

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 04 Biologie

Vliv jednobodových substitucí v Toll-like receptoru 4
na fenotyp sýkory koňadry (*Parus major*)

Impact of single nucleotide polymorphism in Toll-like receptor 4
on phenotype in Great tit (*Parus major*)

Autor: Kamila Vinklarová

Škola: Vyšší odborná škola a Střední škola
veterinární, zemědělská a zdravotnická Třebíč,
Žižkova 505, 674 23 Třebíč, kraj Vysočina

Konzultanti: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.
Mgr. Anna Bryjová

Třebíč 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně za pomoci svých konzultantů.
Použila jsem pouze podklady citované v práci a uvedené v příloženém seznamu.

V..... dne.....

podpis.....

ANOTACE

Výzkum rozdílů v imunitních reakcích mezi jedinci má zásadní význam pro pochopení souvislostí v evoluci interakce hostitel-parazit. Imunitní systém lze rozdělit na složku vrozenou (nespecifická imunita) a získanou (specifická imunita), přičemž spolu obě úzce souvisí a navzájem se ovlivňují. Mezi složky vrozené imunity se řadí také Toll-like receptory (TLRs), které jsou zodpovědné za rozpoznání struktur potencionálně patogenních částic (PAMPs) a společně s některými dalšími složkami vrozené imunity zahajují imunitní reakci. Vrozená imunita a její individuální variabilita prozatím není u volně žijících obratlovců příliš prozkoumaná. To platí také pro TLRs. V současnosti nejsou k dispozici prakticky žádné údaje ani o souvislosti vnitrodruhové variability TLRs a fitness a to ani u savců ani u ptáků. Tato práce je zaměřena na stanovení výskytu vybrané nesynonymní jednobodové záměny (SNP) A1646G (aminokyselinová substituce Q549R) v Toll-like receptoru 4 (TLR4) v zimující populaci sýkory koňadry (*Parus major*). K tomuto účelu byly použity dvě metody: metoda KAPA-HRMT a metoda AmpliTaqGOLD. Kromě popisu frekvence daného SNP byl zkoumán vliv tohoto polymorfismu v TLR4 na kondičně závislé znaky u tohoto druhu. V práci jsem prokázala vztah mezi substitucí Q549R a melaninovým ornamentem u samců sýkor. Tyto výsledky ukazují, že variabilita v genech vrozené imunity může ovlivňovat vnější fenotypové znaky u ptáků.

Klíčová slova

Toll-like receptor 4, vrozená imunita, sýkora koňadra, polymorfismus, fenotyp

ANNOTATION

Research focused on individual variation in immune function has a paramount importance for our understanding the evolution of host-parasite interactions. Immune system may be divided into innate (non-specific) and acquired (specific) arms. Both of these arms are interconnected by many relationships and regulations. Among the innate immunity molecules belong also the Toll-like receptors (TLRs) that are responsible for detection of potentially pathogenic structures (PAMPs). Together with some other elements of innate immunity TLRs initiate immune response. Innate immunity and its variability are only insufficiently investigated in free-living animals. This is also true for TLRs. Currently we miss any information on the relationship between intraspecific variability in TLRs and individual fitness both in birds and mammals. In this study I map the occurrence of a selected single nucleotide polymorphism (SNP) A1646G (amino acid substitution Q549R) in Toll-like receptor 4 (TLR4) in a wintering population of great tit (*Parus major*). To this purpose two methods were used: method KAPA-HRMT and method AmpliTaqGold. Moreover, the impact of this polymorphism in TLR4 on condition-dependent traits in this species was also investigated. I have shown the relationship between Q549R substitution and melanin-based ornamentation in great tit males. My results suggest that variability in innate immunity genes may influence external phenotypic traits in birds.

Key words

Toll-like receptor, innate immunity, great tit, polymorphism, phenotype

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Dr. Michalovi Vinklerovi za pomoc při objasňování základních pojmů molekulární biologie a za trpělivou pomoc a rady při psaní této práce.

Dále děkuji Mgr. Anně Bryjové za obětavou pomoc v metodické části práce.

Za pomoc děkuji také MVDr. Ivaně Filipové a Mgr. Soně Mašové.

A samozřejmě děkuji za velkorysé možnosti využití pracoviště Ústavu biologie obratlovců ČR v.v.i ve Studenci. Poděkování patří také všem, kdo se podílel na zpracování materiálu.

OBSAH

1	Úvod	6
2	Evoluce parazitů	6
2.1	Evoluční interakce parazita s hostitelem.....	6
2.1.1	Parazitismus.....	7
2.1.2	Parazity zprostředkovaná selekce	7
3	Imunologická obrana.....	8
3.1	Vrozená a adaptivní imunita	9
3.2	První vlna detekce parazita v organismu.....	10
4	Toll-like receptory.....	10
4.1	TLRs u ptáků	11
4.2	TLR4	11
5	Genetický polymorfismus.....	12
5.1	Variabilita ve vrozené imunitě.....	12
5.2	Polymorfismus genů vrozené imunity	13
5.3	Udržování polymorfismu v evoluci genů (balancing selection).....	13
6	MATERIÁL A METODIKA	14
6.1	Materiál	14
6.2	Metodika genetických analýz	15
7	Výsledky a diskuse.....	19
8	Seznam použitých zkratk	24
9	Literatura	25

1 Úvod

Tato práce je zaměřena na geny vrozené imunity- Toll-like receptory, které hrají důležitou roli v imunitních reakcích. Začátek práce je věnovaný parazitům, další část zahrnuje imunitní reakce a je v ní rozdělena imunita na vrozenou a získanou imunitu. V této části jsou popsány složky vrozené imunity, kam se řadí právě Toll-like receptory. Výsledkem práce bude zjištění, zda má tento imunitní gen vliv na fenotyp u ptáků.

2 Evoluce parazitů

Parazitismus představuje jednu z nejrozšířenějších ekologických strategií organismů. Podle ekologické definice je parazitem organismus, který v některé fázi životního cyklu využívá jiné organismy (hostitele) jako zdroj potravy i jako dočasné nebo trvalé životní prostředí, čímž přímo nebo nepřímo snižuje hostitelovu fitness (biologickou zdatnost). Mezi parazity tedy patří mimo parazitických živočichů také nejrozličnější druhy hub, prvoků, bakterií, všechny viry a některé druhy rostlin. Hostitel a parazit mají ve svém vzájemném vztahu zcela protichůdné zájmy. Parazit potřebuje hostitele jako své životní prostředí využít, zatímco zájmem hostitele je parazita prostřednictvím svého imunitního systému odstranit. Přesto má parazit alespoň do určité míry zájmy s hostitelem shodné- hostitel napadený parazitem musí po určitou dobu přežít a případně se i rozmnožovat (např. transovariální přenos parazita z rodiče na potomky). Toto spolu s nutností vyvinout mechanismy, které budou schopné překonat imunitní obranu hostitele, vyžaduje maximální evoluční přizpůsobení parazita hostiteli. Koevoluční charakter evoluce parazitů přináší řadu jevů, které v evoluci u jiných ekologických vztahů mezi organismy nejsou obvyklé (Flegr 2005).

2.1 Evoluční interakce parazita s hostitelem

V koevoluci hostitele a parazita mají paraziti vůči hostiteli řadu výhod. Parazit je v roli útočníka, výhodnější je i jeho životní strategie a biodemografické parametry. Velké množství vegetativních funkcí přenechávají na hostiteli, a proto mohou věnovat více energie na produkci potomstva. Skutečnost, že většina druhů vyprodukuje za den velké množství potomků, může mít zásadní vliv na evoluční zápas parazita s hostitelem. U parazitů může být přirozený výběr velice efektivní a evoluce adaptivních znaků může probíhat velmi rychle v důsledku toho, že množství vyprodukovaných potomků je vysoké, ale počet jedinců, kteří se dožijí reprodukčního věku je nízký (Flegr 2005).

Abiotické faktory prostředí

Během evoluce se jednotlivé druhy přizpůsobují změnám podmínek životního prostředí. Pozvolným změnám prostředí se jednotlivé druhy vcelku dokáží postupně přizpůsobit. Naopak drastické a rychlé změny prostředí vedou k vymírání mnohdy velkého počtu druhů.

Biotické faktory

Tyto faktory vyplývají ze vzájemných interakcí mezi jednotlivými druhy a mění se takovým tempem, aby se jednotlivé druhy dokázaly těmto změnám přizpůsobit. Jednotlivé

druhy jsou spolu úzce propojeny, a proto může vyhynutí některého druhu nebo například vznik rezistence proti některému parazitu vést k řetězovým změnám v celé ekosystému a vytvářet přímý nebo zprostředkovaný selekční tlak na evoluční změny velkého množství organismů.

Výhodou hostitele je schopnost přizpůsobit se pozvolným evolučním změnám životních podmínek a vytvořit si vůči parazitům imunitní reakci. Hostitel může v evoluci své imunitní mechanismy adaptovat vlastnostem určitých parazitů – těch běžných a nebezpečných (Flegr 2005).

2.1.1 Parazitismus

Parazitismus je forma vztahu mezi dvěma druhy živočichů, přičemž jeden (parazit) různými způsoby využívá druhého (hostitel).

Patogen

Patogeny jsou organismy schopné využívat hostitele a svým metabolismem (produkty metabolismu) a reakcemi hostitelského organismu, které hostitele poškozují a vyvolávají příznaky onemocnění (Bednář, Fraňková, Schindler, Souček, Vávra 1996).

Podobně jako u parazitů, mezi patogeny řadíme z definice mnoho velice evolučně rozdílných organismů - například bakterie, viry, houby, ale také neorganismální priony (Wikipedia 2012a).

Patogenita

Mikroorganismy se podle schopnosti infikovat hostitelský organismus dělí na *komensální (saprofytické)*, které se adaptují v hostitelském organismu a mohou se podílet na různých, hostitelskému organismu prospěšných funkcích. *Potencionální patogeny (oportunní patogeny)* mohou být původci onemocnění u imunitně oslabených jedinců (tzn. u jedinců s defektním imunitním systémem). Třetí skupinu tvoří *patogenní mikroorganismy*. Tyto se uplatňují jako původci infekčních onemocnění (Hořejší, Bartůňková 2001). Definice: „Patogenita je schopnost mikrobiálního druhu vyvolat onemocnění konkrétního druhu hostitele.“ (Bednář, Fraňková, Schindler, Souček, Vávra 1996). Patogenita je u jednotlivých mikroorganismů rozdílná. Některé mikrobiální druhy jsou patogenní pouze pro omezený počet hostitelů, ale jiné jsou patogenní pro široké spektrum hostitelů. Patogenita kmene patogenního druhu je kvantitativně vyjadřovaná *virulencí* (v evoluční biologii se virulence označuje jako vliv parazita na fitness hostitele)- kmény vysoce virulentní- v důsledku úhynu většiny citlivých organismů se nedokáží dále šířit; kmény virulentní- v populaci přežívají, jsou schopni se dále množit a infikovat hostitele; a kmény avirulentní (Bednář, Fraňková, Schindler, Souček, Vávra 1996).

2.1.2 Parazity zprostředkovaná selekce

Napadení parazitem je pro hostitelský organismus vždy určitou zátěží. V důsledku této zátěže vzniká rozdíl mezi jedinci více parazitovanými a méně parazitovanými popř. těmi zdravými (ačkoliv zcela zdraví jedinci, tj. jedinci bez jakýchkoliv parazitů se v přírodě nevyskytují). V důsledku působení parazitů bude tedy fitness rezistentních (odolných) jedinců vyšší než fitness jedinců susceptibilních (náchylných). Přírodní výběr tedy bude selektovat rezistentní genotypy na úkor genotypů susceptibilních. Je logické, že vliv na rezistenci mají nejen faktory genetické, ale i ekologické. Slabší jedinec bude na parazitózu reagovat hůř, než jiný- silnější jedinec. invaze parazita bude pro již oslabený organismus znamenat nadměrnou

zátěž, což se projeví i na fitness jedince. Těmto ekologickým faktorům se však ve své práci věnovat nebudu.

Bylo navrženo, že evoluční interakce může probíhat podle dvou modelů (Agrawal & Lively 2002). Jedním je model Gene-for-gene, který předpokládá, že rezistence je pro jedince energeticky nákladná a tedy za určitých ekologických podmínek a nízkém selekčním tlaku ze strany parazita nemusí být výhodná. To může mít za důsledek variabilitu v genotypech na straně hostitele. Druhým modelem je model Matching alleles, který předpokládá, že určitý genotyp zajišťuje svému hostiteli rezistenci jen vůči určitému genotypu parazita. Genotyp hostitele a parazita. Genotyp hostitele a parazita do sebe tedy podle této hypotézy zapadají jako klíč a zámek. Protože genotypy parazitů jsou různé, musí existovat také variabilita v genotypech hostitele. Agrawal & Lively (2002) poukázali na to, že mezi těmito dvěma modely patrně není ostrá hranice a že vlastně představují odlehle případy kontinua možných vztahů mezi genotypy parazitů a jejich hostitelů, kdy vždy část variability je dána náklady na imunitu a část je podmíněna jedinečnou interakcí mezi molekulami hostitele a parazita.

3 Imunologická obrana

Imunita a imunitní obrana je jednou z nejzákladnějších schopností všech živých organismů. Úroveň imunity závisí na vývojovém stupni organismů. Imunitní systém chrání jedince od škodlivin zevního i vnitřního původu. Imunita není pouze **obranyschopnost**-obrana organismu vůči vnějším škodlivinám a ochrana proti patogenům, imunitní systém musí rozpoznat buňky těla vlastní a být vůči nim tolerantní- **autotolerance**. Rozpoznávání těla vlastních a cizích buněk se děje několika mechanismy- jednak na základě absence těla vlastních molekul u cizích buněk, jednak na základě přítomnosti evolučně známých cizích molekul na buňkách parazitů, dále pak za pomoci antigen-specifické imunity, která detekuje jakékoliv cizorodé struktury a konečně na základě molekul signalizujících poškození tkáně, které parazitární infekci obvykle provází. V neposlední řadě imunitní systém odstraňuje buňky staré, poškozené a změněné buňky, těla vlastní (tzv. vnitřní škodliviny). K vyvolání imunitní reakce je potřebný antigen tj. látka, kterou organismus rozpozná a reaguje na ni. Antigeny mohou být struktury z vnějšího prostředí (exoantigeny), nebo z organismu samotného (autoantigeny). Antigen se váže k receptorům imunitního systému a to vede k zahájení imunitní reakce, které jsou někteří paraziti schopni čelit a zamezit funkci určité části imunitního systému hostitele. Jako následek patogenních příznaků může dojít k výraznému snížení životaschopnosti hostitele. Tento účinek je zvláště důležitý při tzv. predaci (k napadení definitivního hostitele dochází po pozření mezihostitele). Po parazitární nákaze mezihostitele dojde ke snížení schopnosti obrany před dravci (například útěk) a v důsledku toho bude mezihostitel snáze uloven definitivním hostitelem (nebo dalším mezihostitelem). Napadení definitivního hostitele je tedy rychlejší.

Z obecného hlediska se imunitní systém dělí na vrozenou- nespecifickou imunitu a získanou- specifickou, adaptivní imunitu (Akira et al. 2006; Hořejší, Brůňková 2001; Wikipedia 2012b). Jak ukazují nejnovější výsledky, tyto dva systémy jsou ale úzce propojeny a adaptivní imunita ke svému fungování nezbytně potřebuje signály pocházející od buněk imunity vrozené (Akira et al. 2006).

3.1 Vrozená a adaptivní imunita

Vrozená imunita

Tato imunita (vrozená, nespecifická, neadaptivní) je evolučně starší. Funguje na základě molekul a buněk, které jsou v organismu přítomny již před napadením patogenem, ty reagují na strukturní nebo funkční rysy patogena a obvykle jsou účinné proti širšímu spektru různých patogenů. Vrozená imunita zahrnuje mechanické bariéry- kůže a sliznice, u kterých je nutné, aby nebyly porušeny. Do mechanických bariér řadíme také přirozené neimunitní obranné mechanismy, které se dělí na mechanické (např. pohyb řasinek), chemické (enzymy- lysosin ve slinách, potu, slzách; kyselé pH žaludku, moči; kůže a sliznice dýchacích cest produkují antimikrobiální peptidy a další) a mikrobiální (nepatogenní flóra). Vrozenou imunitu tvoří **buněčné a humorální složky**. Mezi *buněčné složky* řadíme fagocytyující buňky a cytotoxické buňky- NK (= natural killers). Do *humorálních složek* patří komplementový systém- přibližně 30 sérových a membránových proteinů, interferony, lektiny a další sérové proteiny. Receptory nespecifické imunity (PRRs- „pattern recognition receptor“, do této skupiny se řadí i Toll-like receptory) rychle reagují na cizorodé částice (PAMPs- „pathogen associated molecular patterns“ nebo také MAMPs „microbe-associated molecular patterns), a tak fungují jako první linie obrany organismu. Signály pocházející od těchto buněk také slouží jako kostimulační signály pro buňky získané imunity, které jsou nezbytné pro jejich přeměnu z nativních buněk v buňky aktivované a nikoliv utlumené. Vrozená imunita ale postrádá tzv. imunologickou paměť, tzn. účinnost není ovlivněna předešlým setkáním se škodlivinou (Hořejší, Bartůňková 2001).

Adaptivní imunita

Adaptivní imunita je také označovaná jako specifická, evolučně je podstatně mladší než vrozená imunita. Je známá až u obratlovců. Imunitní reakce se účastní později než vrozená imunita, ale má imunologickou paměť, která při dalším setkání s patogenním agens usnadňuje jeho rychlejší zničení. Na cizorodé struktury reagují lymfocyty (buňky adaptivní imunity) prostřednictvím vysoce specifických molekul. Mechanismy adaptivní imunity jsou buď *humorální*, kam patří protilátky, které si organismus vytvoří až po setkání s antigenem (včetně např. vakcíny při očkování); nebo *buněčně zprostředkované*- výhradně T-lymfocyty (Hořejší, Bartůňková 2001). B lymfocyty mají jako antigeně specifické receptory povrchové imunoglobuliny (BCR- B-cell receptor). Komplex BCR je tvořen povrchovým imunoglobulinem (rozeznává antigen, patří k třídám IgM a IgD) a signalizačními molekulami. T lymfocyty mají tzv. T-receptory (TCR). Komplex TCR tvoří modul rozeznávající antigen a CD3 komplex (asociovaný komplex několika proteinů- důležitý pro přenos signálů). TCR i BCR potřebují k zahájení imunitní reakce další signály pocházející od buněk vrozené imunity (Hořejší, Bartůňková 2001). K adaptivní imunitě náleží také MHC („major histocompatibility complex“) glykoproteiny I. třídy (nacházejí se na všech buňkách organismu) a MHC II. třídy (za fyziologických okolností pouze na buňkách antigenu). MHC jsou vysoce variabilní geny kódující transmembránové proteiny (Králová 2010). Funkcí MHC glykoproteinů je vázat peptidové fragmenty proteinů a posléze schopnost je vystavovat je na buněčném povrchu, aby mohly být rozpoznány T lymfocyty. Pokud dojde k rozpoznání antigenu na molekule MHC T buňkou, daný lymfocyt se začne klonálně dělit a následně přispívá k eliminaci daného mikroorganismu.

3.2 První vlna detekce parazita v organismu

(Pattern recognition receptors, PRRS)

Po průniku mikroorganismů nebo toxinů do organismu nejprve dochází k imunitní odpovědi nespecifického imunitního systému. Pokud dojde k zaznamenání specifických chemických struktur, které se vyskytují na povrchu patogenů, ale nikoliv na povrchu tělu vlastních buněk, aktivují se efektorové mechanismy buněk nespecifického imunitního systému (např. fagocyty) i humorální systémy. Fagocyty zaznamenávají struktury na povrch mikroorganismů, které jsou evolučně konzervované a jsou pro život mikroorganismů nezbytné (jsou označovány jako PAMPs). Fagocytózu zajistí reakce mezi povrchovými lektiny (proteiny schopné vázat sacharidy) fagocytů a sacharidy (součást glykoproteinů a polysacharidů mikroorganismů). Fagocytovány mohou být buď mikroorganismy nebo vlastní apoptické buňky. Fagocyt se částice nejprve dotýká malou částí, později ji začne obklopot a nakonec je uzavřena do fagozomu (nově vzniklá vakuola). Fagocyt na mikroorganismus působí baktericidními látkami, hydrolytickými enzymy a nízkým pH (Hořejší, Bartůňková 2001). V další fázi imunitní reakce pak hrají velice důležitou roli Mhc geny. Mhc geny jsou vysoce variabilní geny kódující transmembránové glykoproteiny, se schopností vázat na sebe cizorodé antigeny-cizorodé peptidy (Bernatchez & Landry 2003). Antigeny jsou pak rozpoznány T-lymfocyty, které jsou individuálně odlišné v detailech struktury svých vazebných míst. (Hořejší, Bartůňková 2001).

4 Toll-like receptory

Toll-like receptory (TLRs- angl. „Toll-like receptors“) jsou membránové receptory, které se řadí k PRRs. Toll receptory, podle kterých dostaly Toll-like receptory svůj název, byly nejprve popsány u octomilky (*Drosophila*) v roce 1991. TLRs obratlovců jsou homology Toll receptorů bezobratlých. Nejvíce byly tyto receptory zkoumány u člověka a dalších savců. Různé druhy obratlovců exprimují různé vlastní sady TLRs, které zpravidla zahrnují přibližně 10-12 funkčních TLRs. TLRs mají klíčovou roli ve vrozené imunitě, rozpoznávají strukturálně konzervované molekuly mikrobů a tím vyvolají vrozenou imunitní odpověď. TLRs patří k transmembránovým proteinům I. typu. Předpokládá se, že multigenová rodina TLRs vznikla genovou duplikací v různých časových intervalech. TLRs paralogy (paralog= duplikovaný gen, který má nebo získá jinou funkci, než gen původní) se podle fylogenetické analýzy rozdělily do šesti skupin (Roach et al. 2002). Skupina TLR2 (sem se řadí TLR1, TLR2, TLR6, TLR10, TLR14), další skupiny TLR3, TLR4, TLR5, TLR7/8/9 a skupina TLR11 (k této skupině patří TLR11, TLR12, TLR13, TLR21, TLR22 a TLR23). Některé skupiny se vyznačují specifitou k vazebnému ligandu- např. TLR4 rozpoznává lipopolysacharidy a spolupracuje s CD14, TLR2 je receptor bakteriálních lipoproteinů, TLR9 je receptorem bakteriální DNA.

Toll-like receptory jsou tvořeny extracelulární a intracelulární částí. Extracytosolická vazebná doména obsahuje v závislosti na druhu různý počet opakujících se úseků bohatých na hydrofilní aminokyselinu leucin („leucin-rich repeat“ LRR) a má podkovovitý tvar. LRR doména je velice důležitá, protože díky ní je umožněna vazba receptorů s PAMPs. TLRs se vzájemně liší extracelulární částí, což způsobuje specifitu jednotlivých receptorů k různým PAMPs. Intracelulární část je naopak vysoce konzervovaná. Je složena z tzv. Toll/IL-1 receptorové domény (TIR). TIR domény zajišťují přenos signálu do buňky. Tento signál mění aktivitu některých transkripčních faktorů (např. NF-κB) a zprostředkovává expresi dalších signálních molekul včetně protizánětlivých cytokinů (např. aktivace TLR3, 7, 8, 9 vyvolá

produkcí interferonů I. typu). TLRs jsou exprimovány rozdílnými druhy imunitních (př. makrofágy, dendrické buňky a další) i neimunitních buněk (fibroblasty, epiteliální buňky). Mezi extracelulární a intracelulární částí se nachází transmembránová doména (Hořejší, Bartůňková 2001; Opatová 2011, Bainová 2010).

Signální dráhy TLRs

Signální dráhy TLRs jsou u obratlovců vysoce konzervované, ale nejsou zcela totožné. Tyto drobné odlišnosti způsobují specifitu odpovědi receptorů k jednotlivým ligandům a pravděpodobně i druhovou specifitu TLRs.

TLRs iniciují signalizaci dimerizací. Pokud dojde k aktivaci receptoru, tedy vytvoření homodimeru nebo heterodimeru daného TLR, dostanou se do těsné blízkosti TIR domény obou receptorů a dochází k aktivaci signální dráhy. Tzv. adaptorové proteiny asociované s intracelulární TIR doménou receptoru (př. MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM) aktivují kinázy (fosforylační enzymy) a tímto zajistí vlastní přenos signálu. Dochází k aktivaci některých transkripčních faktorů indukujících expresi některých genů vrozené imunity. Výsledkem je produkce protizánětlivých cytokinů, interferonů atp. Signální dráhy TLRs se dělí na MyD88 dependentní a MyD88 independentní= TRIF dependentní.

Signál vedený MyD88 („myeloid differentiation factor 88“) dependentní dráhou je obdobný jako signál vedený přes IL-1 receptor. Adaptorovým proteinem je IRAK-4 („IL-1R-associated kinase“). U všech TLRs (s výjimkou TLR3) má MyD88 vliv na expresi protizánětlivých cytokinů. Podrobnějším studiem a porovnáním sekvencí DNA různých molekul byla objevena struktura TIRAP („TIR domain-containing adaptor protein“, označovaný jako MAL- „MyD88-adaptor-like“), která je velmi podobná MyD88. TIRAP má význam u TLR2 a TLR4, výsledné produkty reakce jsou taktéž zejména protizánětlivé cytokiny.

MyD88 independentní dráha, označovaná také jako TRIF („TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β “) dependentní dráha se vyskytuje u TLR3 a TLR4. Adaptorové proteiny jsou v tomto případě TRAM („TRIF-related adaptormolecule“) asociovaný s TIR doménou a stěžejní roli má TRIF („TIR domain-containing adaptor including IFN- β “). Dochází k indukci genů řady protizánětlivých cytokinů a interferonů. (Opatová 2011).

4.1 TLRs u ptáků

Savci a ptáci se ve fylogenezii rozdělili přibližně před 300 miliony let, ale i přesto si zachovali velice podobné komponenty TLRs a také jejich signální dráhy jsou podobné. TLRs byly u ptáků nejlépe prozkoumány u kura domácího.

V současné době je známo 10 ptačích TLRs. Jedná se o tyto TLR1LA, TLR1LB, TLR2A, TLR2B, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR21 a TLR15 (Opatová 2011).

4.2 TLR4

TLR4 funguje jako homodimer a je exprimován na buněčném povrchu. K aktivaci receptoru a signálních drah je nutná přítomnost proteinu MD-2, který se také nazývá „lymphocyte antigen 96“ (Opatová 2011). TLR4 spolu s MD-2 tvoří vazebnou kapsu pro vazbu ligandu, kterým je především lipopolysacharid gramnegativních bakterií. Tento receptor ale váže i lipoteichoové kyseliny grampozitivních bakterií, rostlinný diterpen taxol, mannany druhu *Candida albicans*, glykoinositolfosfolipidy prvoků rodu *Trypanosoma* a F protein některých virů, dále váže i ligandy endogenního původu (PAMPs), fibronektin, oligosacharidy hyaluronové kyseliny, heparan sulfát a fibrinogen (Opatová 2011). TLR4 je nejlépe prostudovaný u myši a u člověka, ale byl také studován i u některých druhů ptáků,

především kura domácího (Keestra and van Puten 2008) a zebřičky pestré (Vinkler et al. 2009).

5 Genetický polymorfismus

Genetický polymorfismus je definován jako dlouhodobý výskyt dvou nebo více alel (různé formy jednoho a téhož genu) v populaci v takových frekvencích, které nemohou být vysvětleny opakovaným vznikem mutace (Bainová 2010).

Jedinci jednoho druhu, kteří jsou téhož pohlaví a stáří se vzájemně jeden od druhého liší kvalitativními i kvantitativními znaky. Část tohoto polymorfismu je dědičné povahy, kterou způsobuje přítomnost dvou či více alel do jednotlivých genů. Další část je nedědičného charakteru a vzniká jako reakce jedince na vlivy prostředí, se kterými se během svého života nebo během své ontogeneze setká on nebo jeho bezprostřední předci.

Polymorfismus je obecně nesmírně významný jev z ekologického, etologického i evolučního hlediska a je v přírodě velmi nápadný.

Existují dva základní typy polymorfismu (předpoklad, že nebude brán v úvahu pseudopolymorfismus, tedy přítomnost zcela neutrálních mutací, které se neprojeví na fenotypu organismů). Existují dvě skupiny polymorfních genů, první skupinu tvoří geny vyskytující se v populaci ve velké frekvenci v jedné standardní formě a v malé frekvenci v minoritní formě, méně než 1%. Tyto alely se pradávně vyskytují pouze přechodně nebo jsou udržovány procesy mutačního tlaku a selekce (neustálé mizení mutovaných alel z populace). Druhou skupinu zastupují geny, u nichž lze obtížně určit standardní a mutovanou alelu, vzhledem k jejich vysoké frekvenci. Tento polymorfismus je označován jako polymorfismus druhého typu (Flegr 2006).

Podle rozdílnosti alel rozeznáváme několik druhů polymorfismů. První z nich je bodová substituce (záměna jednoho nukleotidu v sekvenci za jiný, SNP- „*single nucleotide polymorphism*“), dále pak repetice (opakování určité sekvence), delece (ztráta úseku sekvence), translokace (přesunutí části sekvence), inzerce (vlození určitého úseku sekvence), inverze (změna orientace sekvence) a duplikace (zdvojení určité sekvence) (Bainová 2010). Změny v DNA nemusí vyvolat změny v proteinech. U obratlovců dochází ke změnám v nekódujících oblastech (mimo geny) a to dokonce ve velkém množství změn. Předpokládá se, že tyto změny jsou evolučně neutrální. To ale neplatí pro mutace v oblasti promotoru, regulačních oblastech expresech a v intronech.

Větší význam má odlišnost v kódující oblasti genu určující sekvenci aminokyselin v proteinu. Ani takováto změna se ale nemusí vždy projevit. Genetický kód je degenerovaný (aminokyseliny jsou obvykle kódovány více než jedním tripletem), proto nedochází k záměně aminokyseliny při jednobodové změně v tripletu. Přesto i takovéto substituce mohou ovlivňovat buněčné pochody (Bainová 2010).

5.1 Variabilita ve vrozené imunitě

Ve vrozené imunitě je daleko vyšší počet typů receptorových molekul reagujících na antigeny, než je tomu v případě adaptivní imunity, která funguje na základě dvou typů receptorů exprimovaných u T a B lymfocytů. Dále vrozená imunita využívá více signálních drah a počet typů buněk nesoucích PRRs je vyšší, než u adaptivní imunity.

Co se týká variability vrozené imunity, vůči variabilitě adaptivní imunity je to zcela opačně. U adaptivní imunity je počet strukturálních variant T a B lymfocytů vysoký, ale u vrozené imunity mohou být receptorové molekuly rozdílné pouze v několika alelách (u

jednoho jedince maximálně dvě alely). Přes relativně intenzivní výzkum v této oblasti stále ještě nemáme o variabilitě genů vrozené imunity mnoho informací. To platí i pro populační variabilitu většiny PRRs u většiny druhů obratlovců (Bainová 2010).

5.2 Polymorfismus genů vrozené imunity

Polymorfismus genů vrozené imunity je v současnosti zkoumán v souvislosti s infekčními a autoimunitními chorobami. Studium se provádí především u lidí. Menší zájem byl věnován spojitosti variability těchto genů s výskytem onemocnění hospodářských zvířat, kde v případě onemocnění dochází ke značným ekonomickým ztrátám.

Výzkum vlivu polymorfismu genů vrozené imunity na výskyt nebo průběh onemocnění se provádí na základě srovnání genotypů zdravých a nakažených jedinců.

Přesvědčivá je příčinná funkční souvislost mezi alelickou variabilitou a výskytem daného onemocnění. Sekvenční proteinová variabilita alel často modifikuje funkci proteinu a tím i celkovou imunitní odpověď. Jednotlivé alely působí buď pro- nebo protizánětlivě a tím ovlivňují i míru rezistence jedince k určitým nemocem (Bainová 2010).

5.3 Udržování polymorfismu v evoluci genů (balancing selection)

Genetický polymorfismus přímo ovlivňuje fenotypovou variabilitu mezi jedinci. V populaci se často polymorfismus udržuje po mnoho generací, což se může realizovat několika mechanismy, které se souhrnně označují jako tzv. balancující selekce (*balancing selection*). Frekvenčně závislá selekce (*frequency dependent selection*) je jedním z typů balancující selekce. Frekvenčně závislá selekce nastává v případě, že selekční hodnota určité alely negativně koreluje s její frekvencí v populaci. Po přesáhnutí rovnovážného stavu alely se tato alela stává pro jejího nositele nevýhodnou a snižuje jeho fitness, což způsobí pokles frekvence alely v populaci. V interakci hostitel-parazit jde např. o situaci, kdy se v populaci hostitele vyskytují dva genotypy parazita, přičemž hostitel nesoucí určitou alelu jsou rezistentní pouze vůči jednomu genotypu parazita a k druhému jsou vnímaví, u hostitelů nesoucích alternativní alelu je vztah k oběma parazitům opačný. V populaci hostitele se bude vyskytovat jenom ten genotyp parazita, který bude schopný infikovat nejběžnější genotyp hostitele, v populaci hostitele i parazita se ustanoví frekvenčně závislá rovnováha omezující výkyvy početnosti zúčastněných alel (Bainová 2010).

6 MATERIÁL A METODIKA

V praktické části práce jsem se zabývala stanovování výskytu SNP A1646G v TLR4 u vybraných jedinců sýkory koňadry. Tento genetický znak jsem pak vztahovala ke stavu vybraných kondičně závislých fenotypových znaků.

6.1 Materiál

Modelový druh

Sýkora koňadra (*Parus major*)

Sýkora koňadra se řadí do řádu pěvci (*Passeriformes*), čeled' sýkorovití (*Paridae*), je největší a nejtěžší střeoevropská sýkora s hmotností až 20 g a délkou 14 cm. Rozšířená je po celé Evropě a i u nás je nejhojnější sýkorou zahrad, parků a světlých lesů. Ve střední Evropě jsou sýkory koňadry částečně tažné, severnější populace jsou tažné a jihoevropské populace jsou stálé.

Sýkora koňadra je nápadného zbarvení. Samec se od samice liší výraznějším žlutým zbarvením hrudi a širším centrálním prsním proužkem. Intenzitu zbarvení ovlivňuje melanin a karotenoidy. Pro samice hraje při výběru partnera jeho zbarvení důležitou roli. Samice se raději spojí se samcem, který má širší melaninem pigmentovaný pruh a žlutější karotenoidový odstín peří. Koňadry mají sytě černou hlavu s modravým leskem a čistě bílé tváře. Břicho je sytě žluté, mediálně rozdělené rozdílně širokým černým pruhem, který je u samic méně výrazný a končí na břiše, u samců je širší a delší, takže zasahuje až pod ocas. Hřbet koňader je olivově zelený, křídla a ocas mají namodralý nádech. Mladší ptáci jsou bledší a mají žlutavé líce.

Sýkory si zjara začínají hledat partnery a samice začínají se stavbou hnízda. Jako hnízdo jim slouží stromové dutiny, hnízdní budky (vletový otvor větší než 30 mm), ale i méně obvyklé dutiny jako jsou např. kovové trubky nebo schránky. Samice hnízdo pečlivě upraví mechem, v němž je hluboká polokulovitá miska vystlaná peřím a chlupy. Po naklazení celé snůšky, kterou tvoří 10-13 bílých, červenohnědě kropenatých vajec, začíná samice sedět na vejcích, přičemž jí po celou dobu potravu zajišťuje samec. Asi po 13-14 dnech se z vajec vylíhnou mláďata, která krmí oba rodiče. Mláďata dutinu opouštějí po 18-20 dnech, a ještě asi dva týdny je rodiče krmí. Hnízdí dvakrát ročně.

Jako potrava koňadrám slouží hmyz, housenky a semena obsahující tuk (Šťastný, Drchal 1984; Bezzel et al. 2003; Bainová 2011).

Studovaná populace

Pracovala jsem s genetickým materiálem, který pocházel od 140 volně žijících jedinců sýkory koňadry (*Parus major*). Testovala jsem volně žijící zvířata proto, že u volně žijících jedinců se uplatňuje nenarušený přírodní výběr (selekce), který nelze studovat ani u domácích ani u laboratorních zvířat. Zvířata byla odchyťována ve svém přirozeném prostředí v roce 2009 a 2010. Odchyty probíhaly v Praze Bohnicích do odchyťových sítí.

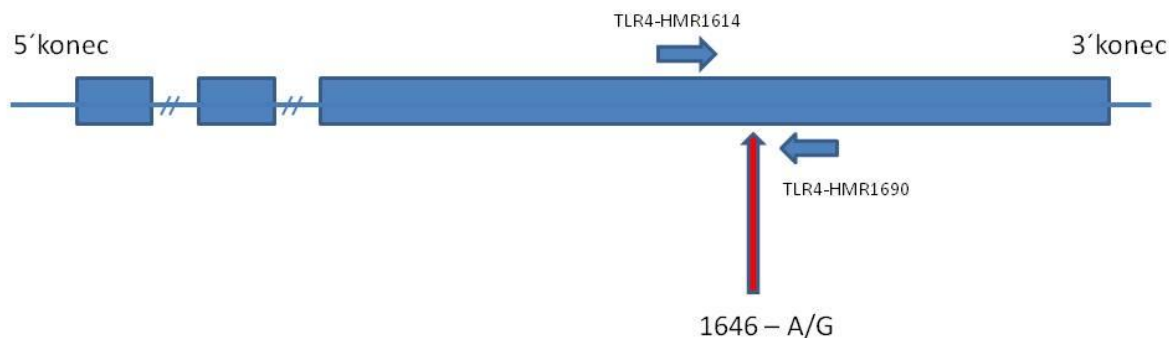
Odběr vzorků se prováděl u všech odchycených jedinců. Vždy bylo zaznamenáno pohlaví a věková kategorie zvířat. U odchycených jedinců se ihned po odchytu z křídelní žíly odebral vzorek krve (100 μ l krve, což je minimální množství potřebné pro požadované analýzy), tento vzorek se rozdělil na dvě části, z níž první byla uložena do chladu a později z ní byl získán absolutní počet leukocytů a druhá se konzervovala ethanolem a následně byla použita k izolaci DNA a stanovení požadované genetické informace. Dále byly všechny sýkory

zváženy, změřila se délka levého běháku (tarsometatarsu). Následně byly stanoveny hodnoty tří ptilochronologických indikátorů kondice: délky a hmotnosti 2. levého rýdovacího pera a průměrné šířky růstového proužku rýdovacího pera. V rámci ornamentace byla pozornost věnována šířce černého pruhu na hrudi. Tento znak byl vyhodnocen z digitálních obrazů ornamentace a vyjádřen jako plocha proužku (mm²). Fenotypová data jsem převzala z práce Bainová 2011.

Cílem této studie bylo zmapovat polymorfismus Toll-like receptoru 4. Z genetických vzorků bylo testováno na přítomnost substituce A1646G 140 jedinců, přičemž já jsem se aktivně podílela na testování 13 jedinců.

6.2 Metodika genetických analýz

Ze všech odebraných vzorů byla získána DNA, na základě konzervativnosti TLR4 u zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) z řádu pěvců (Passeriformes) a kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) z řádu hrabaví (Galliformes) byly navrženy primery. DNA se sekvenovala z 3. exonu, přesná pozice sekvenovaného genu je od TLR4-HMR1614 po TLR4-HMR1690 (obr. 1). Jde tedy o 76 bazí. Během optimalizačního procesu byly použity dvě různé polymerázy. První z nich byla Taq DNA polymeráza (Fermentas) a druhá HotStar Taq DNA polymeráza (MultiPlex PCR Kit Qiagen). Pomocí gelové elektroforózy byla kontrolována úspěšnost PCR. Produkty PCR byly čištěny a pak bylo zesíleno sekvenování primerů. Výsledná PCR byla vyčištěna a na konečnou minimalizaci artefaktů PCR a konečné pořadí TLR4 se skládá z nejméně dvou nezávislých dílčích sekvencí získaných použitím rozdílných primerů (Bainová 2011).



Obr. 1 Stavba Toll-like receptoru 4, autor: Anna Bryjová

K vlastnímu rozlišení, o který genotyp se jedná bylo použito různých chemikálií.

První zkoušený byl kit firmy KAPA, speciálně určený pro **HRMT** metodiku. Pracuje na základě využívání vysokého rozlišení Melt (HRM) analýza. Úsek DNA (např. PCR produkt) může mít různé vlastnosti, které jsou určeny jeho sekvencí, tedy pořadím nukleotidů. Pokud například takový produkt pomalu denaturujeme (melting - rozpouštění) můžeme zaznamenat rozdíly (například snímáním změny fluorescence u značeného PCR produktu) mezi postupem této denaturace i u velmi podobných úseku DNA a to tak, že můžeme rozeznat záměnu jediné baze v úseku několik desítek bazí. Protože jsme toto potřebovali v našem experimentu zjistit, použili jsme právě této metodiky.

Je to rychlá analýza, která se používá pro PCR analýzy genetických mutací nebo rozptylu nukleové kyseliny. PCR (z anglického Polymerase Chain Reaction) je metoda rychlého a snadného zmnožení úseku DNA, která probíhá pomocí replikace DNA. Úseky DNA, které se mají namnožit (amplifikovat) jsou ohraničeny na začátku a na konci tzv. primery (krátkými oligonukleotidy DNA). PCR slouží k vytvoření až mnoha milionů přesných kopií původního

templátu DNA o délce až několik tisíc nukleotidů což umožňuje provést analýzu DNA i z velmi malého vzorku (Wikipedie 2012c).

Vyrobený kit obsahuje master-mix připravený k použití. Vzhledem k tomu, že jsem s tímto materiálem doposud nepracovala, přísně jsem dodržovala odborné postupy a rady mé druhé konzultantky Anny Bryjové. Pracovní postup byl následující: nejprve musela být připravena nádoba s ledovou tříští z důvodu lepší úchovnosti používaných chemikálií, které by se po celou dobu práce měly udržovat v chladu. Do této nádoby jsem připravila chemikálie potřebné k přípravě PCR. Pracovala jsem s pipetami různých objemů a počtem kanálů, podle potřebného množství a počtu. Všechny komponenty byly v požadovaném objemu (obr. 2) napipetovány do zkumavky a mírně promíchány. Tento mix se poté rozpipetoval do platička, kde k němu byla přidána DNA, celý obsah se několikrát propipetoval, aby se všechny komponenty promíchaly a tím se docílilo stejnoměrné koncentrace. Každý vzorek se v jednom pokusu prováděl dvakrát, aby se snížila možnost chybných nebo zkrslujících výsledků. Takto připravené platičko bylo dáno do centrifugy, aby se odstranily bubliny, které by znehodnotily výsledek. Poté bylo platičko umístěno do přístroje LC 480 od firmy Roche A, kde byly před spuštěním nastaveny parametry PCR. Teplota prvního cyklu 96° , po dobu 3 minut (v tomto cyklu dochází k aktivaci polymerázy), následuje 96°C pro denaturaci DNA, 60°C pro annealing (nasednutí) primerů a 72°C pro elongaci (prodloužení) nově vznikajícího řetězce, tyto 3 kroky se opakují 40krát a tak dochází k polymerázovému namnožení původního produktu. Poté je tento výsledný PCR produkt zchlazen na 40°C a pomalu zahříván na 95°C během kterých dochází k denuraci dvouřetězce PCR produktu, v této fázi je plynule měřena fluorescence vzorku. Přístroj LC 480 funguje na základě laserového prosvícení vzorku, na který je navázána speciální fluorescenční barvička (fluorescence), přičemž čím větší je objem zžádaného produktu ve vzorku, tím silnější je signál, který podnítil laserový paprsek.

KAPA-HRMT

	32	for 1 reaction	Final	Stock	Unit	Dilution
Primer	9,60	0,3	0,2	10	uM	50
Primer	9,60	0,3	0,2	10	uM	50
MgCl ₂	57,60	1,8	3	25	uM	8,333333
buffer	240,00	7,5	1	2	x	2
ddH ₂ O	131,20	4,1				
Master mix	448,00					
DNA		1			ul	
Total volume		15				

Tabulka 1: Množství složek jednotlivých komponentů pro KAPA-HRMT kit, autor: Anna Bryjová

Druhou používanou byla chemie od firmy Applera a to jedna z nejlepších polymeráz **AmpliTaQ GOLD**, tu nelze koupit v předem připravené podobě. Proto se všechny složky master mixu musí samostatně naměřit a smíchat, množství složek je uvedeno v tabulce 2. Tato metoda je tedy poněkud pracnější. Dále byl postup stejný jako u předešlé metody. Pracovalo se s jedním platičkem, takže probíhaly obě analýzy současně. Při práci s chemickým a genetickým materiálem jsem postupovala opatrně a používala jsem jednorázové chirurgické rukavice.

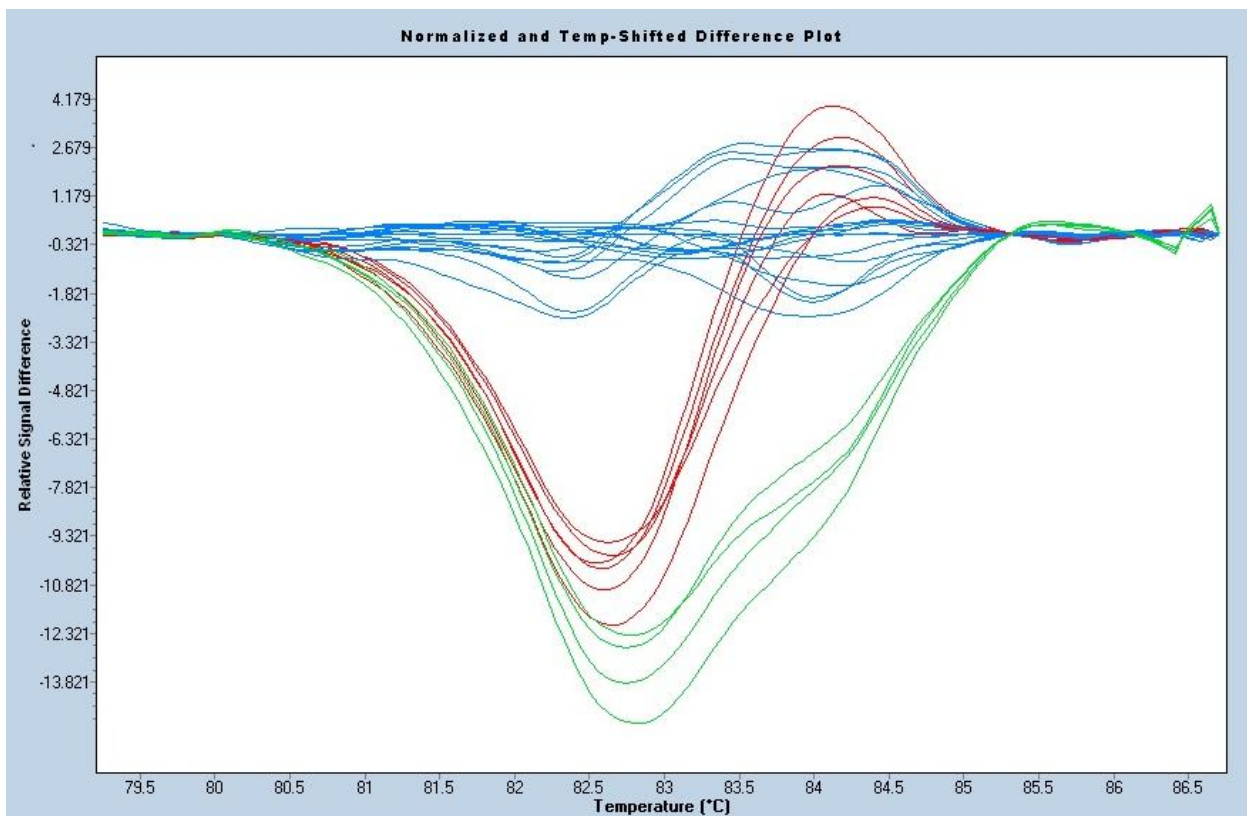
ApliTaqGOLD

	32	for 1 reaction	Final	Stock	Unit	Dilution
Primer F-	9,60	0,3	0,2	10	uM	50
Primer R-	9,60	0,3	0,2	10	uM	50
MgCL ₂	57,60	1,8	3	25	mM	8,333333
EvaGreen	24,00	0,75	1	20	uM	20
dNTPs	9,60	0,3	0,2	10	mM	50
buffer	48,00	1,5	1	10	x	10
Taq (GOLD)	3,20	0,1	0,1	5	U/ul	
ddH ₂ O	286,40	8,95				
Master mix	448,00					
DNA		1			ul	
Total volume		15				

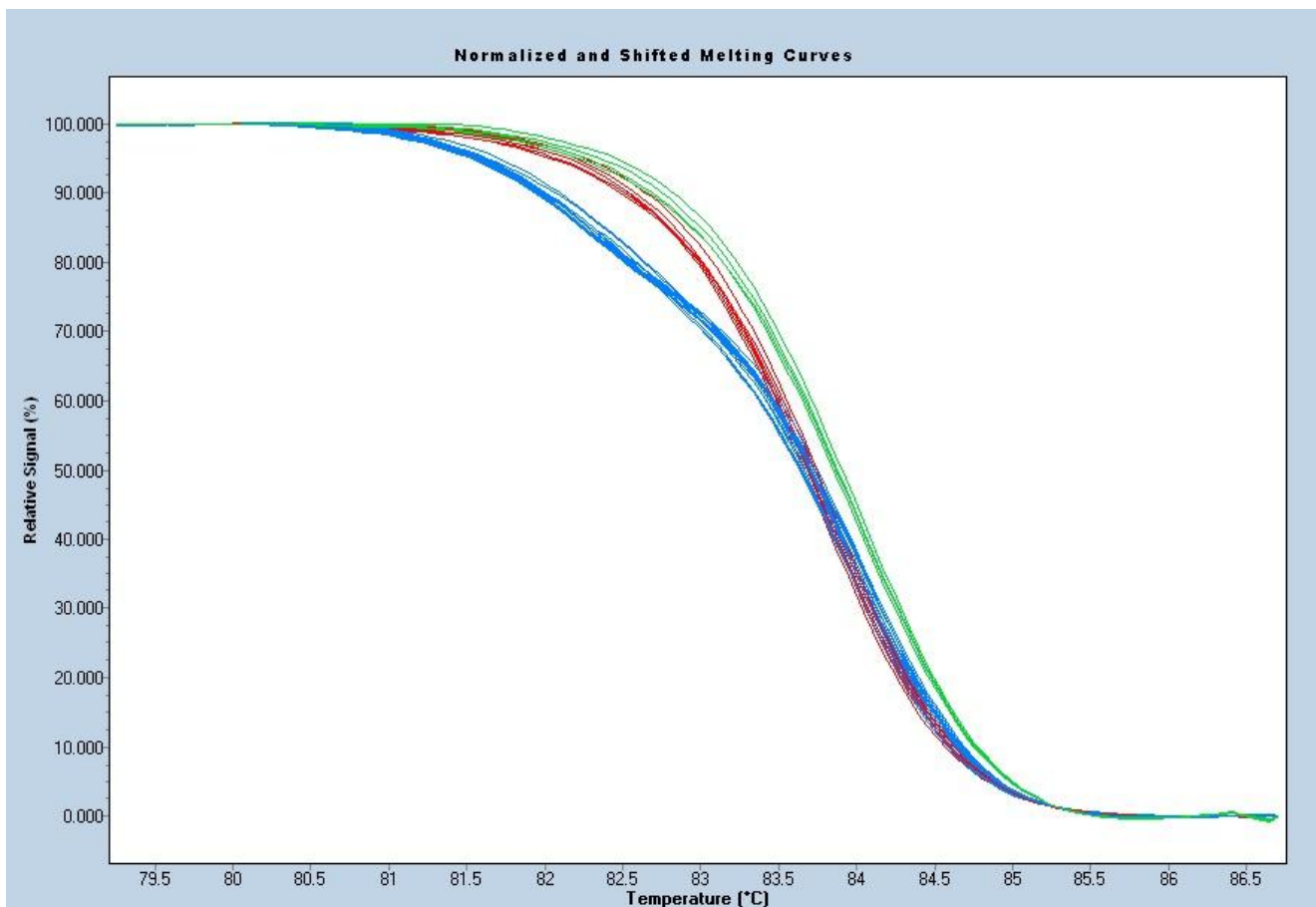
Tabulka 2: Množství složek jednotlivých komponentů pro AmpliTaqGOLD, autor: Anna Bryjová

Pro vyhodnocení obou analýz muselo dojít k optimalizaci cyklů (zjištěním, která doba při působení určité teploty byla nejlepší). Srovnáním obou postupů bylo zjištěno, že kvalitněji fungoval **KAPA-HRMT kit**, kde byly patrnější jednotlivé fáze cyklu (zvláště druhá fáze). Z tohoto plyne, že při tomto zkoumání lépe pracoval kit, který byl předem výrobcem zoptimalizován pro tuto metodiku, přestože neobsahoval tak přesnou polymerázu jako je AmpliTaq GOLD.

U problémových vzorků byl proveden další test KAPA-HRMT kit, při níž byli zaznamenáni jedinci s genotypem GG (Obr. 2;3).



Obr. 2: Graf vzorků- červená barva= jedinci s genotypem AA
 modrá barva= jedinci s genotypem AG
 zelená barva= jedinci s genotypem GG



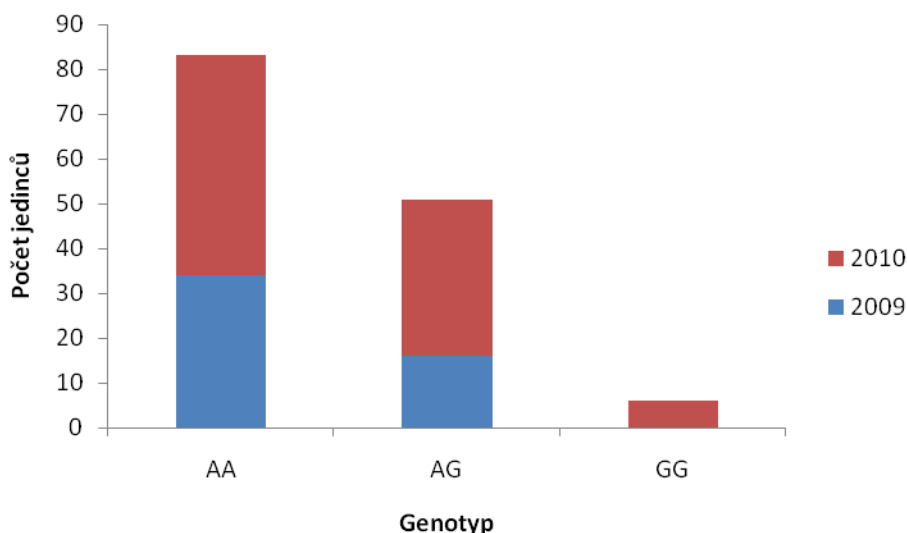
Obr. 3: Graf vzorků- červená barva= jedinci s genotypem AA
modrá barva= jedinci s genotypem AG
zelená barva= jedinci s genotypem GG

Statistické vyhodnocení dat

Statistická analýza dat byla provedena v programu R (verze 2.12.1) M. Vinklerem. Data pro samce a samice byla vzhledem k výrazně odlišné ornamentaci obou pohlaví analyzována zvlášť. Použita byla metoda zobecněných lineárních modelů. Původní model obsahoval ornamentaci jako vysvětlovanou proměnnou a rok, věk, standardizovanou hmotnost, délku běháku, šířku růstového proužku a přítomnost substituce A1646G jako vysvětlující proměnné. Minimální adekvátní model (MAM) byl získán postupnou eliminací nesynonymních členů z modelu.

7 Výsledky a diskuse

Bylo zjištěno, že genotyp AA má 83 jedinců (34 jedinců z roku 2009 = 68% v daném roce a 49 jedinců testovaných v roce 2010 = 44,1 % v daném roce), genotyp AG má 51 jedinců (16 z roku 2009 a 35 z roku 2010) a nejméně jedinců nese genotyp GG 6 jedinců, v roce 2009 měl tento genotyp pouze jeden jedinec a v roce 2010 bylo jedinců s tímto genotypem 5. Rozdíl mezi lety 2009 a 2010 ve frekvenci alel naznačuje zvyšující se podíl alely G1646 v populaci.



Obr. 4: Histogram četnosti jednotlivých genotypů substituce A1646G v zimující populaci sýkory koňadry v letech 2009 a 2010.

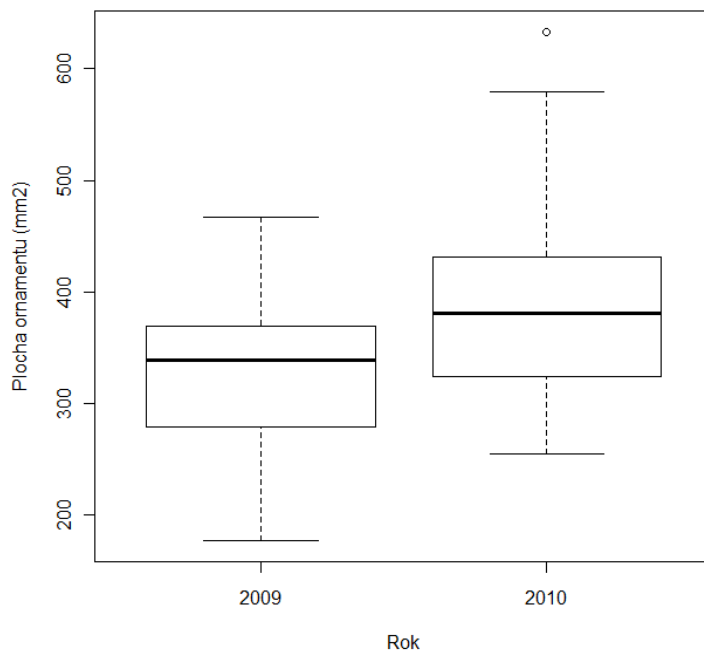
Analýza vztahu mezi plochou melaninové ornamentace a indikátory kondice a genotypem u samic neukázala žádný vliv genotypu na ornamentaci. Jediným faktorem, který měl signifikantní vliv byl rok odchyty ($F_{1,69}=7,61$, $P=0,007$; viz též Obr. 4). Naproti tomu u samců stejná analýza ukázala slabý, ale statisticky významný efekt substituce A1646G (MAM viz Tabulka 3).

Tyto výsledky tedy ukazují, že po propojení genetických informací s daty o ornamentaci a kondici jedinců zjištěnými při odchyty, byla zjištěna spojitost mezi substitucí Q549R a šířkou melaninového proužku na hrudi samců, který je důležitým sekundárním pohlavním

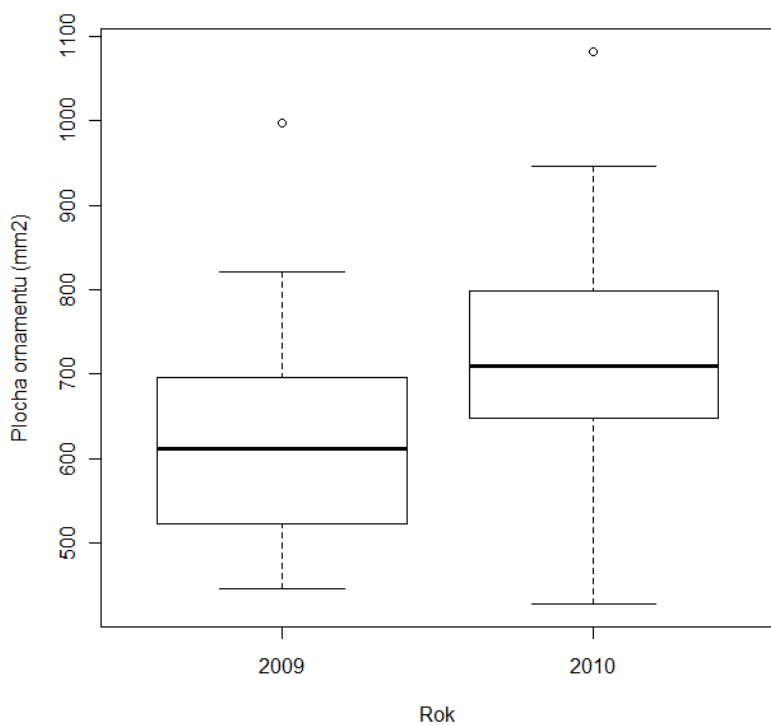
znakem u tohoto druhu. Zdá se tedy, že pohlavní výběr upřednostňující tento znak zároveň selektuje na alelu A1646.

Veličina	Df	F	P
Plocha ornamentu (M)			
Substituace Q549R	1/65	4,53	0,037
Věk	1/65	8,28	0,005
Rok	1/65	17,16	<0,001

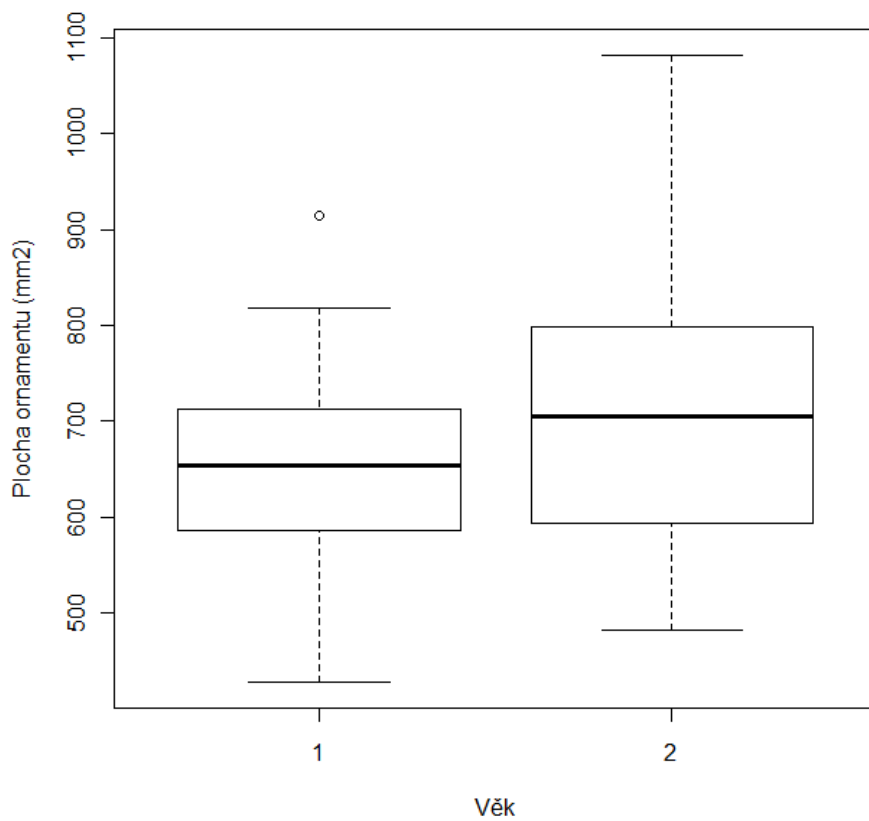
Tabulka 3: Minimální adekvátní model vztahu mezi plochou melaninového ornamentu a rokem, kondičně závislými a genetickými znaky (df = 3/65 ; F = 8,091; P < 0,001)



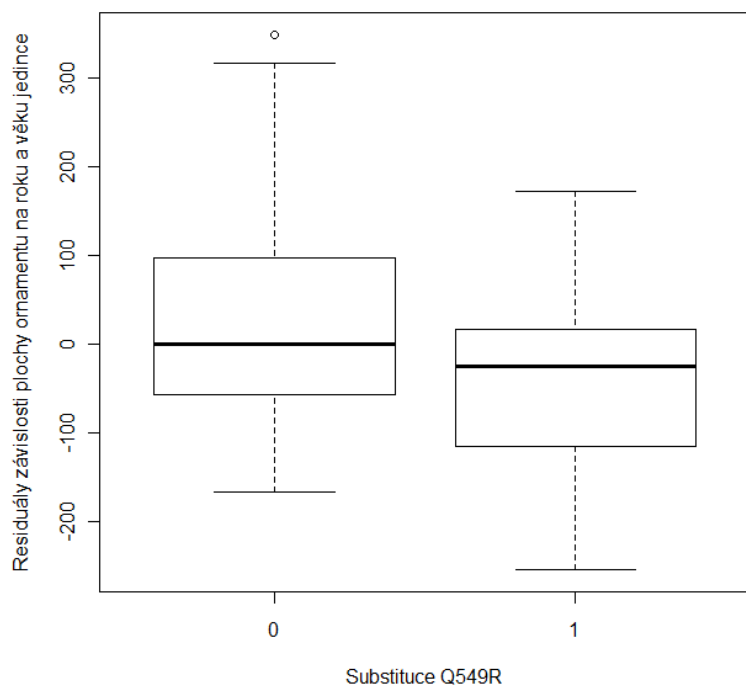
Obr. 4: Závislost plochy melaninového ornamentu na roce u samic.



Obr. 5: Závislost plochy melaninového ornamentu na roce u samců.



Obr. 6: Závislost ornamentace na stáří zvířete (1 = 1. rok, 2 = starší než 1 rok) u samců.



Obr. 7: Vztah mezi residuály ze závislosti plochy melaninové ornamentace na roku a věku jedince a genotypem jedince (0 = bez substituce, 1 = substituce přítomna alespoň v jedné alele).

Závěr

Tato práce je jedna z prvních prací, které se zabývaly studii vlivu genotypu na fenotyp. Podařilo se dojít k závěru, že genotyp má na fenotyp vliv, který se projevuje například rozlišností zbarvení jedinců. Přitom intenzita zbarvení jedinců má vliv na jejich rozmnožování. Vzhledem k tomu, že samice preferují samce, kteří jsou výrazněji zbarveni (mají tedy širší černý hrudní proužek a výraznější odstín žluté barvy peří břicha). Na tento znak má vliv substituce A1646G- alela vyskytující se v Toll-like receptoru 4.

Výsledkem práce je tedy průkaz vlivu Toll-like receptoru 4 na fenotyp sýkory koňadry (*Parus major*).

8 Seznam použitých zkratk

BCR „B-cell receptor“ (receptor adaptivní imunity)

DAMPs „Damage-associated molecular pattern“ (struktury charakteristické pro poškození vlastního organismu)

LRR "Leucine rich repeat" (úseky DNA extracelulární domény TLRs bohaté na leucin)

MAL "MyD88-adaptor-like" protein

MHC "Major histocompatibility complex" (hlavní histokompatibilní komplex)

NK "Natural killers" (NK-buňky - přirození zabíječi)

PAMPs "Pathogen-associated molecular patterns" (evolučně konzervované struktury mikroorganismů, virů, apoptických buněk apod.)

PCR "Polymerase chain reaction" (polymerázová řetězová reakce)

PRRs "Pattern recognition receptor" (receptory vrozené imunity rozpoznávající PAMPs)

TCR „B-cell receptor“ (receptor adaptivní imunity)

TLRs "Toll-like receptors" (toll-like receptory)

9 Literatura

Seznam použitých knih:

- BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. Lékařská mikrobiologie, 1. vyd. Praha: Marvil 1996. Kapitola 8, Patogenita a virulence bakterií, s. 137-139
- BEZZEL, E., et al., Zoologická encyklopedie Ptáci, 1. vyd. Praha: Euromedia Group k.s. 2003, s. 116; ISBN 80-242-0967-5
- FLEGR, J. Evoluční biologie, 1. vyd. Praha: Academia, nakladatelství Akademie věd České republiky 2005. Kapitola VIII, Polymorfismus, s. 162-163. Kapitola XIX Evoluce parazitů, s. 338-354; ISBN 80-200-1270-2
- HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J. Základy imunologie, 2. vyd. Praha: TRITON 2001. Kapitola 1 Základní pojmy, funkce a komponenty imunitního systému, s. 21-27. Kapitola 2 Fagocyty a další buněčné složky nespecifické imunity, s. 30-37. Kapitola 3, Komponenta a další neadaptivní mechanismy, s. 41-42. Kapitola 5 Antigenně specifické receptory, s. 52-53. Kapitola 6 MHC glykoproteiny- prezentace peptidových fragmentů, s. 62-67. ISBN 80-7254-215-X
- ŠTASTNÝ, K., DRCHAL, K. Naši pěvci, 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství 1984. s. 113 ISBN 07-080-84

Internetové zdroje:

- Wikipedia 2012a <http://en.wikipedia.org/wiki/Pathogen>
- Wikipedia 2012b http://en.wikipedia.org/wiki/Immune_system
- Wikipedia 2012c http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction

Citace článků:

- AGRAVWAL & LIVELY- Infection genetics: gene-for-gene versus matchingalleles models and all points in between. *Evolutionary Ecology Research*, 2002, 4: 79–90
- AKIRA et al. Cell 124, 783–801, 2006
- BERNATCHEZ A LANDRY: MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years?. J .EVOL. B IOL. 16 (2003) 363–377 a 2003 BLACKWELL PUBLISHING LTD
- KEESTRA AND VAN PUTEN: Unique Properties of the Chicken TLR4/MD-2 Complex: Selective Lipopolysaccharide Activation of the MyD88-Dependent Pathway. *The Journal of Immunology*, 2008, 181: 4354–4362.
- ROACH et al. -The evolution of vertebrate Toll-like receptors. PNAS , July 5, 2005, vol. 102, no. 27, 9577–9582
- VINKLER et al.: Identification of the first Toll-like receptor gene in passerine birds: TLR4 orthologue in zebra finch (*Taeniopygia guttata*). John Wiley & Sons A/S 2009 , Tissue Antigens 74, 32–41

Bakalářské práce

- BAINOVÁ, Hana- The Influence of Toll-like Receptor 4 Polymorphism on Condition and Ornamentation in Great Tit (Vliv polymorfismu Toll-like receptoru na kondici a ornamentaci u sýkory koňadry), Praha 2011. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie

BAINOVÁ Zuzana- Evoluční význam polymorfismu receptorů vrozené imunity, Praha 2010. Univerzita Karlova v Praze
KRÁLOVÁ, Tereza- MHC geny u ptáků – srovnání modelových a volně žijících druhů, Brno 2010. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie
OPATOVÁ, Pavlína- Geny vrozené imunity a jejich vliv na fitness u ptáků, Brno 2011. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie