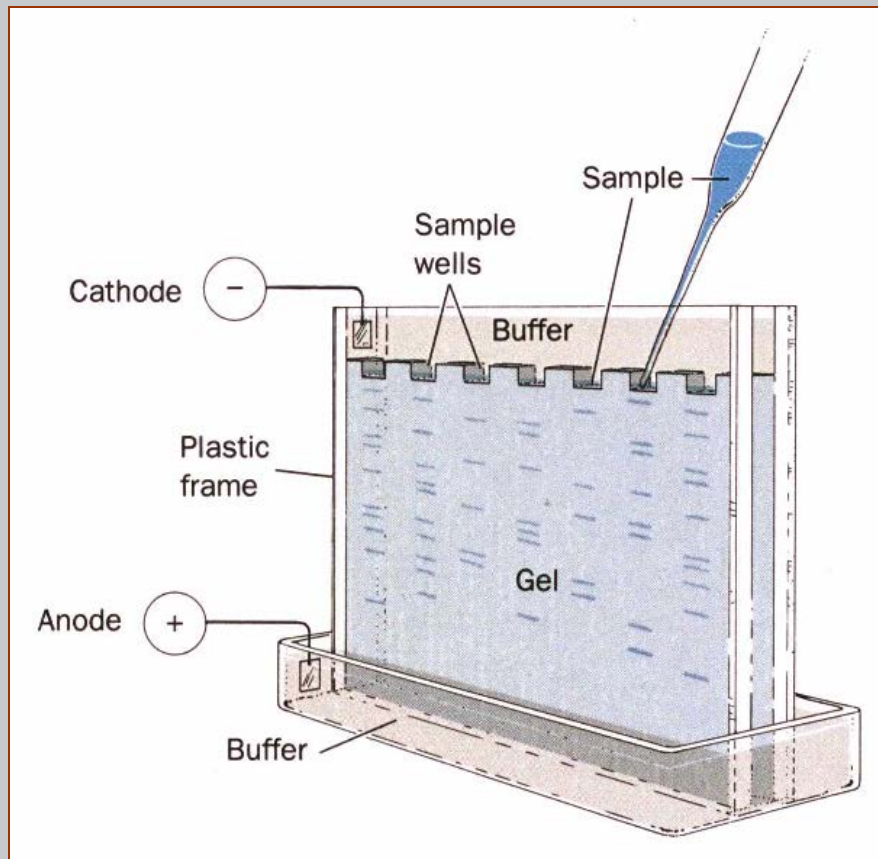
3. detekce

Elektroforéza

- rozdělení molekul podle jejich pohyblivosti v elektrickém poli
- většina AMK – záporný náboj při alkal. pH
- pohyb molekul k anodě (kladně nabitá)
- pohyblivost závisí na
 - velikosti a tvaru molekuly
 - náboji molekuly
- citlivá metoda – odlišení stejných molekul lišících se o jednotkový náboj

Elektroforéza – techniky

- vertikální – na polyakrylamidovém gelu

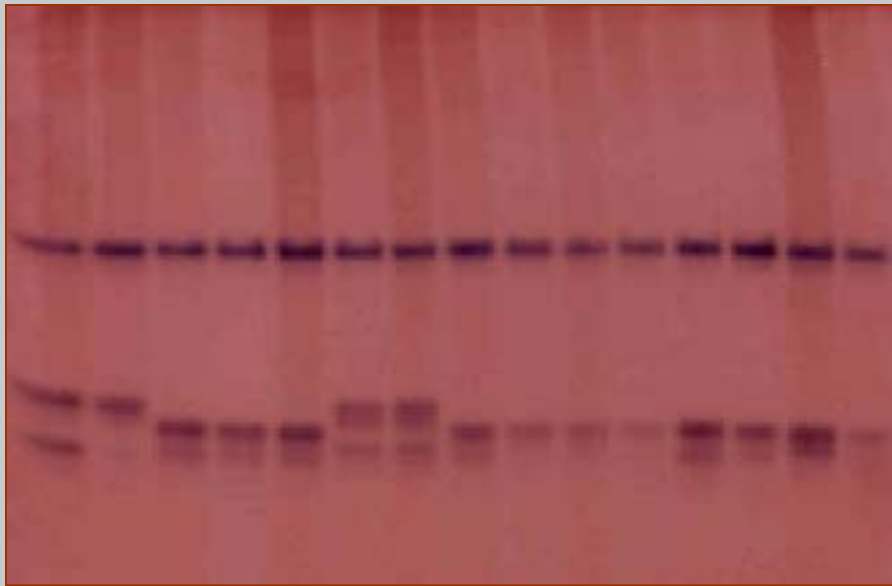


- horizontální – na škrobovém gelu

Detekce proteinů na gelu

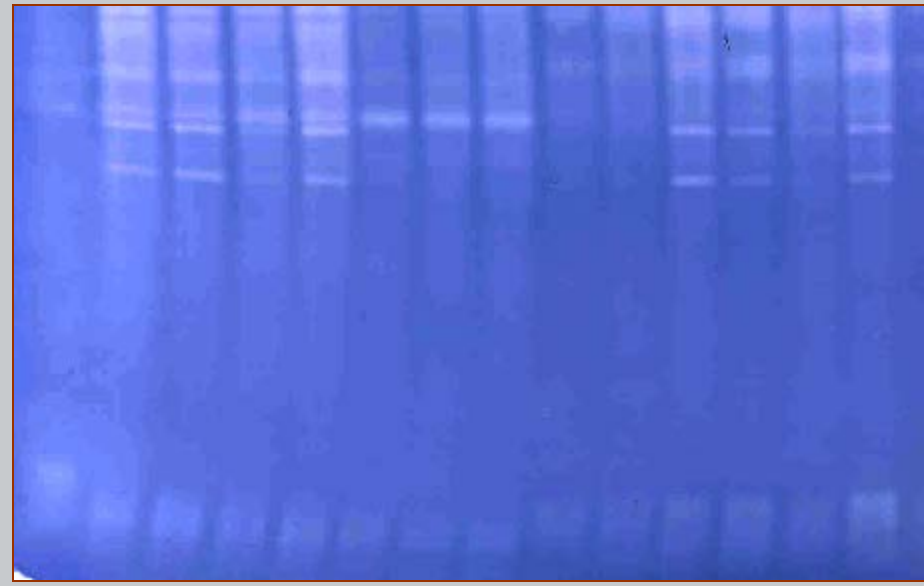
- na gelu není nic vidět
- je možno nespecificky obarvit všechny proteiny (*Coomassie Brilliant Blue*)
- detekce enzymové aktivity – specifické barvení – založené na reakci, kterou enzym katalyzuje
- různé typy detekce
 - produkt je barevný – v místě enzymu barevný pruh
 - substrát je barevný – v místě enzymu gel odbarvený
 - spřažená reakce – produkt nebarevný, ale další reakcí se dá zviditelnit

Příklady detekce enzymu



LAP

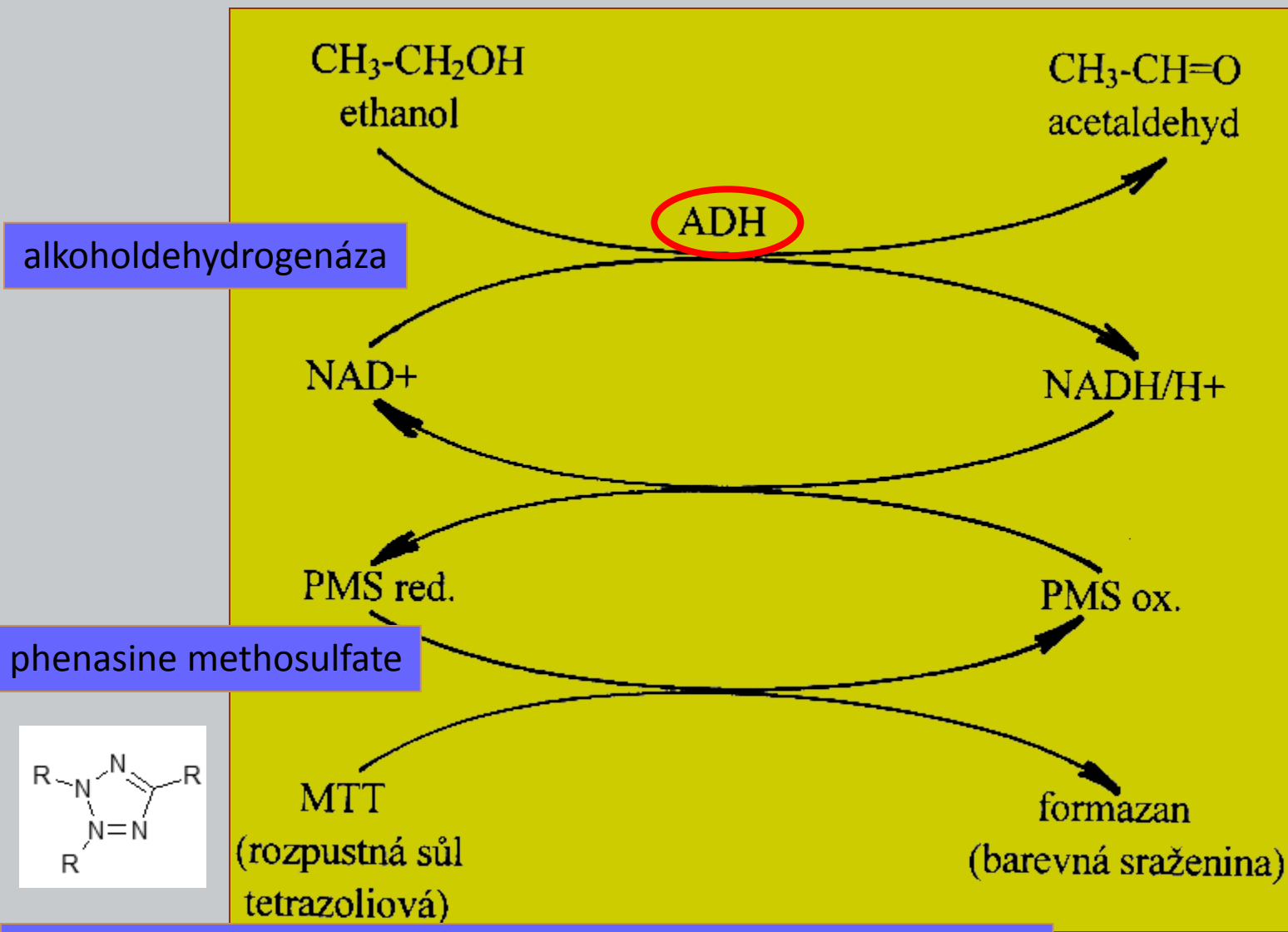
leucin aminopeptidáza



SOD

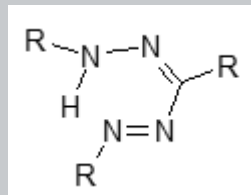
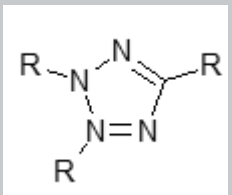
superoxid dismutáza

Detekce enzymové aktivity



alcoholdehydrogenáza

phenasine methosulfate



(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Klasifikace enzymů

1. *oxidoreduktázy* – přenos elektronů (oxidázy, dehydrogenázy)
2. *transferázy* – přenášejí skupinu (monosacharidovou, fosfátovou, methylovou, aminovou, acetylovou...)
3. *hydrolázy* – hydrolyticky štěpí C-O, C-N nebo C-C vazbu
4. *lyázy* – štěpí C-O, C-N nebo C-C vazbu
5. *isomerázy* – změna geometrické struktury
6. *ligázy* – spojení dvou molekul

Příklad enzymu

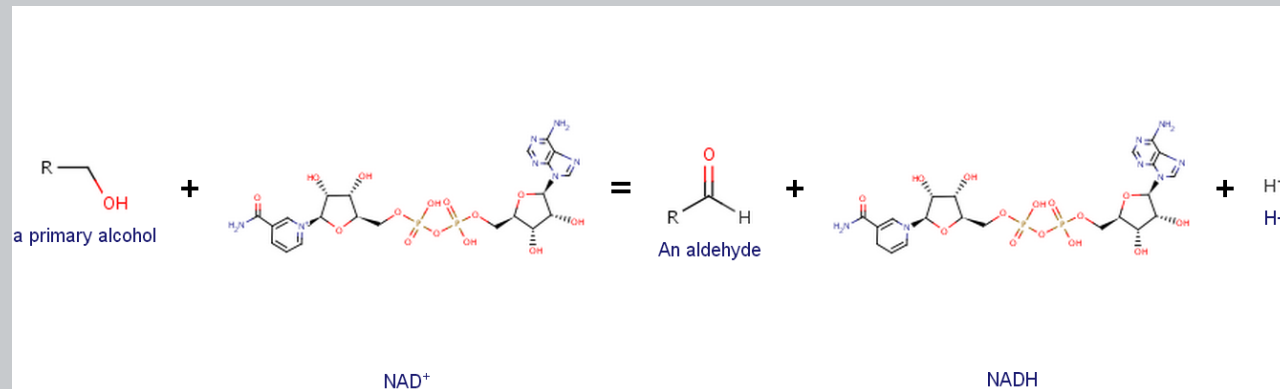
- E.C. 1.1.1.1 : alcohol dehydrogenase

📁 1 Oxidoreductases

📁 1.1 Acting on the CH-OH group of donors

📁 1.1.1 With NAD⁺ or NADP⁺ as acceptor

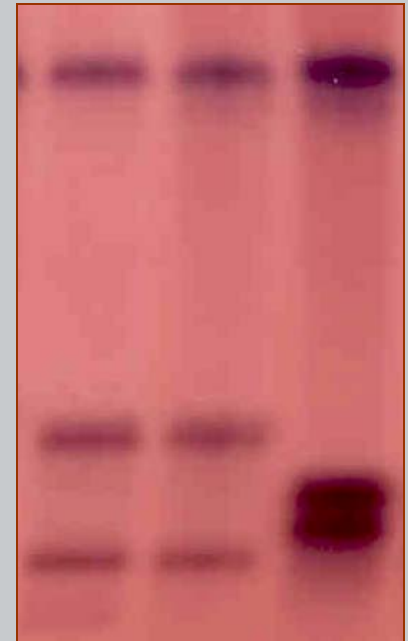
● 1.1.1.1 alcohol dehydrogenase



<http://www.brenda-enzymes.info/>

Co je vidět na gelu

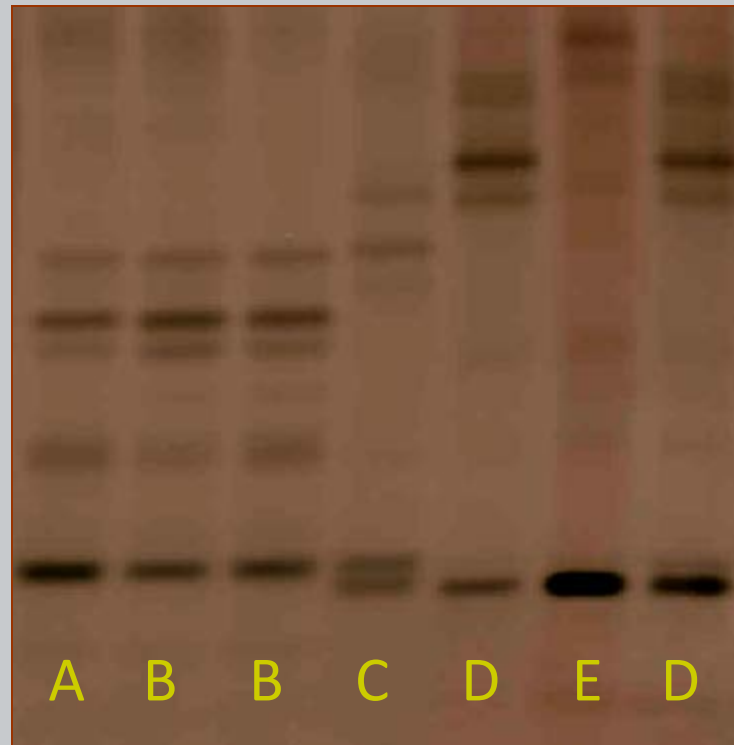
- *zymogram* – obrazec proužků na gelu
- proužky izozymů – zóny enzymatické aktivity
- předpoklady interpretace
 - rozdílná pohyblivost odráží rozdíly v DNA (rozdíl je dědičný)
 - komigrující proužky jsou homologní
 - kodominantní exprese
 - všechny alely jsou exprimovány
 - odlišíme homozygoty od heterozygotů
 - znalost kvartérní struktury enzymů



Vyhodnocení isozymových dat

prosté porovnání pattern proužků

- naprosto shodná – identifikace klonů



- omezená variabilita ...

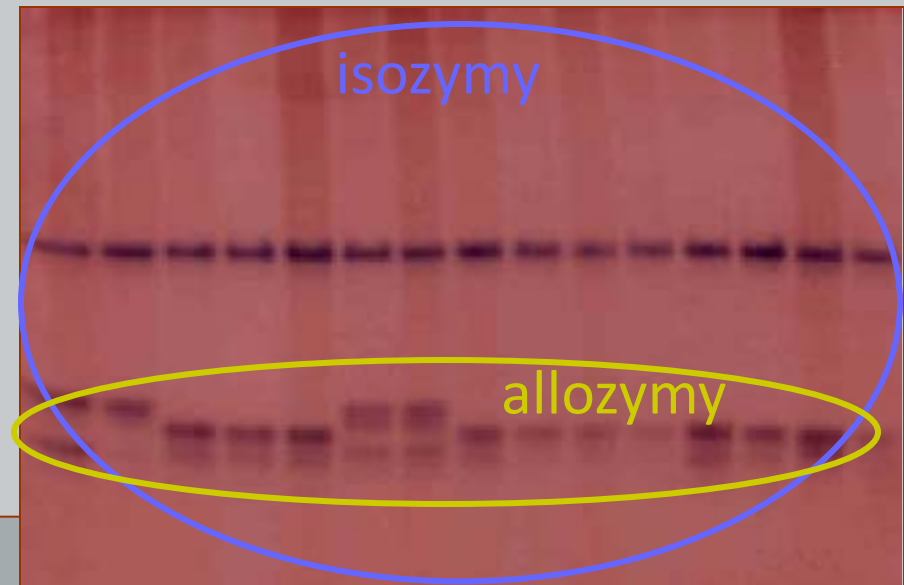
Alelické vyhodnocení izozymů

1. zjistit počet lokusů

- různé lokusy – izozymy např. z různých kompartmentů (cytosol, chloroplast apod.)

2. zjistit počet alel v lokusu

- kodominance
- kvarterní struktura
- ploidie organismu



isozyms – katalyzují stejnou reakci

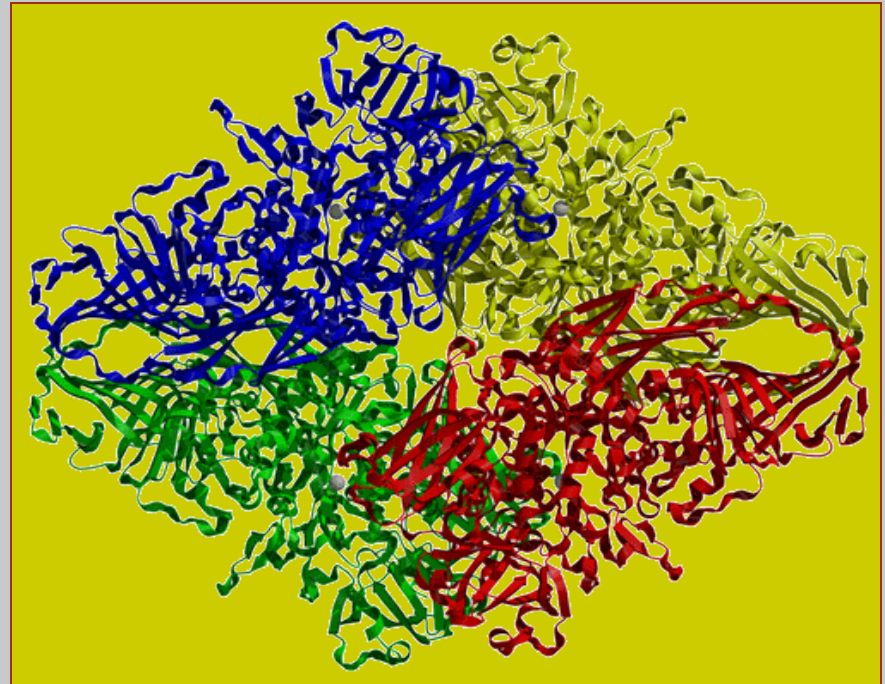
allozyms – produkty (alely) jednoho genu

Kvarterní struktura

počet a uspořádání podjednotek ve funkční enzym



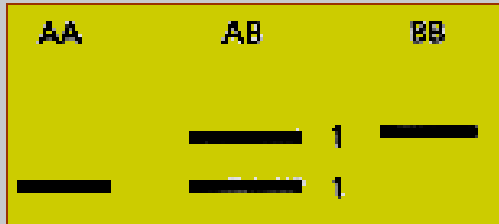
dimer



tetramer

Vyhodnocení heterozygotů v lokusu

monomer

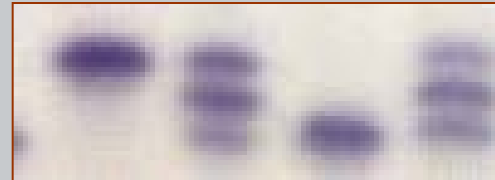


Leucine Aminopeptidase
(LAP)

Phosphoglucomutase
(PGM)

Shikimat Dehydrogenase
(SKDH)

dimer



Amino Aspartate Transferase
(AAT)

Alcohol Dehydrogenase (ADH)

Carboxylesterase (EST)

Glucose-6-Phosphate
Isomerase (GPI)

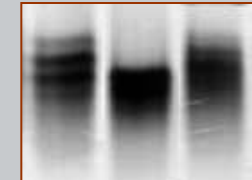
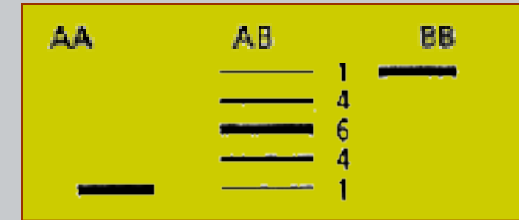
Isocitrate Dehydrogenase
(IDH)

Malate Dehydrogenase (MDH)

6-Phosphogluconate
Dehydrogenase (6PGDH)

Superoxide Dismutase (SOD)

tetramer

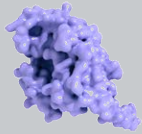


Glucose-6-Phosphate
Dehydrogenase (G6PDH)

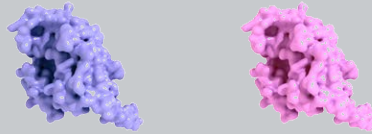
Malate Dehydrogenase NADP+
(ME)

Dimerické enzymy

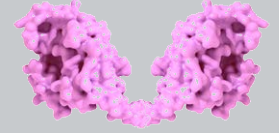
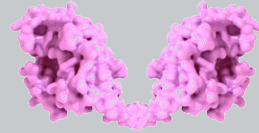
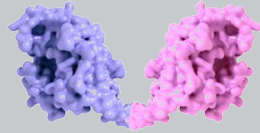
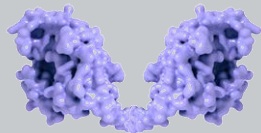
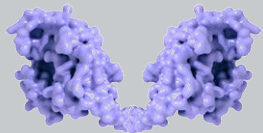
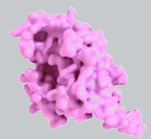
homozygot



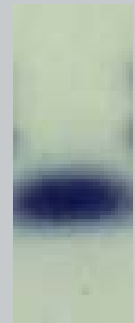
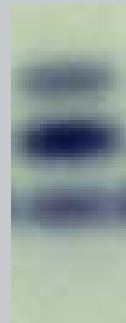
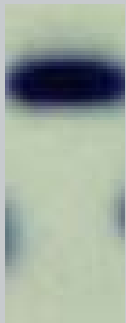
heterozygot



homozygot

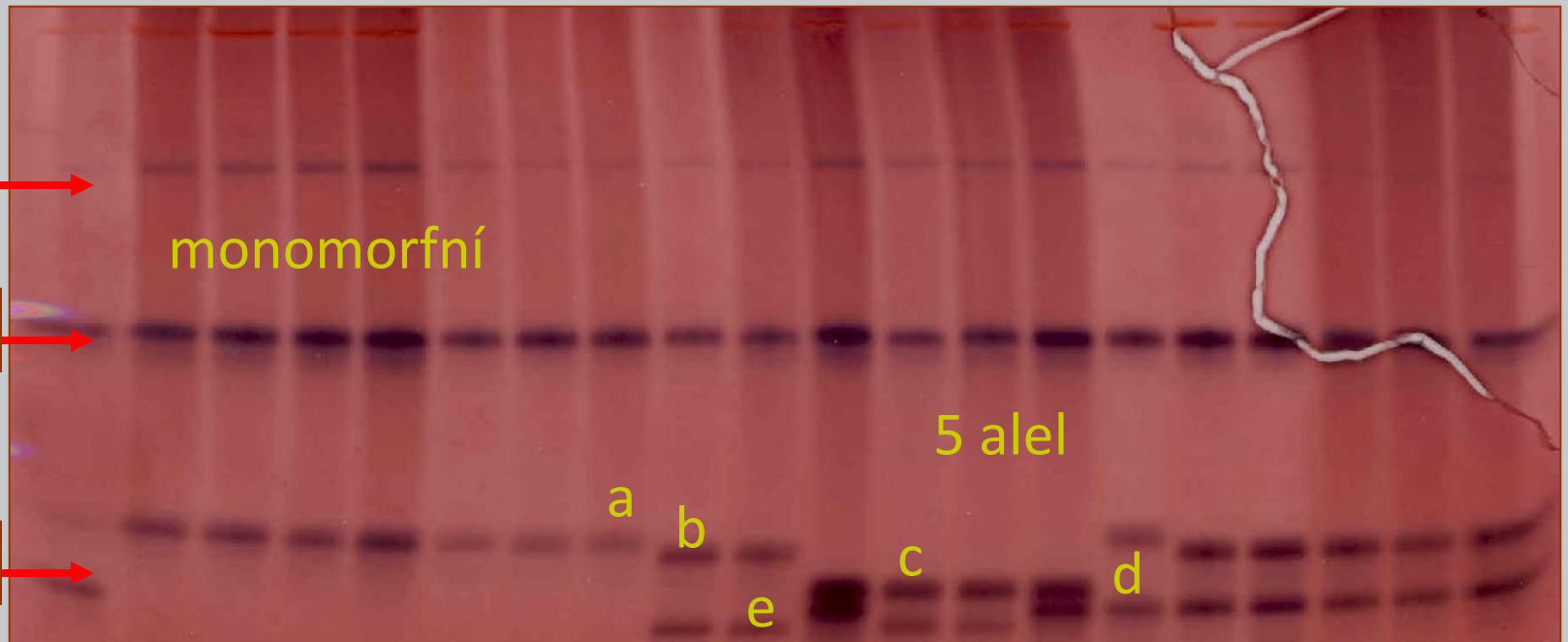


1 : 2 : 1



LAP – monomerní enzym

Sparganium erectum – diploid

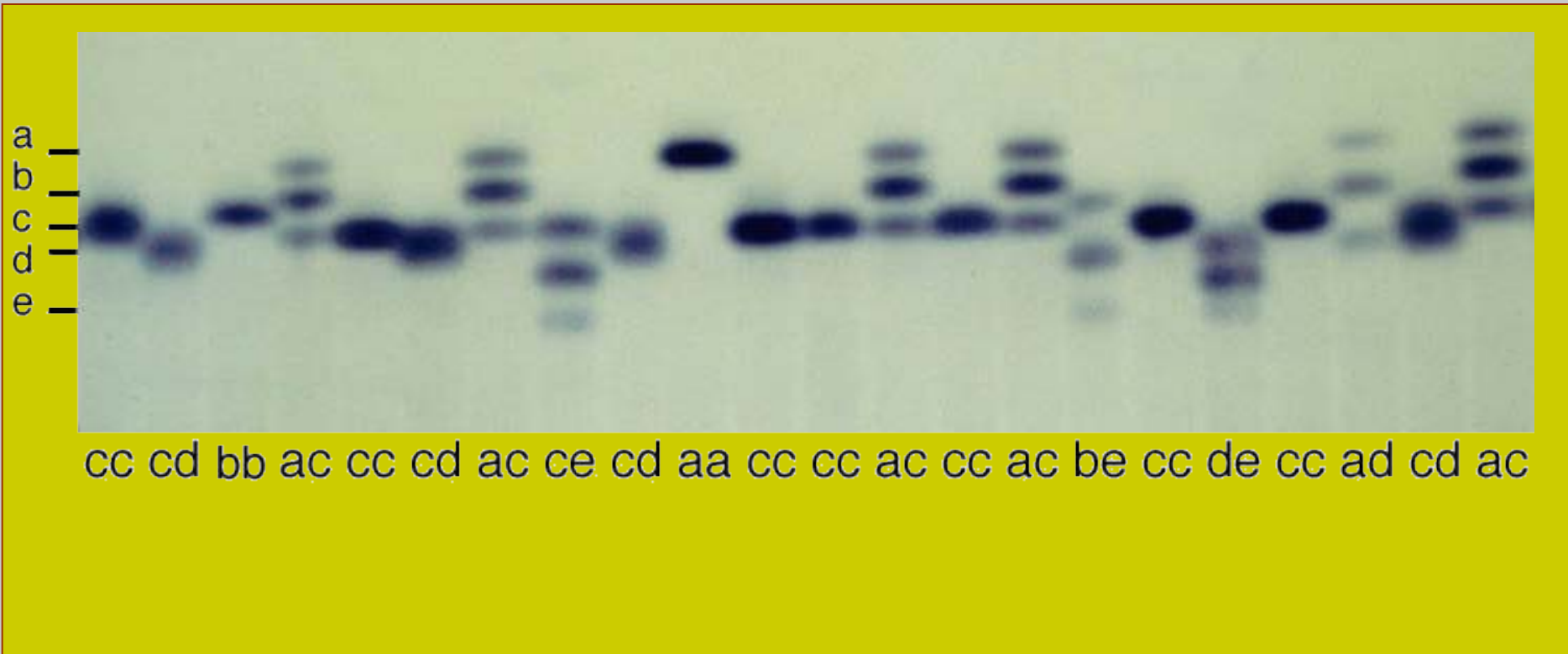


GENOTYPY

aa be be cd ce ce cd ad bd

6-PGDH – dimerický enzym

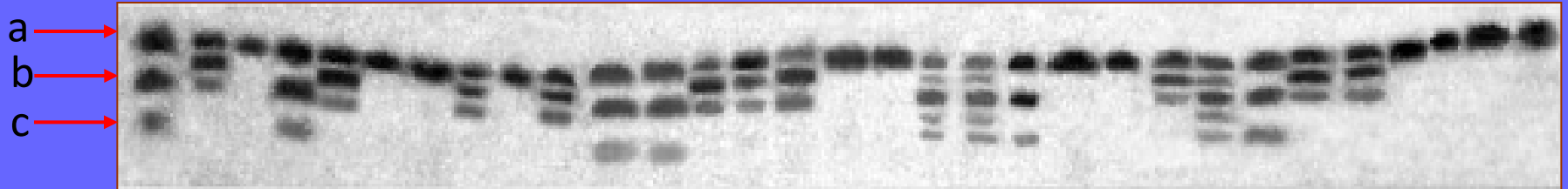
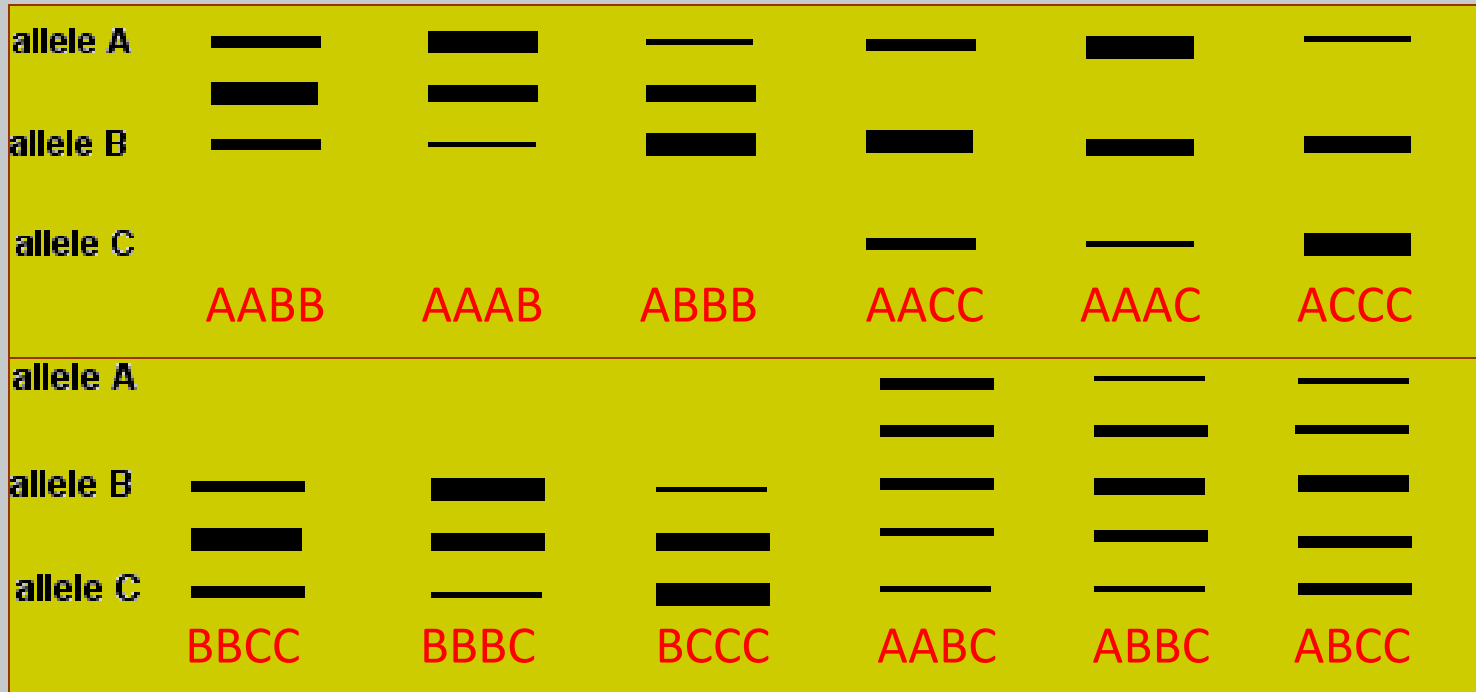
Arceuthobium (Viscaceae) – diploid



Tetraploidní organismy

- autotetraploidi
 - 2/2 heterozygoti – AAaa
 - 2 typy 3/1 heterozygotů – AAAa, Aaaa
 - *tetrasomická dědičnost* – všechny kombinace mohou nastat se stejnou pravděpodobností
- allotetraploidi
 - chromozomální i genetická diference genomu
 - *disomická dědičnost* – fixovaná heterozygosita – AABB

Zymogram tetraploidních organismů



A	A	A		A	A
A	A	A		A	A
A	A	A		B	B
C	B	A		B	C

Anemone nemorosa
 autotetraploid
 PGDH (dimer)
 (Stehlik & Holderegger 2000)

Analýza isozymů

výhody

- rychlá metoda – možno analyzovat mnoho jedinců najednou
- levná technika (v porovnání s DNA technikami)
- srovnatelná data mezi různými studii
- kodominantní marker
- malá mutační rychlost (výhoda oproti např. mikrosatelitům)
 - 10^{-7} /lokus*rok

nevýhody

- potřeba čerstvého materiálu
- omezená variabilita – málo alel v lokusu – často jen 2-4
- variabilita v kodující části genomu
- detekovaná variabilita
 - 10% variability na úrovni DNA (Nei 1987)
 - pouze 1/3 nukleotidových substitucí se odráží ve změnách aminokyselin
 - a jen cca 25% z nich je detekovatelných elektroforézou

Vyhodnocování kodominantních markerů

- počet alel v lokusu – A
- alelická bohatost (*allelic richness*)
 - standardizace na počet vzorků
- procento polymorfních lokusů – P
- heterozygosita
 - pozorovaná (*observed*) – H_o (proporce heterozygotů)
 - očekávaná (*expected*) – H_e
 - pokud předpokládáme H-W ekvilibrium
= genové diversitě (*gene diversity*) – D

$$D = 1 - \frac{1}{m} \sum_{l=1}^m \sum_{i=1}^k p_i^2$$

- m – počet lokusů
- k – počet alel v lokusu
- p_i – frekvence i -té alely z k

- pravděpodobnost, že jedinec bude heterozygot

Mezipopulační variabilita

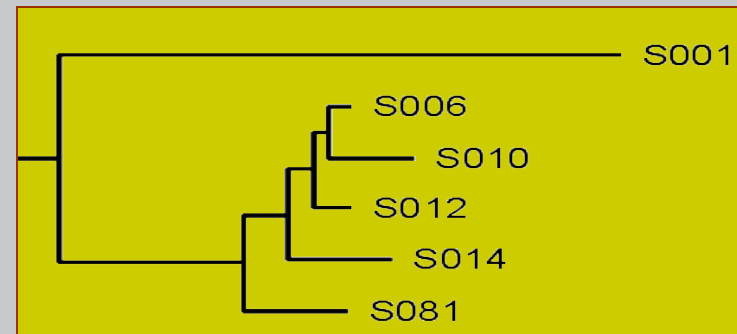
- koeficienty genetické vzdálenosti (*genetic distance*) nebo podobnosti (*genetic identity*)
 - Nei's koeficient

$$I = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 y_i^2}}$$

x_i, y_i frekvence alel v i -tém lokusu v populacích X a Y
 $\sum x_i y_i$ pravděpodobnost, že alely v populaci X a Y budou identické
 $\sum x_i^2$ pravděpodobnost, že dvě alely tažené z populace X budou identické

- *Rogers' genetic distance* – D_R – typicky pro isozymy
- na základě matice koeficientů možno sestavit dendrogram

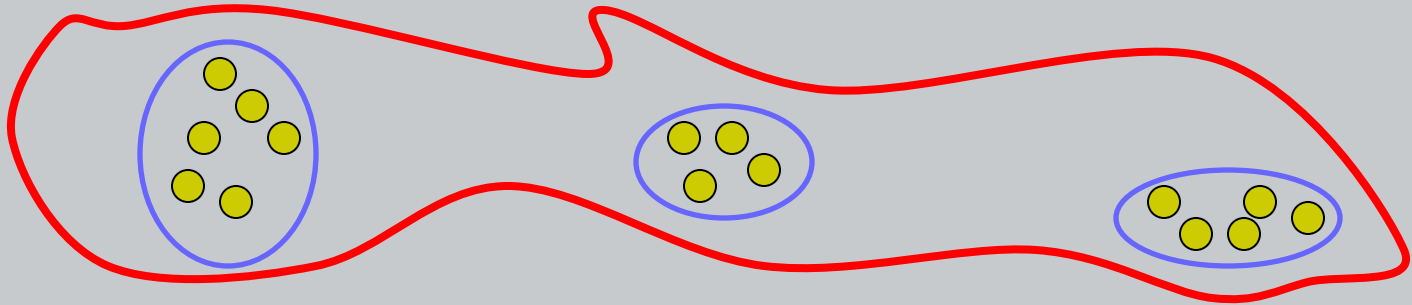
	S001	S006	S012	S008
S001	1.000	0.811	0.811	0.778
S006	0.811	1.000	0.977	0.876
S012	0.811	0.977	1.000	0.898
S008	0.778	0.876	0.898	1.000



- UPGMA
- *neighbour-joining* (NJ) – minimalizuje délku celého stromu

Fixační indexy - *F-statistika* (Wright 1951)

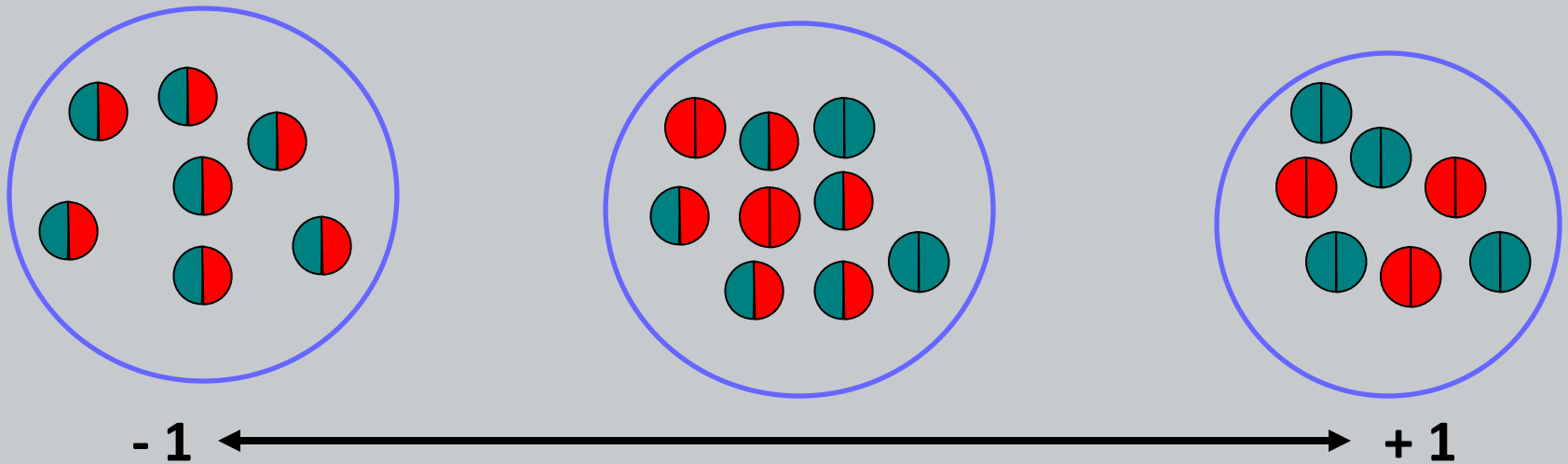
- rozdělení genetické variability na úrovně
 - **I**-individual, **S**-subpopulation, **T**-total



- F_{IS} - stupeň inbreedingu (*inbreeding coefficient*)
- F_{ST} - stupeň populační diferenciace na subpopulace
- F_{IT} - odchylka od H-W ekvilibria (od náhodného párování)
- platí $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$
- odhady parametrů (Weir & Cockerham 1984)
 - obsahuje korekci pro počet jedinců a studovaných populací
 - $F (\sim F_{IT}), \theta (\sim F_{ST}), f (\sim F_{IS})$

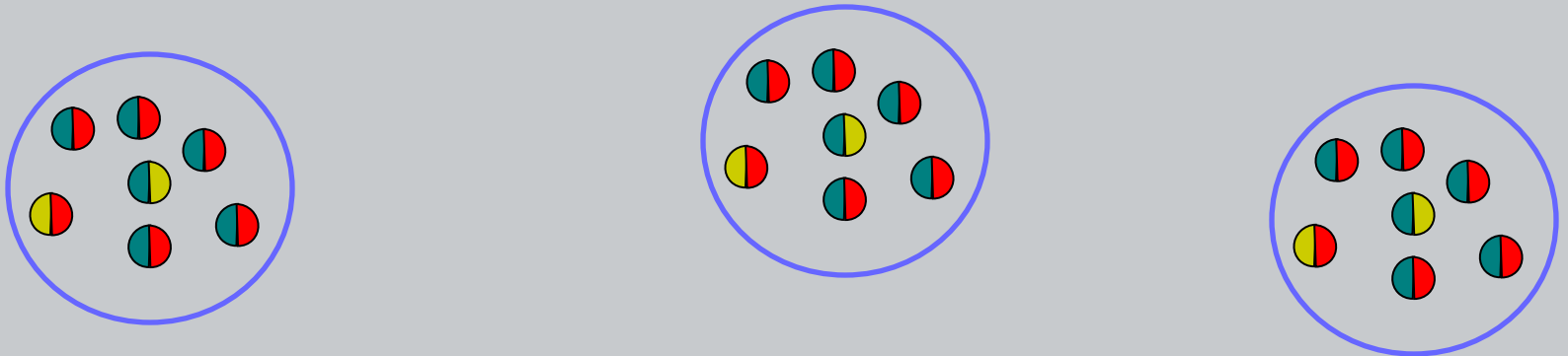
F_{IS} - stupeň inbreedingu (*inbreeding coefficient*)

- **-1** – kompletně outbrední populace, tj. žádní homozygoti
- **0** – žádný inbreeding
- **+1** – kompletně inbrední populace, tj. žádní heterozygoti

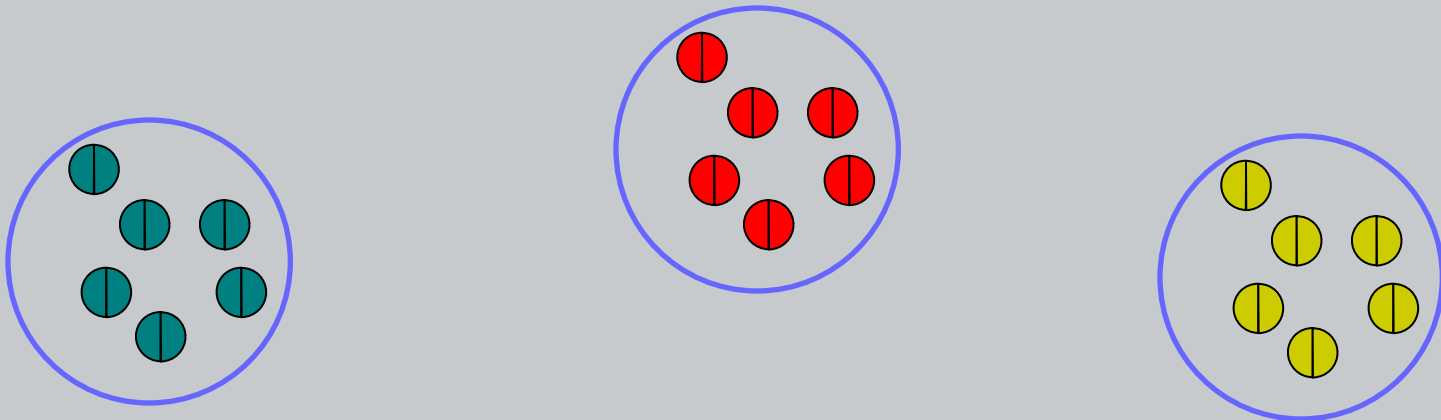


F_{ST} - stupeň diferenciace na subpopulace

- **0** – žádná genetická struktura populací (všechny populace mají stejné frekvence alel)



- **1** – maximální genetická struktura (každá populace fixovaná pro jinou alelu)



F_{ST} - stupeň diferenciace na subpopulace

- **0** – žádná genetická struktura populací (všechny populace mají stejné frekvence alel)

interpretace velikosti F_{ST}	
<i>hodnota F_{ST}</i>	<i>diferenciace</i>
0 – 0.05	malá
0.05 – 0.15	střední
0.15 – 0.25	vysoká
> 0.25	velmi vysoká

Příklad výpočtu F-statistik

	Genotyp			N	p	H _o	H _e	F
	AA	Aa	aa					
populace 1	125	250	125	500	0.5	0.5	0.5	0
populace 2	50	30	20	100	0.65	0.3	0.46	0.341
populace 3	100	500	400	1000	0.35	0.5	0.46	-0.099

- frekvence alel
 - $p(A) = (2 \cdot AA + Aa) / (2 \cdot N)$
 - $p_1(A) = (2 \cdot 125 + 250) / 1000 = 0.5$
 - $q(a) = 1 - p$
- **H_o** - pozorovaná heterozygosita (*observed heterozygosity*)
 - proporce heterozygotů, tj. $H_o = Aa / N$
 - $H_{o1} = 250 / 500 = 0.5$
- **H_e** - očekávaná heterozygosita (*expected heterozygosity*)
 - $2pq$
 - $H_{e1} = 2 \cdot 0.5 \cdot 0.5 = 0.5$
- **F** - koeficient inbreedingu v rámci populace
 - $F = (H_e - H_o) / H_e$

Příklad výpočtu F-statistik II.

	Genotyp			N	p	Ho	He	F
	AA	Aa	aa					
populace 1	125	250	125	500	0.5	0.5	0.5	0
populace 2	50	30	20	100	0.65	0.3	0.46	0.341
populace 3	100	500	400	1000	0.35	0.5	0.46	-0.099

- frekvence alel přes všechny populace

- $\bar{p} = (p_1 * N_1 * 2 + p_2 * N_2 * 2 + p_3 * N_3 * 2) / (N_1 + N_2 + N_3) = 0.4156$

- indexy heterozygosity

- H_i - pozorované heterozygosity v populacích

- $H_i = (H_{o1} * N_1 + H_{o2} * N_2 + H_{o3} * N_3) / N_{total} = 0.4875$

- H_T - očekávané heterozygosity v populacích

- $H_T = (H_{e1} * N_1 + H_{e2} * N_2 + H_{e3} * N_3) / N_{total} = 0.4691$

- H_S - očekávané heterozygosity přes všechny populace

- $H_S = 2 * \bar{p} * \bar{q} = 0.4858$

Příklad výpočtu F-statistik III.

	Genotyp			N	p	Ho	He	F
	AA	Aa	aa					
populace 1	125	250	125	500	0.5	0.5	0.5	0
populace 2	50	30	20	100	0.65	0.3	0.46	0.341
populace 3	100	500	400	1000	0.35	0.5	0.46	-0.099

fixační indexy

míra

- $F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S = -0.0393$

inbreedingu v populacích

- $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T = 0.0344$

diferenciace na populace

- $F_{IT} = (H_T - H_I) / H_T = -0.0036$

inbreedingu

Software pro analýzu isozygů

FSTAT



Fstat

Version 2.9.3.2 (Feb. 2002)

Jérôme Goudet (jerome.goudet@ie-zea.unil.ch)

Institute of Ecology

Biology Building, UNIL,

CH-1015, LAUSANNE

SWITZERLAND

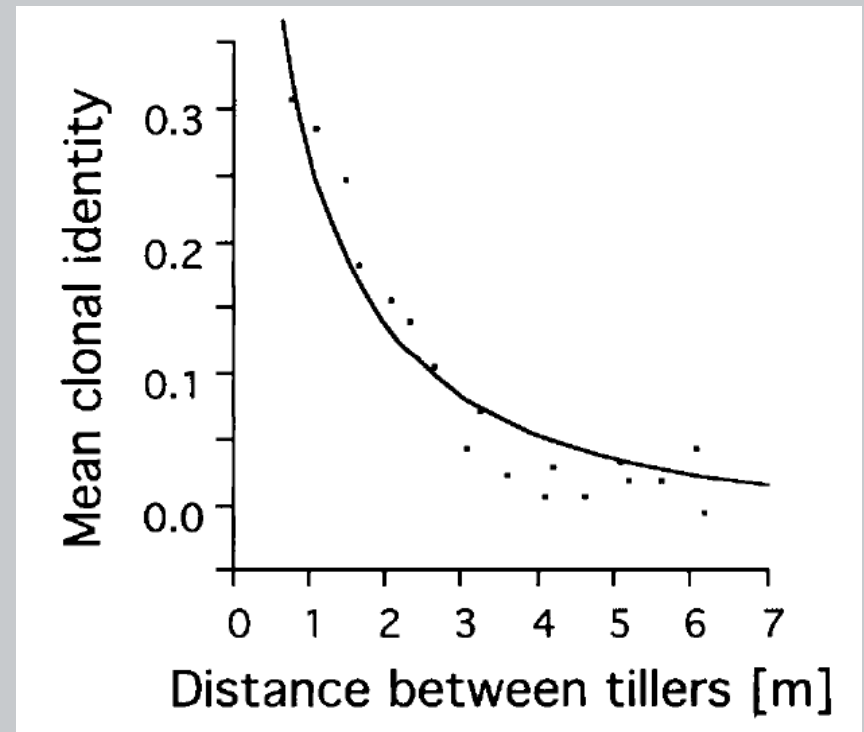
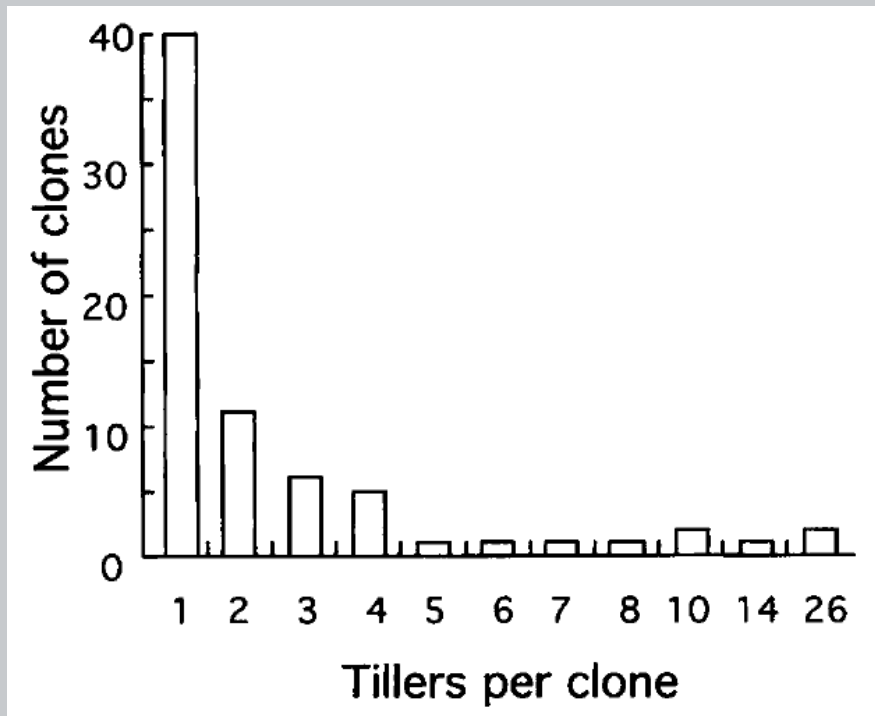
<http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html>

- frekvence alel, heterozygositita
- F-statistika (Nei, Weir & Cockerham)
- testy H-W rovnováhy

Příklady použití isozymů

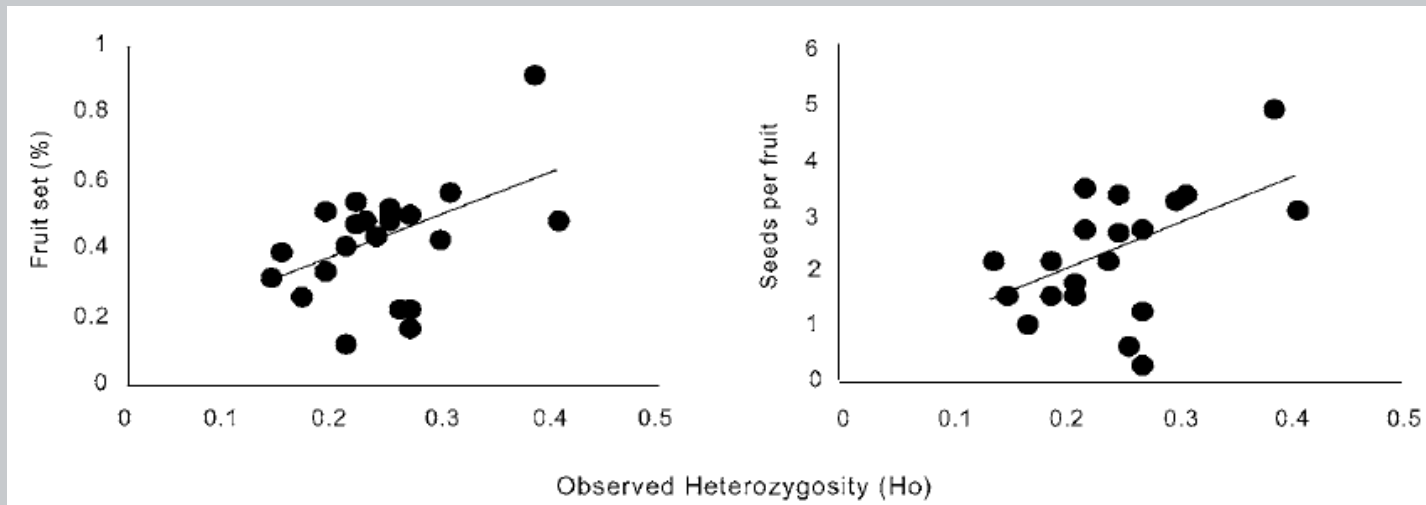
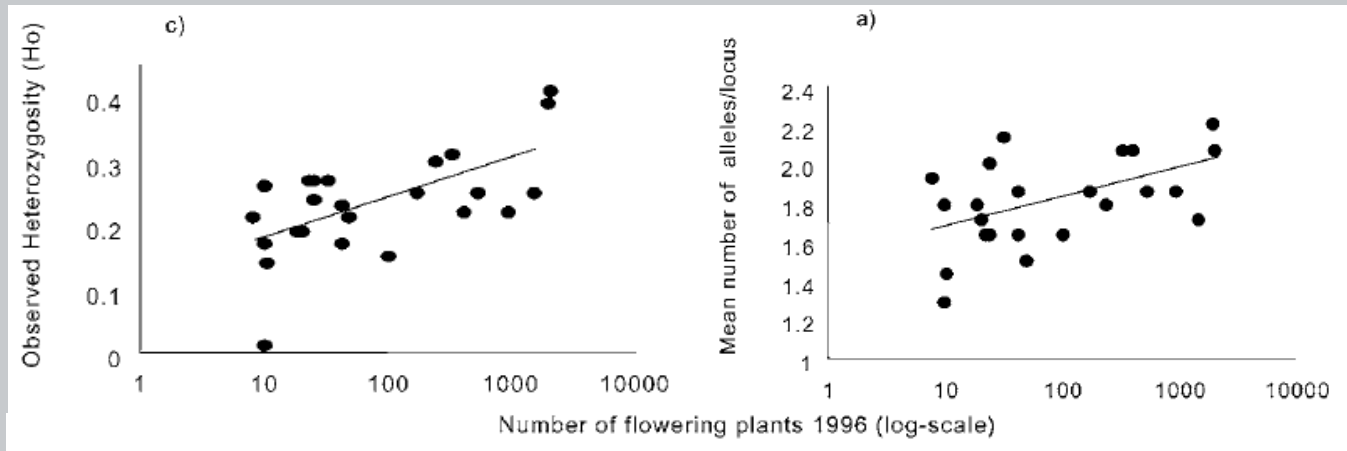
- identifikace klonů
 - srovnání pattern na zymogramu
 - omezená variabilita – lépe použít DNA markery
- populační úroveň – populační genetika ...
- geografická variabilita
- identifikace hybridizace, introgrese
- fylogenetické vztahy
 - vhodná metoda maximálně na druhové úrovni
- rychlost evoluce – molekulární hodiny

Klonální diverzita



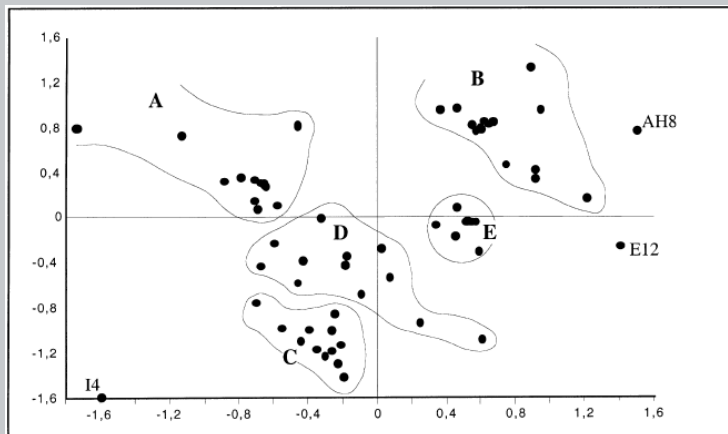
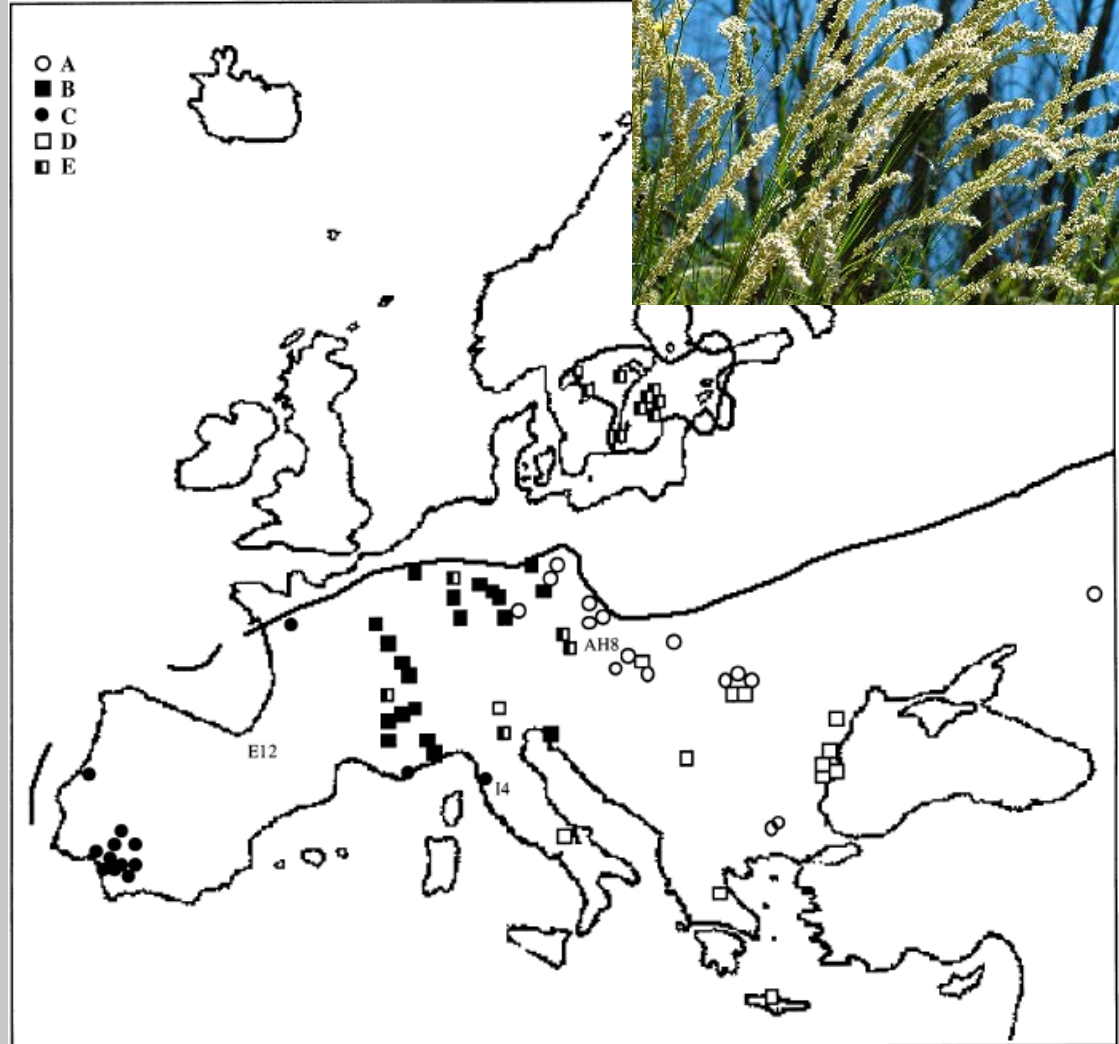
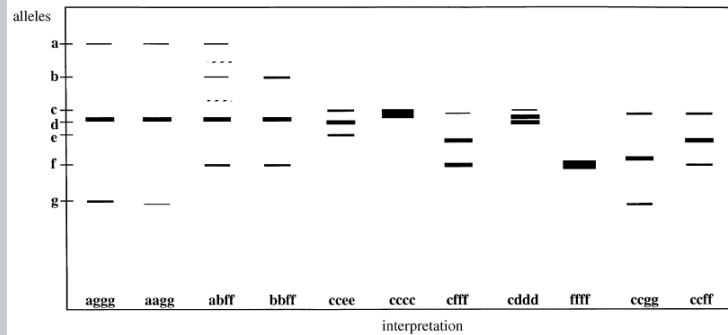
Brachypodium pinnatum, Schläpfer & Fischer 1998

Velikost populace, H , fitness



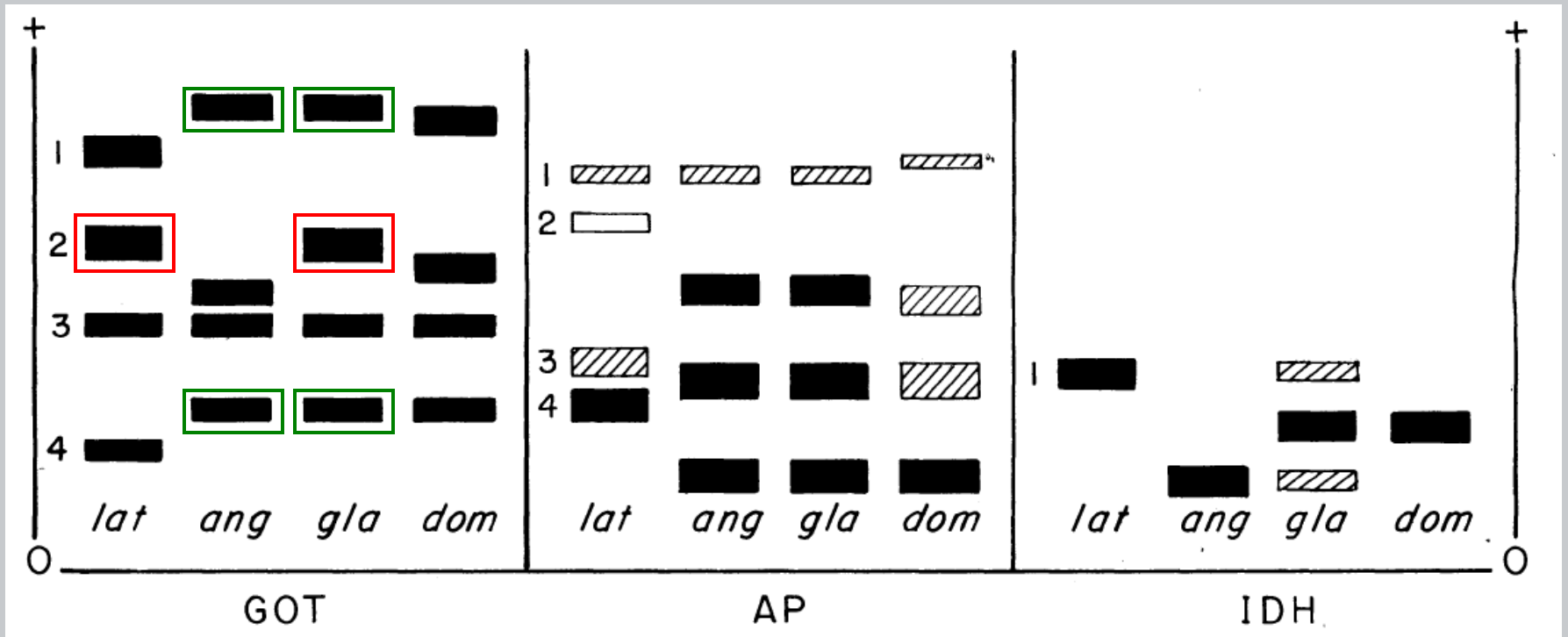
Cochlearia bavarica, Paschke et al. 2002

Geografická variabilita

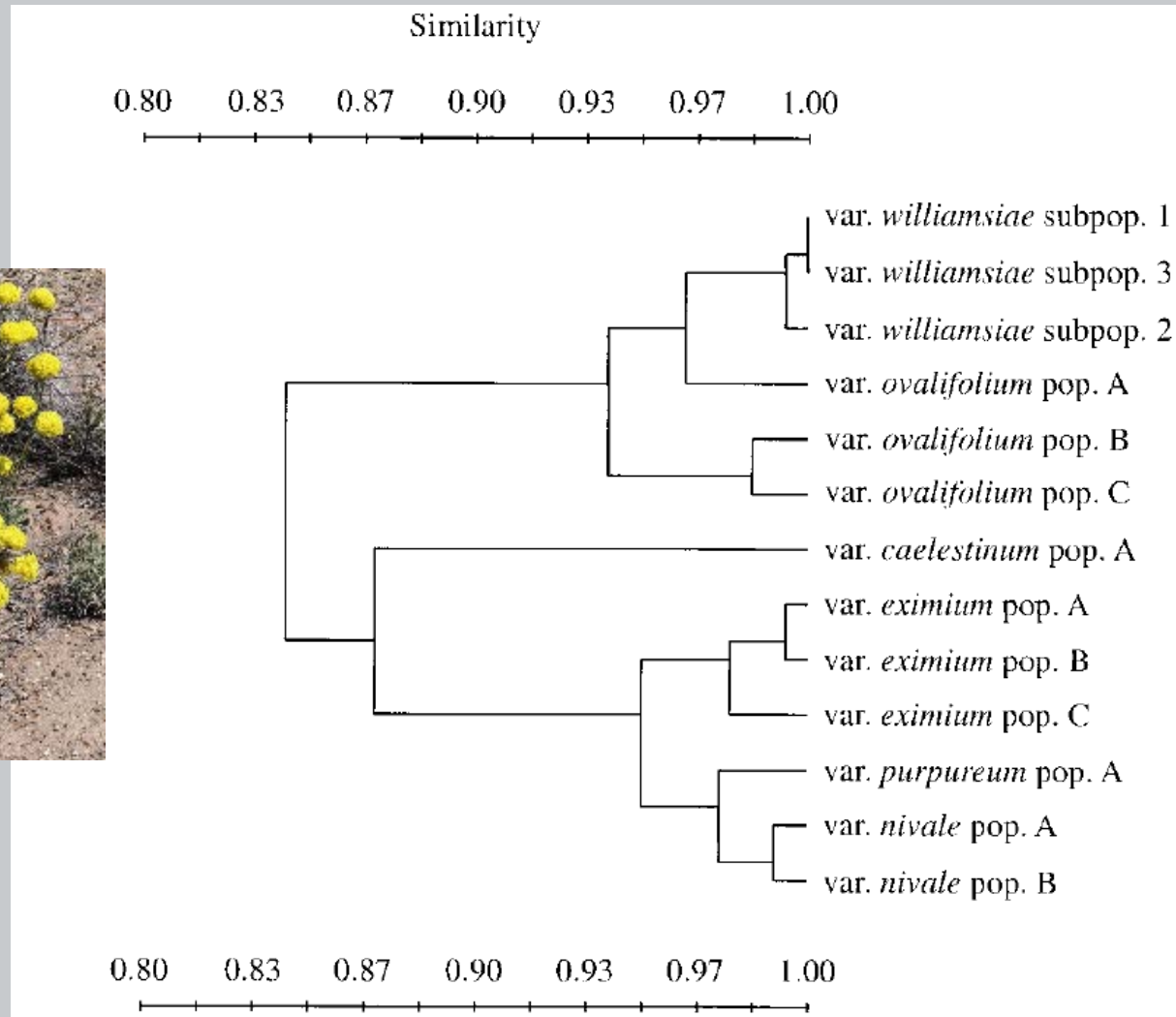


Melica ciliata, Tyler 2004

Hybridizace



Vztahy v rámci druhu



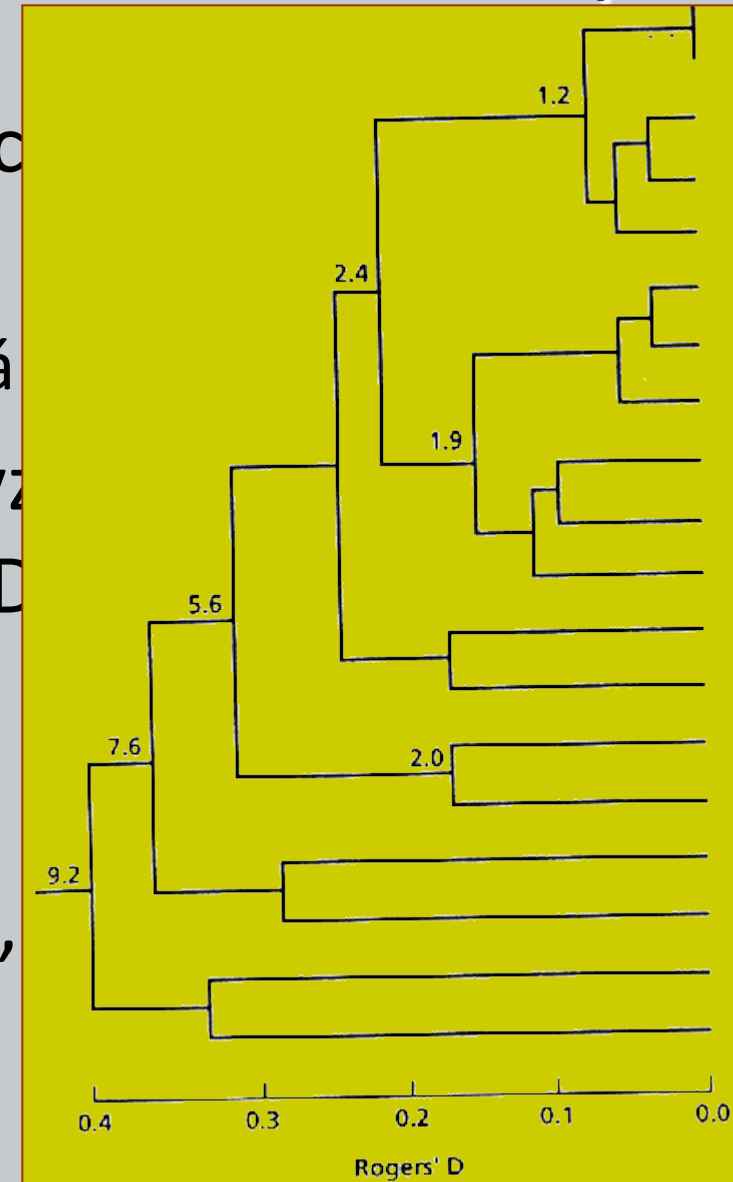
Eriogonum ovalifolium, Archibald et al. 2001

Rychlost evoluce – molekulární hodiny

- předpokládá konstantní rychlost mutací
 - 10^{-7} /lokus*rok
 - může být i velmi proměnlivá
- vztah mezi genetickou vzdáleností (D) a časem od divergence (t) – $D=2\alpha t$
 - α - rychlost substitucí
 - **$t = 5 \cdot 10^6 D$**
- použití pro hrubý odhad, pouze u blízce příbuzných druhů

Rychlost evoluce – molekulární hodiny

- předpokládá konstantní rychlost
– 10^{-7} /lokus*rok
– může být i velmi proměnlivá
- vztah mezi genetickou vzdáleností a časem od divergence (t) – D
– α - rychlost substitucí
– $t = 5 * 10^6 D$
- použití pro hrubý odhad, příbuzných druhů



Vztah mezi vlastnostmi rostlin a allozymovou diversitou

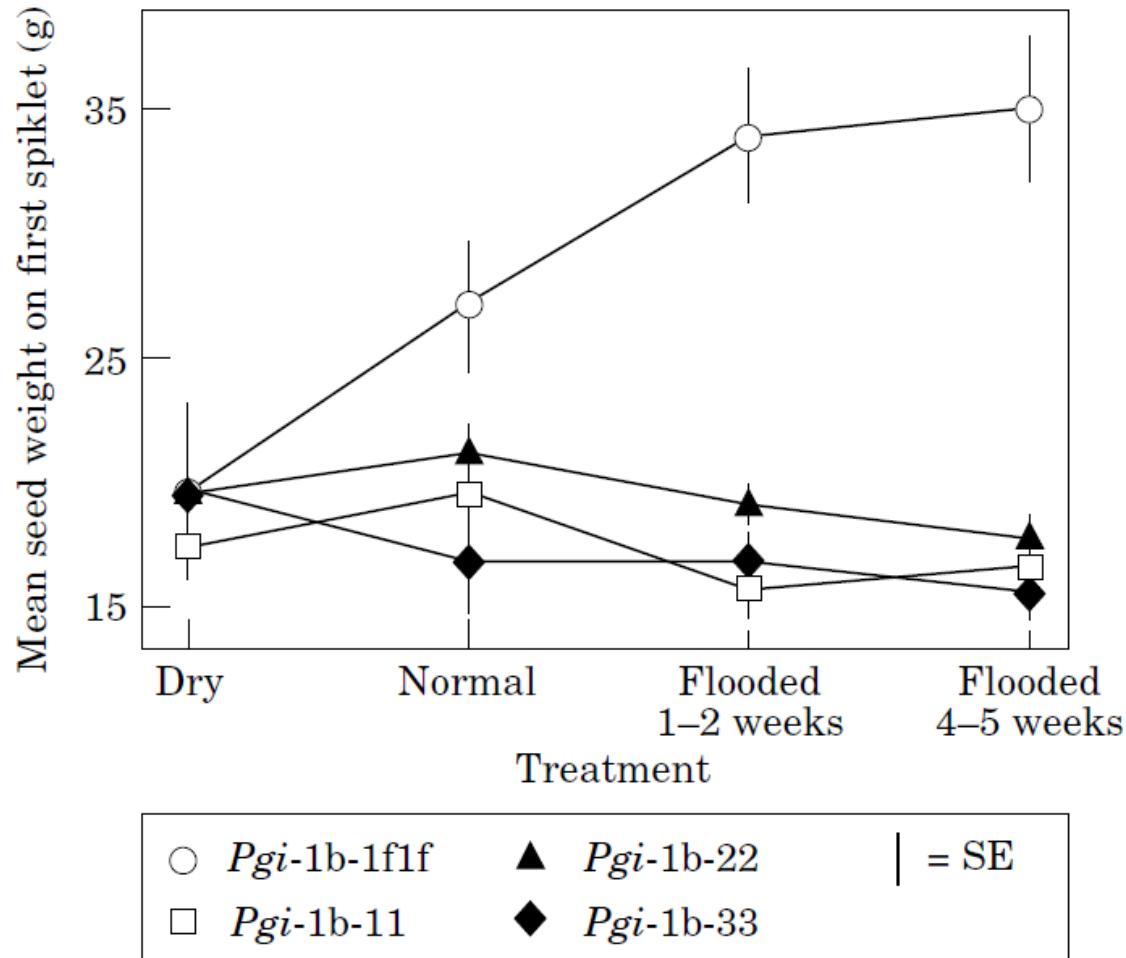
		proporce genetické diverzity			
		v rámci populace		mezi populacemi	
<i>charakteristika</i>		<i>nízká</i>	<i>vysoká</i>	<i>nízká</i>	<i>vysoká</i>
životní forma	dlouho žijící, dřeviny		•	•	
	krátce žijící, jednoletky	•			•
areál	široký		•	n.s.	
	endemit	•			
reprodukční systém	allogamie, anemogamie		•	•	
	autogamie	•			•
šíření semen	zoochorie, anemochorie		•	•	
	vlastní vahou, explozivně	•			•

(Hamrick & Godt 1989: review pro 449 druhů ze 165 rodů)

Selektivní neutralita izozymů

- selektivní neutralita
 - *neutrální alely* – udržovány v populaci rovnováhou mezi mutacemi (vznik) a genetickým driftem (zánik)
 - tj. isoenzymy jsou funkčně shodné – žádná alela nemá selekční výhodu
- pro široké spektrum druhů platí
- ALE: nalezeny lokusy asociované s fitness
 - frekvence výskytu konkrétní alely podél ekologického gradientu, např. nadmořská výška

Selektivní neutralita izozymů ?



Bromus hordeaceus, Lönn et al. 1998

Populační studie

Tomimatsu H. & Ohara M. (2003): Genetic diversity and local population structure of fragmented populations of *Trillium camschatcense* (Trilliaceae). *Biological Conservation* 109: 249–258.



Systematická studie

Ehrendorfer F., Samuel R. & Pinsker W. (1996): Enzyme analysis of genetic variation and relationships in diploid and polyploid taxa of *Galium* (*Rubiaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 202:121-135



Literatura

Soltis & Soltis [eds.] (1989): *Isozymes in plant biology*.

Baker A.J. (2000): *Molecular methods in ecology*. pp. 65-88

Murphy R.W. et al. (1996): *Proteins: Isozyme electrophoresis*. In: Hillis D.M. et al. [eds.]: *Molecular systematics*.

Karp A. et al. (1998): *Molecular tools for screening biodiversity*. pp. 73-81

Avise J.C. (2004): *Molecular markers, natural history and evolution*. pp. 57-63.

Hamrick, Godt, Murawski & Loveless (1991): *Correlations between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation biology*. pp. 75-86. In Falk & Holsinger [eds.] *Genetics and Conservation of Rare Plants*

Hartl & Clark (2007): *Principles of Population Genetics*. 4th edition.

Hamilton M.B. (2009): *Population genetics*.

Allendorf & Luikart (2006): *Conservation and the genetics of populations*. pp. 47-62.

Internetové odkazy

databáze enzymů: <http://www.brenda-enzymes.info/>

metodiky, vyhodnocování gelů:

<http://www.plant.siu.edu/PLB479/IsozymeTechniques/GelExercise.html>