

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce
Parazitace a diverzita v genech MHC u drobných hlodavců

Lukáš Vejsada
Školitel: RNDr. Jan Štefka, PhD
Školitel – konzultant: Prof. RNDr. Václav Hypša, CSc

Laboratoř Molekulární Fylogenetiky a Evoluce Parazitů
Parazitologický Ústav, Biologické centrum, AVČR

České Budějovice 2014

Bakalářská práce:

Vejsada L., 2014, Parazitace a diverzita v genech MHC u drobných hlodavců. [Parasitism and diversity in MHC genes in small rodents, Bachelor Thesis in Czech] – 32 pp, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis provides a review of issues connected to the study of MHC in small rodents. Also an assesment of the diversity of MHC alleles in the mouse *Apodemus* is evaluated.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona § 47b zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne: 2014

Lukáš Vejsada

Poděkování:

Rád bych poděkoval Janu Štefkovi za odborné vedení a trpělivost. Václavu Hypšovi za konstruktivní kritiku a pomoc s počítačovými programy. A nakonec Marii Krausové a Jakubu Vlčkovi za jejich cenné rady a pomoc, při zkompletování této práce.

Obsah

1	Úvod	2
1.1	Hlavní histokompatibilní komplex	2
1.1.1	<i>MHC class I</i>	3
1.1.2	<i>MHC class II</i>	6
1.1.3	<i>Genetická variabilita MHC</i>	8
1.1.4	<i>MHC polymorfismus a přírodní selekce</i>	9
1.2	MHC diverzita u drobných hlodavců	11
1.3	Fylogeografie <i>Apodemus flavicollis</i>	13
2	Praktická část	15
2.1	Materiály a metodika	15
2.2	Výsledky a diskuze	16
3	Závěr	21
3.1	Použitá literatura	22
3.2	Příloha	27

Parazitace a diverzita v genech MHC u drobných hlodavců

Tato práce se zaměřuje na jedno z perspektivních, ale poměrně málo studovaných témat evoluční parazitologie, vztah mezi genetickým pozadím hostitelů v MHC a strukturou jejich parazitárních infekcí. Vzhledem k současnému zaměření naší laboratoře se soustředí především na hlodavce rodu *Apodemus* a jejich parazity. Koncipována je jako literární rešerše v širším kontextu problematiky MHC a parazitů, doplněná o předběžné praktické otestování zvoleného modelu.

1 Úvod

1.1 Hlavní histokompatibilní komplex

Evoluční biologie se o geny hlavního histokompatibilního komplexu (Major histocompatibility complex, dále uváděn pouze zkratkou MHC) zajímá z mnoha důvodů, například pro jejich nespornou roli v odolnosti hostitele vůči parazitovi, či mimořádně vysokou alelickou variací. Molekulární ekologie zase studuje především selektivní faktory, které udržují vysoký polymorfismus MHC genů v přírodních populacích (Meyer-Lucht a Sommer, 2005).

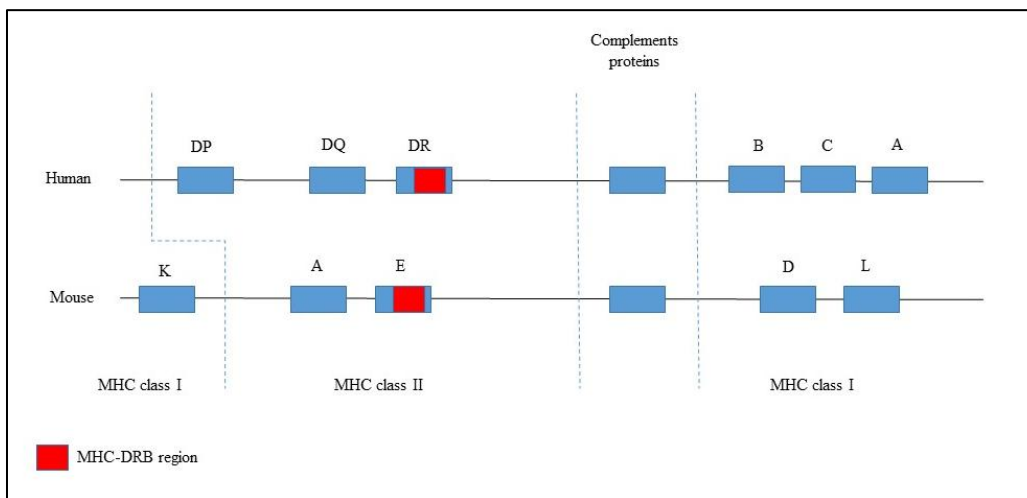
MHC geny patří k nejvíce polymorfním genům u vyšších obratlovců. Tento polymorfismus se vyskytuje především ve vazebném místě antigenu (antigen binding site, ABS) a projevuje se vysokým počtem modifikací, které mu dovolují vázat různorodé antigeny (Hughes a Nei, 1998). Změny v MHC lokusech ovlivňují mnoho důležitých biologických znaků zahrnujících imunitní rozpoznávání, citlivost k infekcím, náchylnost k autoimunitnímu onemocnění, individuální pach a preference při výběru partnera (Sommer, 2005).

Geny MHC patří do multigenní rodiny, která je jedním z nejdůležitějších faktorů imunitního systému u vyšších obratlovců (Hedrick a Kim, 2000; Penn, 2000). Důležité jsou především tím, že kódují glykoproteiny, které jsou schopny na sebe navázat antigeny a transportovat je na povrch buněk. Na povrchu jsou antigeny prezentovány T-lymfocytům, což následně spustí imunitní odpověď (Hedrick, 1994). MHC proteiny se vyskytují ve třech různých třídách (classes), z imunologického hlediska se jako nejdůležitější ukázaly MHC třídy I (uváděné jako MHC class I, popřípadě jen jako MHC I) a MHC třídy II (uváděné jako MHC class II, popřípadě jen jako MHC II). Glykoproteiny MHC I jsou přítomné téměř u všech somatických buněk a jsou spojovány s vnitrobuněčnými infekcemi, jako jsou viry a rakovinou zasažené buňky. Molekuly MHC I prezentují antigeny cytotoxickým T-lymfocytům (cytotoxic T-lymfocytes, uváděné jako CTL). Glykoproteiny MHC II se nacházejí převážně u specializovaných buněk prezentujících antigeny, kam patří makrofágy, B-lymfocyty či dendritické buňky a je jim připisována především odolnost vůči parazitům. Molekuly MHC II prezentují pomocným T-lymfocytům (helper T-lymfocytes, uváděné jako T_H) (Rammensee a spol, 1993).

Při útoku patogenu musí být T-lymfocyty schopny rozeznat vlastní buněčné peptidy od peptidů patogenu, právě z toho důvodu jsou vystaveny silné selekci při dospívání

v brzlíku, až 95 % z nich je eliminováno nebo inaktivováno. Při jejich vývoji je diverzita zajištěna náhodným přeskupováním genů T-buněčných receptorů. Avšak právě z důvodu náhodného přeskupování je velká pravděpodobnost, že budou vázat vlastní peptidy, proto jsou takové buňky eliminovány. Stejně tak jsou eliminovány i buňky, které nedokáží rozpoznat MHC molekuly. Žádný T-lymfocyt totiž nedokáže rozpoznat antigen, bez pomoci MHC molekuly (Penn, 2002).

Geny MHC class I a MHC class II jsou u ptáků a savců spojeny v jediném genovém komplexu (Bernatchez a Landry, 2003). Na obrázku (Obr. 1) si můžeme detailněji prohlédnout rozložení MHC lokusů na genomu myši a člověka. Lokusy u člověka (*homo sapiens*) jsou rozdělené na 3 části. V první jsou tři lokusy (DP, DQ, DR) kódující MHC class II molekuly, ve druhé se nachází lokus kódující proteiny komplementu a ve třetí části jsou 3 lokusy (B, C, A) kódující MHC class I molekuly. Lokusy u myši mají 4 části rozdělené tak, že v první a poslední jsou lokusy (K, D, L) zodpovědné za kódování MHC class I molekul, ve druhé části se nachází lokusy (A, E) kódující MHC class II molekuly a ve třetí části jsou lokusy kódující proteiny komplementu.



Obr. 1: Genetická stavba MHC lokusu u myši (K, A, E, D, L) a člověka DP, DQ, DR, B, C, A). Středem našeho zájmu je vyznačený region (MHC-DRB). Převzato a upraveno z Penn (2002).

1.1.1 MHC class I

Většina buněk v těle vyšších obratlovců exprimuje geny pro tvorbu glykoproteinu ze třídy MHC I. Tyto molekuly prezentují peptidy z vnitřního prostředí buněk imunitnímu systému a to konkrétně CTL. Každá molekula MHC I je heterodimer skládající se ze dvou řetězců těžkého α řetězce a molekuly β_2 -mikroglobulinu. Těžký α řetězec je složen ze tří

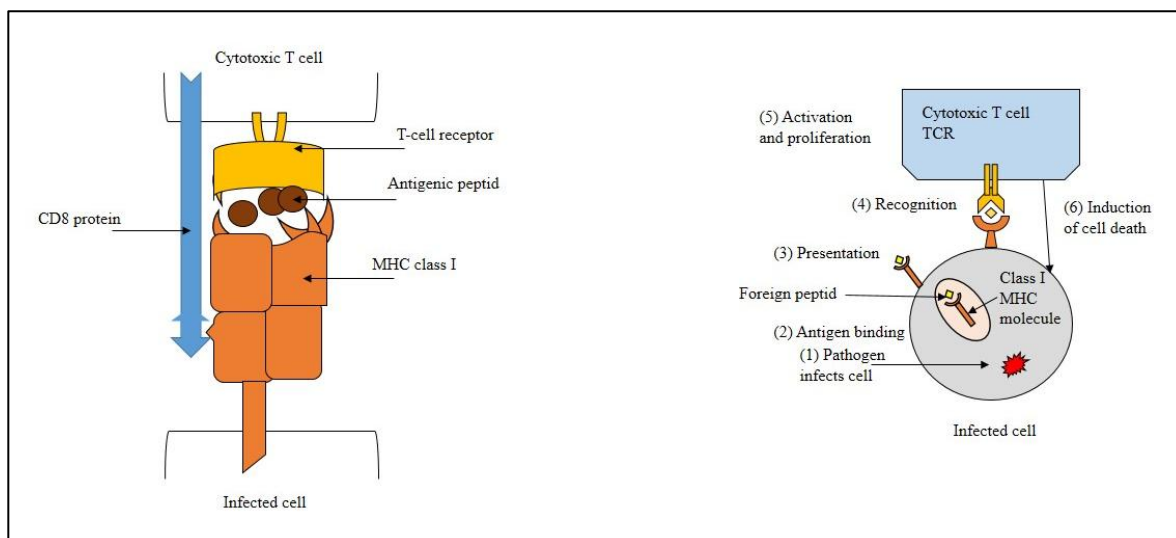
extracelulárních domén (α_1 , α_2 , α_3), transmembránového regionu a cytoplasmatické domény. β_2 -mikroglobulin obsahuje jedinou doménu a je nekovalentně spojen s α_3 doménou (Hughes a Yeager, 1998; Frank, 2002; Penn, 2002).

Alfa řetězec kódují geny na polymorfních lokusech A, B a C z oblastí HLA komplexu u člověka, zatímco u myši jsou geny zodpovědné za kódování K a D/L v oblasti H-2. Navíc mohou být molekuly MHC I kódované také geny v Q a Tla oblastech, které se nacházejí pod oblastí H-2. Na rozdíl od α řetězce není β_2 -mikroglobulin kódován uvnitř MHC komplexu. Přesto, že je mezi těmito molekulami zjevná evoluční příbuznost, není lokus pro β_2 -mikroglobulin polymorfní (Bjorkman, 1987). β -řetězec má v molekule MHC I roli stabilizátoru, proto myši u kterých byl gen pro expresi β -řetězce narušen, nemohou exprimovat žádné MHC I molekuly (Penn, 2002).

V cytoplasmě všech buněk se vyskytují multimerní proteolytické komplexy, které jsou zodpovědné za neustálé štěpení buněčných proteinů na malé peptidy. Tyto komplexy se nazývají proteozomy a u savců a s největší pravděpodobností i u ostatních obratlovců mají dva komponenty LMP2 a LMP7 (low molecular mass protein) kódované v regionu MHC třídy II (Rivett, 1993). Tyto komponenty jsou upraveny pomocí cytokinu γ -interferonu a produkují peptidy, které se pravděpodobně naváží na MHC I molekulu. Následně jsou peptidy přeneseny přes membránu endoplasmatického retikula pomocí dimerního transportéru TAP. Dvě podjednotky transportéru TAP jsou také kódované v regionu MHC II. Poté se v endoplasmatickém retikulu utvoří komplex z molekuly MHC I, β_2 -mikroglobulinu a peptidu a ten je jako celek přenesen na povrch buňky (Hughes a Yeager, 1998).

Molekula MHC I je ukotvena v buněčné membráně svojí spodní částí, která je složena z těžkého α -řetězce a β_2 -mikroglobulinu, zatímco její horní část, podobná žlábků, prezentuje antigeny CTL pomocí dvou domén α_1 a α_2 , které tvoří ABS. Právě v kódování tohoto místa nacházíme největší genovou diverzitu. Nezbytnou součástí této molekuly je vysoce konzervovaná doména α_3 , jejíž sekvence jsou nezbytné pro navázání molekuly CD8, která slouží jako T-buněčný receptor (T cell receptor, TCR) pro CD8+ T-lymfocyty (Frank, 2002., Penn, 2002., Weenink a Gautam 1997). Pokud jsou CD8+ T-lymfocyty stimulovány, pak se teprve změní v CTL a podniknou útok na buňku (Frank, 2002). Pro zlepšení představy o prezentování antigenu molekulou MHC T-lymfocytu slouží obrázek (Obr. 2). Na něm můžeme vidět napadení somatické buňky patogenem, který při své aktivitě v buňce vypouští peptidy. Tyto peptidy rozpozná MHC molekula a následně je prezentuje na povrchu buňky, kde je naleznou CTL.

Každý z těchto receptorů má odlišnou specifitu a může vázat pouze určitý komplex MHC molekuly a peptidu. Pokud je parazitický peptid navázán na MHC molekule společně s TCR pak se nazývá epitop. S pomocí TCR kontrolují CTL všechny buňky s MHC I molekulami na nichž jsou prezentovány peptidy a to jak vlastní tak cizí. Neinfikovaná buňka prezentuje na svém povrchu své vlastní peptidy (self peptides), proto je při vývoji lymfocytů v brzlíku kladen velký důraz na to, aby TCR dokázali rozlišit mezi cizími a vlastními peptidy (Berke, 1994; Frank, 2002). Pokud je ale tělo infikováno virem, nebo vnitrobuněčným parazitem, pak jsou parazitické proteiny rozkládané proteozomy prezentované na povrchu buňky MHC I molekulami. Ty následně upozorní CTL na infikovanou buňku a ta je okamžitě zlikvidována. Avšak CTL je schopen rozpoznat cizí peptid pouze v kombinaci s MHC I molekulou. Tohoto se využívá např. v experimentálních liniích myší, které neexprimují β_2 -mikroglobulin a tím pádem nemají na svém povrchu buněk ani molekuly MHC I. V důsledku snížené obranyschopnosti mají velké problémy, pokud jsou napadeny vnitrobuněčnými patogeny. Například je u nich zvýšená mortalita při nakažení chřipkou či vnitrobuněčnou bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Nakažené myši bez molekul MHC I na svém povrchu nevydržely vzdorovat bakterii ani 6 týdnů, zatímco kontrolní skupina myší s ní bojovala více než 20 týdnů (Flynn a spol., 1992).



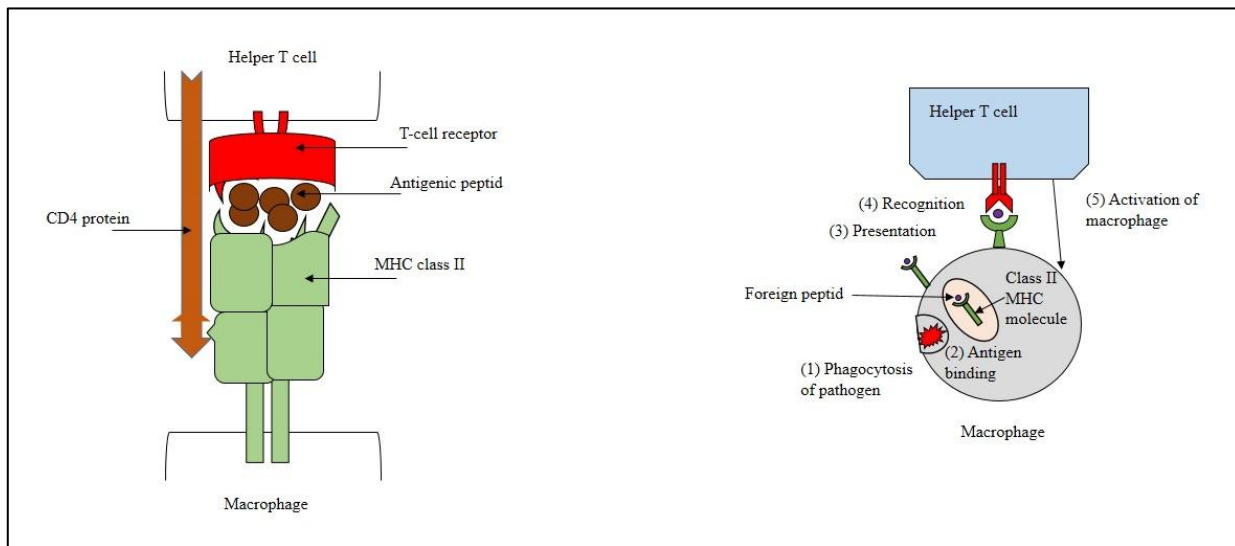
Obr. 2: Prezentování antigenního peptidu cytotoxickému T-lymfocytu, pomocí molekuly MHC class I a následná indukovaná buněčná smrt. Převzato a upraveno podle Penn (2002).

1.1.2 MHC class II

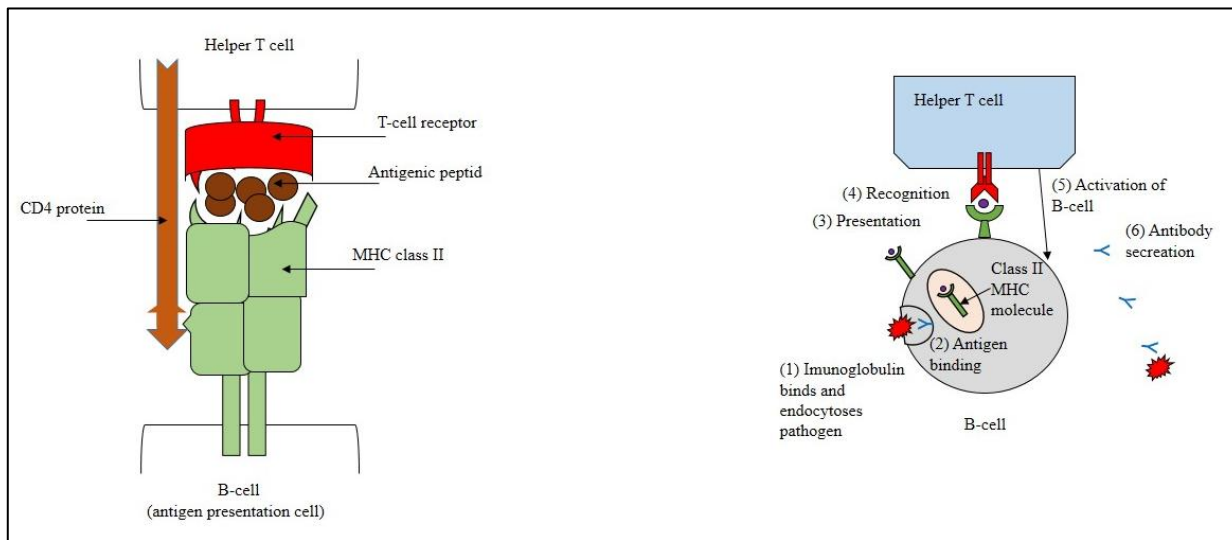
Molekuly MHC II prezentují peptidy pomocným T_H , které mají na svém povrchu determinační protein CD4. MHC II se nacházejí na specializovaných antigen prezentujících buňkách imunitního systému a díky tomu mají mnohem omezenější expresi antigenů než MHC I molekuly (Bernatchez a Landry, 2003). Při prvním vystavení parazitovi se některé epitopy prezentované molekulami MHC II budou shodovat s vzácnými TCR. Tato vazba s TCR společně s dalšími signály spustí rychlé dělení klonů T-lymfocytů s odpovídající specifitou. Jakmile hostitel rozšíří TCR specifitu na daný epitop, zůstane epitop v paměti a při dalším setkání s tímto parazitem vytváří hostitel velké množství T-lymfocytů rychleji než při prvním kontaktu. Při setkání T_H buňky a cizorodého peptidu navázaného na MHC II molekulu dochází k vyloučení cytokinů, které okamžitě spustí imunitní reakci (Hughes a Yeager, 1998; Frank, 2002). Následující obrázky (Obr. 3, 4) nám přiblíží strukturu prezentování antigenu MHC II molekulou u makrofágu a B-lymfocytu. Na obrázku (Obr. 3) makrofág fagocytoval patogen a rozštěpil ho. Jeho proteiny na sebe navázala molekula MHC II, která je prezentovala T_H , a následně se makrofág aktivoval. Na obrázku (Obr. 4) imunoglobulin naváže a endocytuje patogen a v dalším kroku dojde k navázání antigenu na molekulu MHC II. Dalším krokem je prezentování antigenu na povrchu B-lymfocytu, kde jej zaznamená T_H , který spustí aktivaci B-lymfocytu. Aktivovaný B-lymfocyt následně produkuje protilátky.

Strukturně se molekula MHC II podobá molekule MHC I. Také má čtyři extracelulární domény, rozdíl je však v tom, jakým způsobem se utvářejí. MHC II molekula je heterodimer sestávající se z α a β řetězců, které jsou u savců kódovány v oblasti třídy II MHC komplexu. Přesněji řečeno jsou kódovány D oblastí HLA a I oblastí H-2. Tyto oblasti jsou dále dělené následovně: D oblast na DP, DQ, DR a oblast I na IA a IE. V mé práci se zajímám hlavně o kódující oblast MHC-DRB class exon 2 (jedná se o polymorfní region nacházející se na lokusu DR, kódující β - řetězce v molekule MHC II). Každá z těchto podoblastí obsahuje alespoň jeden α a jeden β gen. Molekula MHC II je složena ze dvou domén α_2 a β_2 , které jsou zakotveny v buněčné membráně a z dalších dvou domén α_1 a β_1 , které tvoří žlábek pro antigen (Hughes a Yeager, 1998; Penn, 2002). Na rozdíl od molekuly MHC I, která váže peptidy o délce zhruba 8 – 10 aminokyselin, může MHC II molekula vázat mnohem delší peptidy až o délce 13 – 17 aminokyselin. Komplex tvořený MHC II molekulou a peptidem je odlišný od komplexu, který se tvoří při prezentování antigenu MHC I molekulou. Před transportem na buněčný povrch se heterodimer dočasně spojí s polypeptidem známým

jako invariantní řetězec (Ii). V tomto složení cestují do prostředí podobného endosomu s nízkým pH, kde dochází k degradování Ii a konečně se na MHC II naváže peptid, který má být transportován na povrch buňky (Peters a spol., 1991; Janeway, 1999). Schopnost genů MHC I a MHC II čelit různorodým patogenům souvisí s proměnlivostí variant MHC alel ve vazebném místě pro antigen (Bernatchez a Landry, 2003).



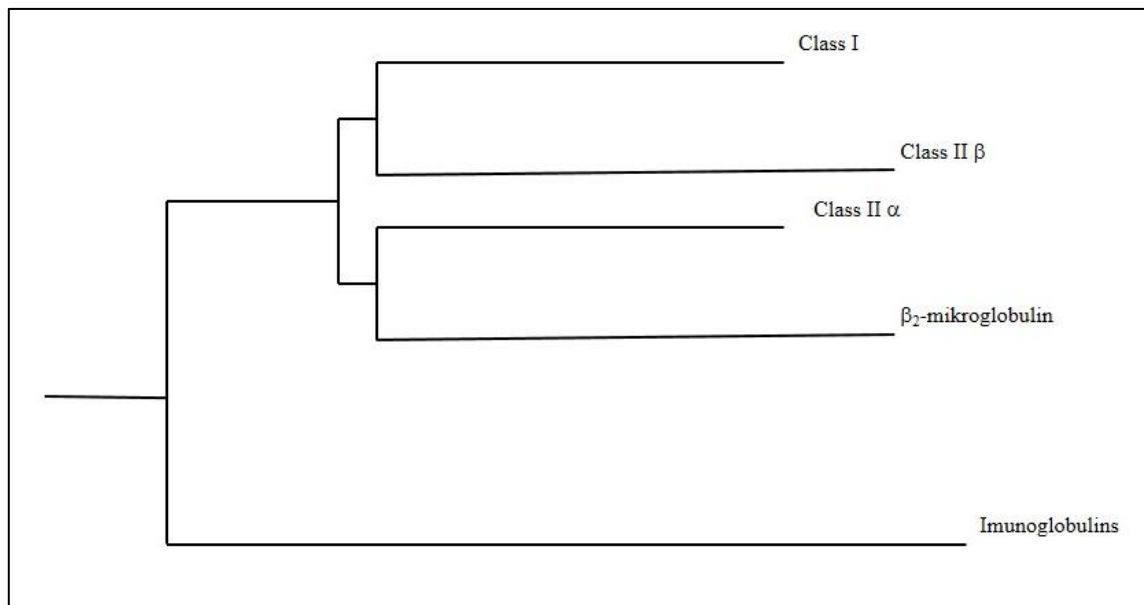
Obr. 3: Prezentování antigenního peptidu pomocnému T-lymfocyту, pomocí molekuly MHC class II a následná aktivace makrofágu. Převzato a upraveno podle Penn (2002).



Obr. 4: Prezentování antigenního peptidu pomocnému T-lymfocyту, pomocí molekuly MHC class II a následná sekrece protilátek. Převzato a upraveno podle Penn (2002).

1.1.3 Genetická variabilita MHC

MHC je velký chromozomální region s více než 200 kódujícími lokusy a jeho genetická variace silně ovlivňuje spektrum patogenů, se kterými se může imunitní systém vyrovnat (Penn a Potts, 1999). Také se předpokládá, že právě patogenní diverzita a evoluce jsou zodpovědné za neobyčejně vysoký stupeň genetických změn běžně se vyskytujících v MHC lokusech. V nich se nachází kromě genů MHC třídy I a II, které jsou zodpovědné za řízení všech specifických imunitních odpovědí, také geny ovlivňující růst, vývoj, rozmnožování, pach a čich. Nejvíce polymorfní geny u obratlovců jsou právě geny MHC I a II. Podobnost struktury i funkcí u MHC tříd naznačuje, že by mohly mít společného předka. Obě třídy se také řadí do imunoglobulinové multigenní superrodiny, která se dělí na jednogenní a multigenní rodinu. MHC molekuly patří do rodiny k protilátkám a TCR. Na obrázku (Obr. 5) se můžeme detailněji seznámit se vztahy v této multigenní rodině (Penn, 2002; Sommer, 2005).



Obr. 5: Vztahy v imunoglobulinové multigenní superrodině. Převzato a upraveno podle Penn (2002).

1.1.4 MHC polymorfismus a přírodní selekce

MHC polymorfismus je podle všeho udržován v genomu kombinací sil přírodní selekce a genetického driftu. Genetický drift působí na rozdíl od přírodní selekce stochasticky a to zejména v malých populacích či v populacích procházejících bottleneckem (náhlé zmenšení populace), kde se jeho efekt významně zvyšuje. Existuje řada hypotéz zabývajících se možnostmi, jaké mechanismy přírodní selekce udržují obrovskou diverzitu MHC genů. Mezi ty nejznámější patří selekce ve prospěch heterozygotů (overdominant selection), preference při páření a negativní frekvenčně závislá selekce (zvýhodňující minoritní alely v populaci) (Nei a spol, 1997; Miller a Lambert, 2004).

MHC polymorfismus je v případě overdominantní selekce udržován za předpokladu, že heterozygotní jedinci v populaci jsou schopni rozpoznat větší množství různorodých parazitů na rozdíl od homozygotů (Doherty a Zinkernagel, 1975). V experimentu prováděném Dohertym a Zinkernagelem (1975) byla porovnávána prezentace antigenů u homozygotů a heterozygotů. Přesto, že více antigenů bylo prezentováno heterozygoty, většina jich pomřela na přehnanou imunitní reakci. Z toho může vyplývat, že ani přílišná diverzita MHC není pro nositele výhodná.

U modelu negativně frekvenčně závislé selekce se předpokládá, že selekce zvýhodňuje ty parazity, kteří jsou schopni se uchytit na hostitele s běžnou sadou alel (common MHC allels) vyskytující se v dané populaci. Výhodou tedy je pokud má jedinec vzácné alely (rare MHC allels), se kterými parazit nepřichází tak často do styku a tudíž vůči němu mohou zajišťovat rezistenci. (Clarke a Kirby, 1966). V populaci tedy nastává stav, kdy vlivem parazitace klesá fitness jedinců s běžnými MHC alelami, a narůstá počet jedinců nesoucích vzácné MHC alely. Tím se stanou jedinci rezistentní k určitému parazitovi v populaci častější a vyvíjí tak větší selekční tlak na parazita. Populace parazita se musí přizpůsobit novým podmínkám panujícím v populaci hostitele nebo se jeho abundance výrazně sníží, případně lokálně vyhyne. V případě, že se populace parazita přizpůsobí, začíná znovu ve větší míře parazitovat hostitele s nyní již v populaci běžnou sadou alel (Penn, 2002).

Dalším typem selekce je na MHC závislý pohlavní výběr (mate choice), také se někdy označuje jako sexuální selekce. Důkazy o existenci této selekce byly nalezeny napříč všemi hlavními taxony obratlovců. Dosud popsané strategie páření zahrnují výběr partnera dle kompatibility, rozdílnosti či určitého MHC genotypu (Milinski a spol, 2006).

Tyto preference při páření zřejmě zahrnují i čichové podněty, protože jak už bylo dříve zmíněno MHC ovlivňuje individuální pach (Penn, 2002).

V případě pohlavního výběru si samička vybírá kompatibilního partnera pro zajištění dobré kombinace genů v potomstvu. Může se rozhodnout pro maximálně odlišného, optimálně odlišného či podobného partnera. Při výběru odlišného partnera se zvyšuje šance, že nedojde ke škodlivým efektům inbreedingu (příbuzenského křížení) a zároveň je tu možnost zvýšení diverzity potomstva v MHC genech. Výhodou vysoké MHC diverzity je bezpochyby široká škála patogenů, proti kterým může potomstvo bojovat. Nicméně u některých studií zabývajících se pohlavním výběrem se ukázalo, že samičky dávají přednost spíše optimální diverzitě MHC než maximální. A to z toho důvodu, že u nich nehrozí zvýšené riziko propuknutí autoimunitního onemocnění (Trivers, 1972; Woelfing a spol., 2009). A nakonec pokud si samička vybere sobě podobného partnera, může docílit limitace potencionálních škod outbreedingu (Huchard a Pechouskova, 2013).

U další strategie pohlavního výběru MHC už není tak očividné, z jakého důvodu si samičky vybírají heterozygotní samce, když se rodičovská heterozygosita nepřenáší na potomstvo. Může to být z toho důvodu, že vlastnictví vzácných alel je obecně spojováno s heterozygositou a samičky tuto strategii uplatňují, když jsou heterozygotní samci více energičtí, než homozygoti (Apanius, 1997).

Posledním případem je cílený výběr konkrétních MHC genotypů, které jsou nějakým způsobem výhodné pro dané prostředí. Většinou jde o vlastnictví konkrétního MHC genotypu, který je rezistentní proti patogenům vyskytujícím se v okolí. Z toho důvodu může být vlastnictví jednoho specifického MHC genotypu mnohem výhodnější než vysoká diverzita proti patogenům, které se ani nemusí nikde v blízkosti vyskytovat (Apanius, 1997). Tento případ výběru je v celku běžný, avšak je velmi obtížné jej zaznamenat v přírodě (Huchard, Pechouskova, 2013).

Některé druhy nevykazují příliš vysoký polymorfismus. Naopak mají velmi malou či téměř žádnou MHC diverzitu. K těmto druhům patří například gepardi (*Aconyx jubatus*), kteří bez problémů mohou přijímat kožní štěpy od nepřibuzných jedinců. Pokud by měli zachovánu výraznější hladinu MHC diverzity nebyli by toho schopní. Velice podobně na tom jsou asijské lvi (*Panthera leo persica*), kteří mohou být poznamenáni takto malou MHC diverzitou kvůli tomu, že jejich populační velikost byla v minulosti velmi nízká a pravděpodobně prošla výrazným genetickým bottleneckem (Penn, 2002).

1.2 MHC diverzita u drobných hlodavců

V této práci jsem se zaměřil, především na studie zabývající se přímo MHC-DRB class exon II regionem a jeho vlivem na imunitní systém u drobných hlodavců. Zajímalo mě především jakým způsobem a v jaké míře se tento region angažuje v případě napadení jedince parazitem. Případně způsob úniku parazita před imunitním systémem.

Svoji jedinečnou rolí v imunitním systému se MHC geny mohou snadno stát cílem imunitní suprese, jak bylo prokázáno například u parazita *Heligmosomoides polygyrus*. Exprese MHC genů ovlivňuje jak adaptivní tak vrozenou imunitu. Předpokládá se, že by MHC class II molekuly mohly ovlivňovat výstavbu vrozené imunity skrze toll-like receptory se kterými spolupracují (Frei a spol., 2010). Nedávné studie indikují, že náchylnost k infekci helmintem u *Apodemus flavicollis* je spojena se specifickými alelami MHC II (Meyer-Lucht, Sommer, 2005). Axtner a Sommer (2011) detekovali negativní korelaci mezi genovou expresí MHC a intenzitou infekce, což by indikovalo, že *H. polygyrus* je schopen ovlivnit hostitelský imunitní systém snížením MHC genové exprese. MHC II molekuly zodpovídají za prezentování helmintích peptidů T_H lymfocytům a následné spuštění imunitní reakce organismu. To může sloužit jako imunitní úniková strategie *H. polygyrus*, podobně jako bylo navrženo u mikroparazitů, kteří jsou schopni imunosuprese (LeibundGut-Landman a spol., 2004). Helminti mohou vysvětlit 15% změn v genové expresi a samotný *H. polygyrus* by vysvětloval pouze 9% (Axtner a Sommer 2011). V budoucnu by se tedy chtěli Axtner a Sommer (2011) zaměřit na efekty MHC specifických alelových expresních hladin na intenzitu infekce od více parazitů, zřejmě z důvodů lepšího porozumění změnám na MHC regionu DRB.

Z důvodů rozšíření jeho populací v opadavých a smíšených lesích a zároveň díky intenzivně studované ekologii a fylogenetickým aspektům genomu je myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) výborným modelovým organismem z čeledi myšovitých (*Muridae*). Meyer-Lucht (2005) studoval důležitost individuálního složení MHC pro rezistenci k parazitům v jejich přirozeném prostředí právě na myšici lesní a konkrétně jej zajímal polymorfismus MHC-DRB class exonu 2 ve spojení se zatížením "nematodními" parazity. Alely modelového organismu ukázaly vysokou míru odlišnosti v nukleotidech a aminokyselinových sekvencích. Přirozeně nejvyšší variabilita byla ve funkčních místech ABS společně s vyšším počtem nesynonymních substitucí, což indikuje pozitivní selekci nových alel (Hughes a Nei., 1988, 1998). Heterozygotní výhoda nebyla prokázána, což mohlo být způsobeno slabou statistickou silou této studie (Meyer-Lucht a Sommer, 2005).

Některé z alel Apfl-DRB byly spojeny s citlivostí, nebo rezistencí vůči parazitům. Konkrétně se jednalo o blízce příbuzné alely Apfl-DRB*5 a Apfl-DRB*15 lišící se pouze v jedné synonymní a jedné nesynonymní substituci v ABS. Jedinci nesoucí tyto alely vykazovali vyšší hodnoty parazitace (měřené jako počet dospělých nematodů a FEC, Faecal egg count), než jedinci s jinými alelami. Jelikož byli jedinci s alelami Apfl-DRB*5 a Apfl-DRB*15 odchyceni na různých lokalitách, nemohou být jejich zvýšené hodnoty v FEC a počty nematodů vysvětleny větším parazitickým tlakem z okolí (Meyer-Lucht a Sommer, 2005). Naopak o poznání nižší stupeň zamoření byl detekován na jedincích nesoucích alelu Apfl-DRB*23. Toto spojení mezi specifickými alelami a citlivostí, či rezistencí k nematodům jsou ve shodě s předpoklady pro frekvenčně závislou selekci (Meyer-Lucht a Sommer, 2005).

U hlodavců je známo, že ve volné přírodě je parazitická prevalence a intenzita infekce ovlivňována místní a časovou variací stejně jako vnitřními faktory například imunitní stav, pohlaví a věk hostitele (Abu-Madi a spol., 2000).

Meyer-Lucht a Sommer (2009) studovali 8 divokých populací myšic rodu *Apodemus* a odhalili, že vysoká MHC diverzita může být způsobena lokálními patogeny. V případě neutrální diversity nebyl zaznamenán žádný efekt, avšak pokud jde o vnitropopulační MHC bohatost, zaznamenali pozitivní signifikantní efekt na odolnost vůči parazitům. Jedinec sám nečerpá výhodu přímo z genetické rozmanitosti populace, ale vzhledem k neustálému ohrožení patogeny, je výhodné, že s větší rozmanitostí alel v populaci má jeho potomstvo větší šanci na získání protektivní alely. Opět se neprokázala heterozygotní výhoda, zřejmě z nedostatku dat pro statistickou analýzu.

Pokud jde o srovnání mezi druhy myšovitých (*Muridae*), vysoký stupeň polymorfismu se vyskytuje jak u myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) tak u myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*). Celková nukleotidová a aminokyselinová divergence uvnitř druhu myšice křovinné (*A. sylvaticus*, 12,36%) byla srovnatelná s divergencí uvnitř druhu krysy obecné (*R. rattus*, 14,71%). Nižší hodnoty divergencí zaznamenali u druhů myšice lesní (*A. flavicollis*, 9,90%) a křečka velkého (*H. antimensa*, 9,20%) (Musolf, Meyer-Lucht a Sommer., 2004). Pozitivní selekce působí v případě, že je počet nesynonymních substitucí vyšší než synonymních. To bylo potvrzeno u všech studovaných taxonů (Bernatchez a Landry, 2003). Vyšší úroveň těchto substitucí byly, objeveny u *A. sylvaticus* a *R. rattus* o něco nižší se vyskytly u *A. flavicollis* a *H. antimensa*. Fylogenetické analýzy indikují, že DRB sekvence se neseskupují podle druhu, ale mísí se s jinými rody. Tvoří vysoce podporované klastry dokládající mezidruhový způsob evoluce (evolučně starý polymorfismus). Klastry mezi druhy se nacházejí v rodech (*Apodemus*, *Rattus*, *Mus*,

Peromyscus) a mezi rody (*A. sylvaticus* a *Rattus*; *Peromyscus* a *Rattus*). Mezi druhové sdílení MHC alel mezi rody bylo předtím podporováno mnoha studiemi, avšak u hlodavců jsou výsledky nejasné (Edwards a Wakelandt, 1997).

1.3 Fylogeografie *Apodemus flavicollis*

Fylogeografie je vědní obor zabývající principy a procesy geografického rozšiřování genealogických linií vnitrodruhových a blízce příbuzných druhů na základě molekulárních markerů (Hewit, 1999; Avis, 2000). Velkou roli na stále se měnící geografické rozšíření druhů i na jejich evoluci mají klimatické změny (Hewit, 2004).

Nedávné fylogeografické studie v Evropě ukázaly, že většina temperátních savců přežila čtvrtohorní zalednění ve středomořských refugiích, která se nacházela na Iberském, Italském či Balkánském poloostrově. A odtud po postglaciálním oteplení začali znovu osidlovat severní a střední Evropu. Největší podíl na znovu osidlování má balkánské refugium (Hewit, 1999, 2001). Nicméně některé boreální a temperátní druhy byly schopny přežít i v severněji položených oblastech. Jde o oblasti střední Evropy, Kavkazu a jižního Uralu (Michaux a spol., 2004). Při opětovném osidlování, z různých refugií může docházet ke střetu dvou odlišných genetických linií a vzniku hybridní zóny (Michaux a spol., 2004).

Myšice rodu *Apodemus* Kaup, 1829 patří k nejběžnějším hlodavcům vyskytujících se v temperátních lesích Palearktické oblasti. Na základě genetické variability se více než 20 druhů myšic rozdělilo do 4 linií s překrývajícími se areály (Serizawa a spol., 2000). V poslední době se nejvíce studií zabývá dvěma druhy rodu *Apodemus* a to konkrétně *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*. Tyto dva druhy je bez molekulárních metod velmi těžké odlišit, navíc mají oba podobné ekologické nároky a lokality jejich výskytu se překrývají (Michaux a spol., 2001). I přesto, že jde o blízce příbuzné druhy, reagovaly podle studií mDNA zcela odlišně na čtvrtohorní zalednění (Michaux a spol., 2003). *A. flavicollis* nebyl schopný přežít během glaciálu na Iberském poloostrově na rozdíl od *A. sylvaticus*, který odtud po glaciálu osidloval západní a severní Evropu. Naproti tomu na Apeninském poloostrovu trpěl *A. sylvaticus* sníženou genetickou diverzitou způsobenou nejspíše izolačním bottleneckem a proto tyto lokální populace ke znovu osidlování Evropy nepřispěly. *A. flavicollis* se během glaciálu zdržoval na Apeninském a Balkánském poloostrově, odkud se poté šířil do západní a severní Evropy. Podle posledních studií je možné, že kolonizoval Evropu i z refugia na Ukrajině a v jižním Rusku (Michaux a spol., 2005). Lze předpokládat, že během čtvrtohorního zalednění docházelo v refugiích k omezení diverzity alel MHC a k částečné

diferenciaci těchto populací. Během postglaciální rekolonizace severněji položených oblastí nemuselo dojít k obnovení stejné diverzity ve všech populacích. Avšak toto lze ověřit jen výzkumem na širším spektru vzorků, než bylo prováděno dosud.

2 Praktická část

2.1 Materiály a metodika

V první fázi práce jsme zkoušeli metodiku na získání sekvencí MHC-DRB class exon 2 pro rod *Myodes*, ale nepodařilo se nám získat použitelné PCR produkty. Primery pro *Myodes* jsou uvedené v příloze (první řádek př. 2) stejně jako reakční podmínky PCR (př. 3). Z toho důvodu jsme se zaměřili na rod *Apodemus* (viz. oddíl 2: Cíle práce).

Tkáňové vzorky myšic rodu *Apodemus* (články prstů a konce ocasu) byly uchovány v 96 % etanolu při teplotě 4°C. Vzorky byly před extrakcí DNA, nastříhány sterilními nůžkami na menší části a ponechány přes noc vyschnout v mikrozkuřkách při pokojové teplotě.

Pro izolaci byl použit Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) Postupoval jsem podle příloženého návodu výrobce. Protokol o provedení izolace je v příloze (př. 1). Celkem bylo k testování primerů připraveno 23 vzorků druhů *Apodemus flavicollis* (15), *Apodemus sylvaticus* (5), *Apodemus agrarius* (3).

Pro amplifikace námi zvoleného úseku DNA (MHC-DRB class exon 2) u myšice rodu *Apodemus* jsme si zvolili forward primer JS1 a reverse primer DRB2. Tyto primery jsou uvedené v příloze (Př. 2). Tento úsek DNA má délku kolem 203 bp.

U setu primerů (JS1, DRB2) jsme namíchali reakci do 20 µl s poměrem komponentů: 25 mM MgCl₂ (2 µl), 10 mM nukleotidů (2 µl), 10x Taq Buffer (2 µl), 0,1 mM forward a reverse primerů (1 µl), ddH₂O (10,8 µl) a 5U/µl Taq polymerázy (0,2 µl) V příloze (Př. 4) je vidět nastavení cycleru pro druhý set primerů (JS1 a DRB2). Toto nastavení cycleru má delší annealing a celkový počet cyklů je vyšší než u nastavení pro set primerů použitých na rod *Myodes*.

Výsledek PCR reakcí jsme si ověřili s pomocí elektroforézy při 100 V na 1% agarózovém gelu. DNA byla pod UV světlem zvýrazněna pomocí barviva GelRedTM, pro ověření délek PCR fragmentů jsme použili 100 bp Ladder (GeneRulerTM). Agarózový gel jsme si vyrobili z 0,2 g agarózy (AGAROSE ITM) a 20 ml 1x TAE pufru. Po zahřátí a promíchání této směsi jsme do ní napipetovali 2 µl barviva GelRedu, a následně jsme celou směs vlili do formy s hřebínkem a nechali 20 min zchladnout. Poté jsme smísili PCR produkty s 6x DNA Loading Dye pufrém, nanесли je na gel a nechali elektroforézu běžet

30 minut. Gel jsme zkontrolovali pod UV světlem a PCR produkty, které měly správnou délku, jsme zamrazili.

Ještě než mohly vzorky putovat na sekvenování, provedli jsme ligaci PCR produktu do vektoru a zaklonovali je do kompetentních buněk. Celý proces jsme provedli dle protokolu výrobce, který je uveden v příloze (Př. 5). Buňky nám vytvořily na plotnách kolonie, které obsahovaly PCR produkt. Z těchto kolonií jsme odebrali vzorek špičkou mikropipety a připravili si speciální mastermix pro Colony PCR. Nastavení cycleru pro Colony PCR najdete v příloze (Př. 6). Po Colony PCR jsme znovu opakovali elektroforézu a vzorky, které měly správnou délku sekvencí, jsme přečistili pomocí enzymů (ExoI, Sap) a poslali je na sekvenaci do komerční laboratoře (Seqme).

K úpravě a zpracování sekvencí jsme použili program Geneious. Abychom si potvrdili identitu našich sekvencí, porovnali jsme je s již publikovanými sekvencemi v databázi GenBank pomocí programu BLAST, NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). K alignování sekvencí jsme v programu Geneious použili MAFT alignment (Katoh a spol., 2002). Vzhledem k nedostatku vlastních sekvencí jsme použili k porovnávání diverzity sekvence z datové banky GenBank (tyto sekvence společně s mými sekvencemi naleznete v příloze (Př. 7)). Pro fylogenetickou analýzu jsme použili metodu maximum likelihood (ML) pomocí programu PHYML (Guindon a Gascuel., 2003) s modelem Kimura 80, který byl vybrán programem Partitionfinder podle kritérií AIC a BIC. Následně jsme s tímto modelem provedli bootstrapovou analýzu s 1000 replikacemi dat. Tento set sekvencí byl poté upraven v programu Adobe Illustrator do konečné podoby fylogenetického stromu. Nakonec jsme si pro mé čtyři sekvence spočítali variabilitu s pomocí programu PAUP (Swofford, 2003).

2.2 Výsledky a diskuze

U rodu *Myodes* se nepodařilo najít správné podmínky pro amplifikaci MHC lokusu. Přestože testované primery byly již dříve použity k amplifikaci konzervovaných částí MHC class exon 2 (Babik a spol., 2009), nedosáhli jsme s nimi pozitivních výsledků v amplifikaci lokusu MHC-DRB. Zapříčiněno to může být tím, že tyto primery byly původně určeny pro metodu next generation sequencing (454) a využity v odlišných reakčních podmínkách. Primery, které jsme používali pro rod *Apodemus*, se ukázaly jako účinné, a mohly by se do budoucna používat pro amplifikování MHC. Z našich vzorků jsme získali 4 sekvence MHC-DRB class exon 2. Ty jsou označené na fylogenetickém stromě (obr. 6) červenou barvou. Další sekvence převzaté z databáze GenBank jsou označené černě. Z obrázku je

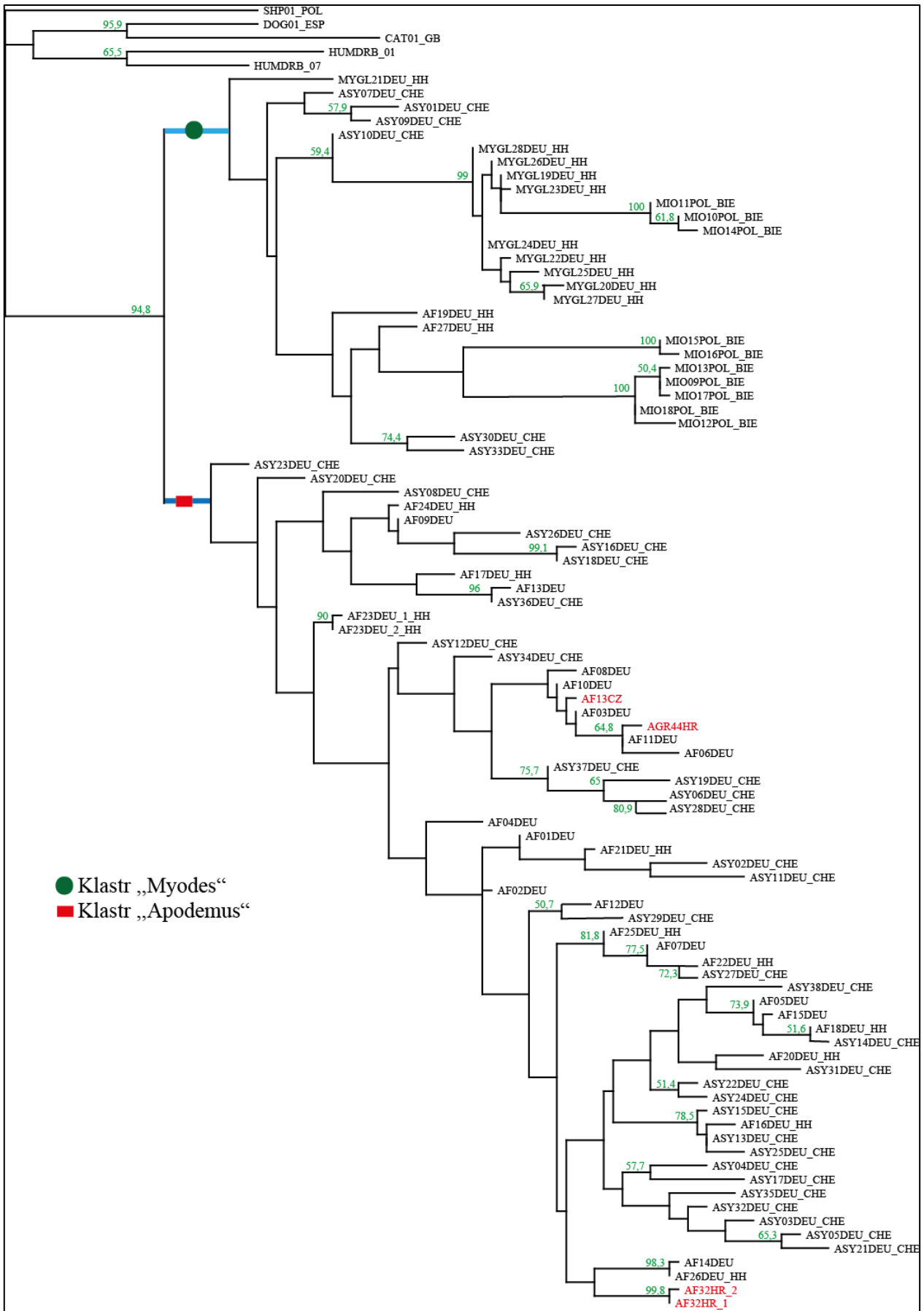
patrné, že oproti ostatním tvoří MHC geny hlodavců dobře podpořený klastř s bootstrapem téměř 95%. Ten je dále rozdělený na dva dílčí klastry, které jsou již méně spolehlivé z hlediska nízkých hodnot bootstrapů, ale mají podporu v relativně dlouhých větvích (modrá barva) fylogenetického stromu. Jeden klastř zahrnuje především rody *Myodes* a *Microtus*, přestože se u nich vyskytují některé alely z rodu *Apodemus*. To může být způsobené mezidruhovým sdílením alel, kdy jedinci různých druhů mají společné alely z doby před rozdělením jejich rodů. Druhý klastř je složen výhradně z alel jedinců rodu *Apodemus* a to konkrétně z druhů *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* a *A. agrarius*. Sekvence převzaté z databáze GenBank byly autory amplifikovány stejnými primery, jako jsme použili v této práci.

Pokud jde o výpočet diverzity u mých sekvencí, je z tabulky (Tab. 1) zřejmé, že se u nich projevuje výrazná diverzita a to v rozsahu od téměř shodných sekvencí (AF32HR_1, AF32HR_2), kde se diverzita pohybuje okolo 0,5% až po ty nejvíce diverzifikované (AF32HR_1, AGR44HR) s diverzitou kolem 12%. Genetická vzdálenost v takovémto rozsahu je tudíž dostatečná a má jasnou informativní hodnotu pro další analýzy. Detailní srovnání jednotlivých sekvencí je zobrazeno na obrázku (Obr. 7).

Z fylogenetického stromu je patrné, že velké množství dílčích klastřů se utváří podle geografického umístění populací. Avšak tento pattern může odrážet spíše taxonomickou strukturu vzorku. Při pohledu na mnou osekvenované alely je zjevné, že jejich distribuce není určena geografickou oblastí. Mé sekvence mají vysokou genetickou diverzitu MHC a můžeme si je rozdělit na dvě blízce příbuzné skupiny (1.sk: AF32HR_1, AF32HR_2; 2.sk: AGR44HR, AF13CZ). Pokud tyto dvojice srovnáme, zjistíme, že první skupina pochází ze stejné lokality i druhu (jedince), ale u druhé skupiny zaznamenáme rozdíl jak v oblasti výskytu, tak v taxonomickém zařazení. Z toho by se dalo usuzovat, že ani taxonomie, ani geografické rozšíření druhů nebudou faktorem ovlivňujícím korelaci. Vzhledem k malému množství vzorků je však třeba tuto interpretaci brát spíše jako metodickou demonstraci, než skutečný závěr podepřený daty. Z tohoto stromu jsme vycházeli i při hodnocení přítomnosti parazitů různých skupin a jejich genotypů. Konkrétně vzorky AF13CZ a AGR44 nebyly nakaženy parazitem (*Eimeria*), kdežto u vzorku, který nesl alely AF32HR_1 a AF32HR_2 byly jasné stopy parazitického zamoření. Toto porovnání bylo uskutečněno na základě poskytnutých údajů od spolupracovníka v laboratoři (MVDr. Jana Kvičarová, Ph.D.) a nebylo tudíž prováděno v rámci mé práce. Jedná se opět spíše o metodický příklad, protože počet vzorků je nedostatečný pro sestavení strukturní analýzy.

Tab. 1: Výsledky výpočtů diverzity u mnou sekvenovaných MHC alel.

	AF32HR_1	AF32HR_2	AF13CZ	AGR44HR
AF32HR_1	0.00000000			
AF32HR_2	0.00509558	0.00000000		
AF13CZ	0.11508465	0.10915711	0.00000000	
AGR44HR	0.12096707	0.11500513	0.03109254	0.00000000



Obr. 6: Fylogenetický strom sekvenovaných alel MHC a sekvenci získaných z databáze Genbank.

	10	20	30	40	50
AF321	CGCAGCGCGT	GCGGTTTCTG	GACAGATACT	TCTACAGCCG	GGAGGAGTAC
AF322
AFL13AC.A...	.T.....A...
AGR44AC.A...	.T.....T..A...
	60	70	80	90	100
AF321	GTGCGCTTCG	ACAGCGACGT	GGGCGAGTTC	CGCGCGGTGA	CCGAGCTGGG
AF322
AFL13	.C.....G...A.
AGR44	.C.....T.....
	110	120	130	140	150
AF321	TCGGGGCATA	GCCGAGAACT	TGAACAGCCA	GAAGGAGATC	CTGGAGCGTC
AF322	G.....
AFL13	G...CCGGACT...	G.....GA
AGR44	G...CCGGACT...	C.....GA
	160	170	180	190	
AF321	TGCGGGCCCA	GGTGGACACG	GTGTGCAGAC	ACAACACTACGA	GATCTTT
AF322
AFL13	A.....G.
AGR44	A.....G.C

Obr. 7: Detailní pohled na sekvence MHC (AF321=AF32HR_1; AF322=AF32HR_2; AFL13=AFL13CZ; AGR44=AGR44HR).

3 Závěr

Z této literární rešerše je zjevné, že dobře vyvinutý genetický základ MHC hraje významnou roli jak v odolnosti proti parazitům, tak při pohlavním výběru partnera. Pokud jde o imunologický význam, je role MHC klíčová pro rozpoznávání antigenních peptidů, které prezentuje T-lymfocytům. Diverzita v genetické informaci MHC je zajištěna mnoha diskutabilními faktory. Od různých typů přírodní selekce (overdominantní selekce, frekvenčně závislé selekce a sexuální selekce) až po genetický drift, který působí proti přírodní selekci. V této studii jsem se dozvěděl, že určité alely MHC mohou mít znatelné účinky na zamoření jedince parazity a zároveň, že v případě MHC alel je možné, aby zůstaly v populaci velmi dlouhou evoluční dobu. Díky tomuto zjištění lze objasnit můj výsledek u dvou alel, které jsou si velmi podobné, a při tom pocházejí z různých druhů myšic. Také jsme se zjistili, že je možné, aby dva geograficky blízcí jedinci jednoho rodu, měli silně odlišnou MHC diverzitu.

Tento systém se jeví jako vhodný pro naši studii závislosti parazitace na genetickém pozadí hostitele. Práci jsem doplnil o předběžné praktické testování metodiky a výsledky ukazují, že plánovaný experiment je proveditelný a získaná data poskytují dostatečnou variabilitu pro statistickou analýzu.

3.1 Použitá literatura

Abu-Madi, M. a, Behnke, J. M., Lewis, J. W., & Gilbert, F. S. (2000). Seasonal and site specific variation in the component community structure of intestinal helminths in *Apodemus sylvaticus* from three contrasting habitats in south-east England. *Journal of Helminthology*, 74(1), 7–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831048>.

Axtner, J., & Sommer, S. (2011). Infection , Genetics and Evolution Heligmosomoides polygyrus infection is associated with lower MHC class II gene expression in *Apodemus flavicollis*: Indication for immune suppression? *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), 2063–2071. doi:10.1016/j.meegid.2011.09.020.

Babik, W., Taberlet, P., Ejsmond, M. J., & Radwan, J. (2009). New generation sequencers as a tool for genotyping of highly polymorphic multilocus MHC system. *Molecular Ecology Resources*, 9(3), 713–9. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02622.x.

*Berke, G. (1994). The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 735–73.

Bernatchez, L., & Landry, C. (2003). MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology*, 16(3), 363–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635837>.

*Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennet, W. A. S., Strominger, J. L., & Wiley, D. C. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:512–18.

Brown, J. L., & Eklund, A. (1994). Kin Recognition and the Major Histocompatibility Complex: An Integrative Review. *The American Society of Naturalist*, 143(3), 435-461. doi: 10.1086/285612.

*Clarke, B. C. & Kirby, D. R. S. (1966). Maintenance of histocompatibility polymorphism. *Nature* 211, 999–1000. doi:10.1038/211999a0.

Doherty, P. C., & Zinkernagel, R. M. (1975). Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 256, 50-52. doi: 10.1038/256250a0.

Edwards, S. V., & Wakelandt, E. K. (1997). Ancestral Polymorphism of Mhc Class II Genes in Mice: Implications for Balancing Selection and the Mammalian Molecular Clock. *Genetics*, 164, 655-668.

Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Triebold, K. J., Koller, B., & Bloom, B. R. (1992). Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(24), 12013–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=50688&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Frank, S. A. (2002). *Immunology and Evolution of Infectious Disease*. Princeton (Velká Británie): Princeton Univ. Press 2002.

Frei, R., Steinle, J., Birchler, T., Loeliger, S., Roudit, C., Steinhoff, D., Lauener, R. P. (2010). MHC class II molecules enhance Toll-like receptor mediated innate immune responses. *PloS One*, 5(1), e8808. doi:10.1371/journal.pone.0008808.

Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696–704. doi:10.1080/10635150390235520.

Hedrick, P.W. (1994). Evolutionary Genetics of the Major Histocompatibility Complex. *The American Society of Naturalist*, 143(6), 945-964. doi: 10.1086/285643.

Huchard, E., & Pechouskova, E. (2013). The Major Histocompatibility Complex and Primate Behavioral Ecology: New Tools and Future Questions. *International Journal of Primatology*, 35(1), 11–31. doi:10.1007/s10764-013-9700-1.

Hughes, a L., & Nei, M. (1989). Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(3), 958–62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=286598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Hughes, a L., & Yeager, M. (1998). Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual Review of Genetics*, 32, 415–35. doi:10.1146/annurev.genet.32.1.415.

Jackson, J., Friberg, I. M., Bolch, L., Lowe, A., Ralli, C., Harris, P. D., ... Bradley, J. E. (2009). Immunomodulatory parasites and toll-like receptor-mediated tumour necrosis factor alpha responsiveness in wild mammals. *BMC Biology*, 7, 16. doi:10.1186/1741-7007-7-16.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–66. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=135756&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Kloch, A., Babik, W., Bajer, A., Siński, E., & Radwan, J. (2010). Effects of an MHC-DRB genotype and allele number on the load of gut parasites in the bank vole *Myodes glareolus*. *Molecular Ecology*, 19 Suppl 1, 255–65. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04476.x.

Janeway, CA. Jr., Das, G. (1999). Development of Cd8 α/α and CD8 α/β T Cells in Major Histocompatibility Complex Class I- Deficient Mice. *Journal of experimental medicine*, 190 (6), 881 – 884. doi: 0.1084/jem.190.6.881.

Miller, H. C., & Lambert, D. M. (2004). Genetic drift outweighs balancing selection in shaping post-bottleneck major histocompatibility complex variation in New Zealand robins (Petroicidae). *Molecular Ecology*, 13(12), 3709–21. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02368.x.

Nei, M., Gu, X., & Sitnikova, T. (1997). Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), 7799–806. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=33709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Pen, D. J., & Potts W. K. (1999). The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. *The American Society of Naturalist*, 153 (2), 145–164. doi: 10.1086/303166.

Penn, D. J. (2002). Major Histocompatibility Complex. *Encyclopedia of life sciences*, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing group.

*Peters, P. J., Neefjes, J. J., Oorschot, V., Ploegh, H. L., & Geuze, H. J. (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349:669–76.

Piertney, S. B., & Oliver, M. K. (2006). The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*, 96(1), 7–21. doi:10.1038/sj.hdy.6800724.

Rammensee, H. G., Falk, K., & Rötzschke, O. (1993). MHC molecules as peptide receptors. *Current Opinion in Immunology*, 5(1), 35–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8437623>.

*Rivett, A. J. (1993). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.* 291: 1–10.

Singh, S Rama. *Evolutionary Genetics: From Molecules to Morphology*. Cambridge (Velká Británie): Cambridge Univ. Press, 2000, 204 - 227. ISBN 0521571235 9780521571234.

Sommer, S. (2005). The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*, 2, 16. doi:10.1186/1742-9994-2-16.

Swofford, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Trivers, R. L. (1972). Parental investment and sexual selection. In P. Campbell (Ed.), *Sexual selection and the descent of man* (pp. 136–179). London: Heinemann.

Weenink, S. M., & Gautam, a M. (1997). Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunology and Cell Biology*, 75(1), 69–81. doi:10.1038/icb.1997.11.

Woelfing, B., Traulsen, A., Milinski, M., & Boehm, T. (2009). Does intra-individual major histocompatibility complex diversity keep a golden mean? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364, 117–128. doi:10.1098/rstb.2008.0174.

*Tato citovaná literatura nebyla dostupná, jde o sekundární citace.

3.2 Příloha

Př. 1: Izolace DNA z myšic rodu *Apodemus*.

- 1) Nastříhali jsme tkáň v hmotnostním rozsahu od 25 mg a více na malé kousky a umístili je do 1,5 ml mikrocentrifugové zkumavky. Pro hlodavčí ocasy jsme použili 1 (u krysy), nebo 2 (u myši) 0,4 až 0,6 cm dlouhé dílky. Přidali jsme 180 μ l pufru ATL a 20 μ l proteinázy K, následně jsme je zvortexovali ve vortexu (VX-200 Vortex Mixer) a inkubovali při 56°C (v AccuBlockTM Digital Dry Baths). Poté jsme je znovu zvortexovali 15 s před přikročením k dalšímu kroku.
- 2) Přenesli jsme ligát do jiné mikrocentrifugové zkumavky a přidali 200 μ l pufru AL. Ligát jsme následně vortexovali 15 s.
- 3) Přidali jsme 200 μ l etanolu (96 – 100%), zvortexovali a nechali stát, krátce jsme obsah mikrozkumavky zcentrifugovali (SpectrafugeTM 24D Digital Microcentrifuge) kvůli kapkám na víčku.
- 4) Napipetovali jsme obsah zkumavky do Dneasy Mini spin column (obsahuje membránu) a umístili do 2 ml sběrné zkumavky. Centrifugovali jsme na 8000 rpm (centrifuga musí být vždy vyvážená) po dobu 1 min. Po centrifugaci jsme vyhodili sběrnou mikrozkumavku s přefiltrovaným obsahem.
- 5) Nahradili jsme sběrnou mikrozkumavku novou a přidali do ní 500 μ l pufru AW1. Následně jsme centrifugovali 1 min. na 8000 rpm a odstranili sběrnou mikrozkumavku s přefiltrovaným obsahem.
- 6) Znovu jsme nahradili sběrnou mikrozkumavku a přidali do ní 500 μ l pufru AW2 a poté jsme centrifugovali 3 min. na 14 000 rpm. Následně jsme odstranili sběrnou mikrozkumavku s přefiltrovaným obsahem.
- 7) Přenesli jsme mikrozkumavku s membránou do nové 1,5ml nebo 2ml mikrozkumavky.

- 8) Do středu membrány jsme napipetovali 200 µl pufru AE a inkubovali 1 min při pokojové teplotě a následně jsme ji centrifugovali 1 min na 8000 rpm. V dolní sběrné mikrozkuhavce jsme získali izolovanou DNA. Pro zvýšení produktu můžeme tento krok opakovat.

Př. 2: Seznam použitých primerů.

Sety primerů	Sekvence forv. primeru	Sekvence reverse primeru	Publikace
MgDRBL/MgDRBR	5'GACAGAKACWTCTA CAAYCRG3'	5'- TAGTTGTRTCTGCCAGWA YGYGTCC-3'	Babik a spol., 2009
JS1/DRB2	GAGTGTCATTTCTACA ACGGGACG	CTCTCCGCGGCACAAAGG AA	Schad a spol., 2004/ Smulders a spol., 2003

Př. 3: PCR cyklus pro set primerů (MgDRBL a MgDRBR).

Část cyklu	teplota	čas	počet cyklů
1. Denaturace	95°C	3 min	30
2. Denaturace	94°C	1 min	
3. Annealing	48°C	45 s	
4. Elongace	72°C	30 s	
5. Extenze	72°C	10 min	
6. Chlazení	4°C		

Př. 4: PCR cyklus pro set primerů (JS1 a DRB2).

Část cyklu	teplota	čas	počet cyklů
1. Denaturace	95°C	3 min	35
2. Denaturace	94°C	1 min	
3. Annealing	48°C	1 min	
4. Elongace	72°C	30 s	
5. Extenze	72°C	10 min	
6. Chlazení	4°C		

Př. 5: Ligace PCR produktu do vektoru a zaklonovávání do kompetentních buněk.

- 1) Zaligovali jsme PCR produkt do vektoru.
- 2) Pro každý vzorek jsme si připravili roztok složený z: 50 ng/μl pGEM® - T Easy (0,5 μl) 2x Rapid Ligation Buffer (2,5 μl) a 3U/μl T4 DNA Ligase (0,5 μl).
- 3) Do roztoku jsme napipetovali 1,5 μl mého PCR produktu. Stočili jsme vzorky v centrifuze a nechali je ligovat přes noc v lednici.
- 4) Další den jsme si nechali na ledě roztát chemicky kompetentní buňky (Subcloning EfficiencyTM DH5αTM) a přepipetovali jsme z nich 25 μl pro každý vzorek.
- 5) Přidali jsme k nim 2,5 μl ligace a nechali je 20 min na ledu.
- 6) Buňky jsme transformovali přesně 50 s v přístroji AccuBlockTM.
- 7) Přidali jsme 125 μl SOC předehřátého na 37°C a nechali jsme buňky 1,5 hodiny v rotační skříňové třepačce (Gallenkamp).
- 8) Plotny pro bakterie jsme si připravili den předem z 5 g agaru (Agar Bacteriological), 6,25 g LB (Broth, Miller) a 250 ml H₂O.
- 9) Takto připravené ploty jsme si dali předehřát do termostatu, než jsme na ně ve flowboxu začali nanášet X-Gal (40 μl).
- 10) Na každou popsanou plotnu jsme vyseli 80 μl transformovaných buněk. Před každým výsevem jsme sterilizovali „hokejku“ a nechali ji zchladnout.
- 11) Plotny jsme nechali přes noc v termostatu na 37°C.

Př. 6: Nastavení cycleru pro program Colony PCR.

teplota	čas	cykly
95°C	3 min	
94°C	1 min	35
50°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	

Př. 7: Použité sekvence MHC pro ML analýzu.

<i>druh</i>	<i>zkratka</i>	<i>země</i>	<i>lokalita</i>	<i>číslo z genové banky</i>
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF32HR_1	Chorvatsko	Sunja	
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF32HR_2	Chorvatsko	Sunja	
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF13CZ	Česká republika	Ejpvovice	
<i>Apodemus agrarius</i>	AGR44HR	Chorvatsko	Jamarica	
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF01DEU	Německo	severní Německo	AY699757.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF02DEU	Německo	severní Německo	AY699758.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF03DEU	Německo	severní Německo	AY699759.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF04DEU	Německo	severní Německo	AY699760.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF05DEU	Německo	severní Německo	AY699761.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF06DEU	Německo	severní Německo	AY699762.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF07DEU	Německo	severní Německo	AY699763.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF08DEU	Německo	severní Německo	AY699764.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF09DEU	Německo	severní Německo	AY699765.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF10DEU	Německo	severní Německo	AY699766.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF11DEU	Německo	severní Německo	AY699767.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF12DEU	Německo	severní Německo	AY699768.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF13DEU	Německo	severní Německo	AY699769.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF14DEU	Německo	severní Německo	AY699770.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF15DEU	Německo	severní Německo	AY699771.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF16DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918078.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF17DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918079.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF18DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918080.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF19DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918081.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF20DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918082.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF21DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918083.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF22DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918084.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF23DEU_1_HH	Německo	Hamburg	AY918085.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF23DEU_2_HH	Německo	Hamburg	AY918086.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF24DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918087.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF25DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918088.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF26DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918089.1
<i>Apodemus flavicollis</i>	AF27DEU_HH	Německo	Hamburg	AY918090.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY01DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699719.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY02DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699720.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY03DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699721.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY04DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699722.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY05DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699723.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY06DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699724.1

<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY07DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699725.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY08DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699726.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY09DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699727.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY10DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699728.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY11DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699729.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY12DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699730.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY13DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699731.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY14DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699732.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY15DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699733.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY16DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699734.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY17DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699735.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY18DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699736.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY19DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699737.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY20DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699738.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY21DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699739.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY22DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699740.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY23DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699741.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY24DEUCHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699742.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY25DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699743.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY26DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699744.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY27DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699745.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY28DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699746.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY29DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699747.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY30DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699748.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY31DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699749.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY32DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699750.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY33DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699751.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY34DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699752.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY35DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699753.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY36DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699754.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY37DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699755.1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	ASY38DEU_CHE	Německo - Chorvatsko	nespecifikovaná	AY699756.1
<i>Myodes glareolus</i>	MYGL20DEU_HH	Německo	Hamburg	EF434808.1
<i>Myodes glareolus</i>	MYGL21DEU_HH	Německo	Hamburg	EF434809.1
<i>Myodes glareolus</i>	MYGL22DEU_HH	Německo	Hamburg	EF434810.1
<i>Myodes glareolus</i>	MYGL23DEU_HH	Německo	Hamburg	EF434811.1
<i>Myodes glareolus</i>	MYGL24DEU_HH	Německo	Hamburg	EF434812.1
<i>Myodes glareolus</i>	MYGL25DEU_HH	Německo	Hamburg	EF434813.1
<i>Myodes glareolus</i>	MYGL26DEU_HH	Německo	Hamburg	EF434814.1
<i>Myodes glareolus</i>	MYGL27DEU_HH	Německo	Hamburg	EF434815.1
<i>Myodes glareolus</i>	MYGL28DEU_HH	Německo	Hamburg	EF434816.1
<i>Microtus oeconomus</i>	MIO09POL_BIE	Polsko	NP Biebrza	349499584.1
<i>Microtus oeconomus</i>	MIO10POL_BIE	Polsko	NP Biebrza	394499586.1

<i>Microtus oeconomus</i>	MIO11POL_BIE	Polsko	NP Biebrza	349499588.1
<i>Microtus oeconomus</i>	MIO12POL_BIE	Polsko	NP Biebrza	349499590.1
<i>Microtus oeconomus</i>	MIO13POL_BIE	Polsko	NP Biebrza	349499592.1
<i>Microtus oeconomus</i>	MIO14POL_BIE	Polsko	NP Biebrza	349499594.1
<i>Microtus oeconomus</i>	MIO15POL_BIE	Polsko	NP Biebrza	349499596.1
<i>Microtus oeconomus</i>	MIO16POL_BIE	Polsko	NP Biebrza	349499598.1
<i>Microtus oeconomus</i>	MIO17POL_BIE	Polsko	NP Biebrza	349499600.1
<i>Microtus oeconomus</i>	MIO18POL_BIE	Polsko	NP Biebrza	349499602.1
<i>Felis catus</i>	CAT01_GB	Velká Británie	-	20975604
<i>Canis familiaris</i>	DOG01_ESP	Španělsko	-	2394265
<i>Homo sapiens</i>	HUMDRB_01	-	-	15144263
<i>Homo sapiens</i>	HUMDRB_07	-	-	181818
<i>Ovis aries</i>	SHP01_POL	Polsko	-	30691330