

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIA TEADUSKOND
ZOOLOOGIA JA HÜDROBIOLOOGIA INSTITUUT
LOOMAÖKOLOOGIA ÕPPETOOL

ELISE SONN

**ROHEVINDI PEAMISE KOESOBIVUSKOMPLEKSI
VARIEERUVUSE SEOS KOKTSIDIOOSIRESISTENTSUSE
JA SULESTIKU VÄRVUSEGA**

Magistritöö

Juhendaja: Peeter Hõrak, Ph.D.

TARTU 2007

TÖÖS KASUTATUD MÕISTED JA LÜHENDID

aa - aminohape

Alleel - sama liigi erinevatel indiviididel esinevad ühe geeni erinevad vormid

bp – aluspaar (*base pair*)

EDTA – etüleendiamiintetraädikhape

HLA – human leukocyte antigen, inimese peamine koesobivuskompleks

Kongeenne - erinev vaid ühes lookuses

Lookus (mitmuses lookused) - geeni, DNA järjestuse või geneetilise markeri spetsiifiline asukoht kromosoomil

MHC – *major histocompatibility complex*, peamine koesobivuskompleks. MHC, mida inimeste puhul nimetatakse HLA ja hiirtel H-2, on mitmealleelne geenikompleks, mis kodeerib pinnamolekule, mis on hõlmatud immuunvastuse mitmetes aspektides.

TAE – Tris-atsetaat-EDTA puhver

Tris – trishüdroksümetüülaminometaan

Sisukord

1. SISSEJUHATUS	5
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE: MHC JA NAKKUSRESISTENTSUS	7
2.1 Immuunsüsteem	7
2.2 MHC geneetika	9
2.3 MHC ja parasiidi interaktsioon.....	12
2.4 Milline valik toimub MHC geenide suhtes?	12
2.4 MHC ja paarilise valik metsikutel lindudel	14
3. MATERJAL JA METOODIKA.....	16
3.1 Katseobjektid	16
3.2 Üldandmed ja andmetöötlus	18
3.3 Katse ajakava ja andmete kogumine.....	19
3.4 Ravi	19
3.5 Taasnakatamine ja nakkusresistentsuse mõõtmine	19
3.6 Sule värvi mõõtmine	20
3.7 DNA eraldamine	21
3.8 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	21
3.9 PCR produktide kontroll ja visualiseerimine	22
3.10 Amplifitseeritud fragmentide eraldamine DGGE meetodil.....	22

4. TULEMUSED	24
5. ARUTELU	29
KOKKUVÕTE	32
SUMMARY	33
TÄNUAVALDUSED	34
LISA 1. DIGITAALSELT TÖÖTLEMATA DGGE PILT.	35
KASUTATUD KIRJANDUS	36

1. Sissejuhatus

Hamiltoni ja Zuki (Hamilton & Zuk, 1982) idee, et isendi ornamenteerituse tase peegeldab tema vastupanuvõimet parasiitidele, pani aluse parasiitide poolt vahendatud sugulise valiku hüpoteesile. Selle kohaselt suudaksid immuunvõimelisemad ja/või paremas tervislikus seisundis isased paigutada enam ressursse sugulisse signaliseerimisse ja oleksid enam ornamenteeritud. Emastel tasuks sel juhul eelistada ornamenteeritumaid isaseid, kes oleksid enam võimelised investeerima sigimisse ja/või oleksid väiksema tõenäosusega mõne nakkuse kandjad. Eeldusel, et immuunokompetents on päritav, tagaksid emased sel viisil ka kõrge immuunokompetentsi oma järglastele (Stearns & Hoekstra, 2005; ülevaade: Andersson 1994).

Peamine koesobivuskompleks (MHC) on oma funktsiooni(de) tõttu äärmiselt oluline ning seda peetakse adaptiivse immuunsuse keskmeks (Trowsdale, 1995; Edwards et al., 1999; Hess & Edwards 2002). MHC variandid mõjutavad paljusid olulisi bioloogilisi tunnuseid, sealhulgas immuunset äratundmist (*immune recognition*), vastuvõtlikkust nakkus- ja autoimmuunhaigustele, individuaalset lõhna, paaritumiseelistusi, sugulaste äratundmist, koostööd ja raseduse kulgu (nt Sommer, 2005). Inimesel on malaariaresistentsusega seosed MHC heterosügootsusega ning eri haplotüüpidega (Hill et al., 1991).

Kodulindudel, peamiselt kanadel on uuritud nakkusresistentsuse geneetilisi põhjusi kongeensete isendite näitel ja peamiselt MHC klass II suhtes (näit. Burgess et al., 2001; Bacon et al., 2004). Raskusi valmistab ilmselt asjaolu, et kanadel ei ole täpselt kindlaks määratud MHC geenide regionaalsus genoomis (Lakshmanan et al., 1997), st geene ja funktsioone ei ole suudetud üheselt seostada (Ewald & Livant 2004; Miller et al., 2004). Küll on aga teada, et immuunvastus koktsiididele (soolestikus parasiteerivad eosloomad) on rakuline ja peamiselt seotud CD⁸⁺ rakkudega (Allen & Fetterer 2002); (Lillehoj & Trout 1994a; Swinkels et al., 2007, jt), mis võiks anda alust arvata, et tegu on MHC klass I geenidega seotud immuunvastusega.

Eri liikidel on MHC geneetiline struktuur erinev, eriti võrreldes värvuliste ja kanaliste MHCd (Westerdahl et al., 1999; Hess et al., 2000; Kaufman, 2000; Westerdahl et al., 2000; Hess & Edwards 2002; Shiina et al., 2004; Shiina et al., 2006, Miller et al.,

2004). Omavahel erinevad ka eri värvuliste peamise koosobivuskompleksi geenide struktuurid lookuste ja alleelide arvu poolest (vt nt Bonneaud et al., 2004).

Mulle teadaolevalt ei ole seni ilmunud ühtki uurimistööd, kus oleks kirjeldatud metsikute lindude koktsidioosinakkuse seoseid peamise koosobivuskompleksi geenide mitmekesisusega, või näidatud sellise seose olemasolu, eriti peamise koosobivuskompleksi klass I geenidega; küll on mõnevõrra uuritud resistentsust vereparasiitidele (Bonneaud et al., 2006; Westerdahl et al., 2005). Samuti puuduvad tööd metsikute lindudega, mis käsitleksid eksperimentaalset nakkust, st ei ole olnud võimalik kontrollida, kas ekspositsioon parasiitidele on lindude vahel olnud võrdväärne – ei ole teada, kas isend ei nakatunud või ta ei nakatukski, sõltuvalt ekspositsioonist ja geneetikast.

Eelnimetatud töödes on leitud, et on allelele, mis võiksid suure tõenäosusega kanda resistentsust; kuid täpsed seosed on jäänud välja selgitamata – mõlemad on jäänud oletuste tasemele, et resistentsust mõjutab alleelide arv. Hõraku töörühm püstitas rohevindi-koktsidioosi mudeli uurimise käigus hüpoteesi, et peremehe vastupanuvõime koktsiididele võiks olla geneetiliselt määratud: kui looduslikult madalama ja kõrgema nakkusintensiivsusega linnud nakatatakse samade tüvedega, siis peaks viimaste nakkuse intensiivsus olema suurem. Nimetatud hüpotees leidis eksperimentide käigus tõestust, ning seega on alust eeldada, et rohevintidel on geneetiliselt determineeritud resistentsus koktsiidinakkusele. (Hõrak et al., 2006a). Ka on leitud, et sulestiku värvus võiks peegeldada linnu immuunvõimet (eredamalt värvunud lindudel on leitud olevat tugevam humoraalne immuunvastus uudsele antigeenile (Saks, 2002; 2004).

Et eelpool toodusse selgust tuua, seati käesoleva töö eesmärkideks:

1. Selgitada, kas rohevindi peamise koosobivuskompleksi alleelid on seotud resistentsusega koktsiidinakkusele,
2. Selgitada, kas rohevindi peamisel koosobivuskompleksil on seos konditsioonist sõltuvate indikaatortunnustega (sulestiku värvuse karotenoidsed komponendid).

2. Kirjanduse ülevaade: MHC ja nakkusresistentsus

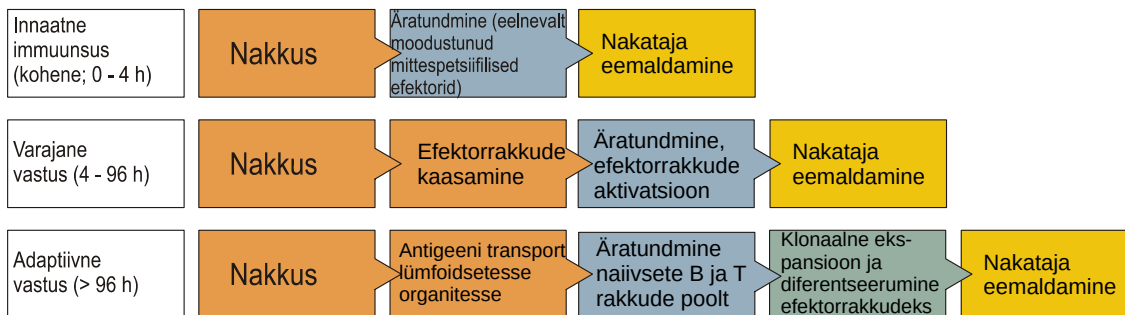
2.1 Immuunsüsteem

Immuunsüsteem koosneb mitmetest komponentidest, mis kaitsevad organismi nakkuste eest patogeeni ära tundes ja hävitades (tabel 1, joonised 1 ja 2). Immunsüsteem suudab ära tunda eri patogeene viirustest hulkraksete parasiitideni. Äratundmine on keerukas, kuna patogeenid kohanevad ja evolutsioneeruvad.

Patogeenide äratundmiseks ja kahjutustamiseks on välja arenenud mitmed mehhanismid. Isegi lihtsad ainuraksed, nagu bakterid omavad ensüümide süsteeme, mis kaitsevad neid viirusnakkuste eest. Teised põhilised mehhanismid arenesid eukarüootides ning on püsima jäänud taimedel, kaladel, roomajatel ja putukatel. Need hõlmavad antimikroobseid peptiide, mida nimetatakse defensiinideks ja komplemendi süsteemiks. Keerukamad mehhanismid on siiski üsna hiljuti arenenud – samaaegselt selgroogsete evolutsiooniga.

Tabel 1. Immuunsüsteemi komponendid

Kaasasündinud immuunsüsteem	Omandatud immuunsüsteem
Mittespetsiifiline vastus	Patogeeni ja antigeeni spetsiifiline vastus
Eksponeerimine viib kohese maksimaalse vastuseni	Eksponeerimisele järgneb viivitusega maksimaalne vastus
Rakuliselt vahendatud ja humoraalsed komponendid	Rakuliselt vahendatud ja humoraalsed komponendid
Immunoloogiline mälu puudub	Eksponeerimine viib immunoloogilise mälu tekkeni
Esineb peaaegu kõikidel eluvormidel	On leitud vaid lõugsuustel (<i>jawed vertebrates, Gnathostomata</i>)



Joonis 1. Immuunvastus toimub kolmes faasis

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=imm.figgrp.149> , Janeway et al., 2004)

Retseptori omadused	Innaatne	Adaptiivne
Pärandatav spetsiifilisus	Jah	Ei
Ekspressseeritud kõigil teatud tüüpi rakkudel (nt makrofaagid)	Jah	Ei
Vallandub kohene vastus	Jah	Ei
Paljude patogeeniklasside äratundmine	Jah	Ei
Paljude geenide poolt kodeeritud	Ei	Jah
Vajavad geenide ümberkorraldust	Ei	Jah
Klonaalne jaotus	Ei	Jah
Paljude erinevate molekulaarsete struktuuride äratundmine	Ei	Jah

Joonis 2. Kaasasündinud ja omandatud immuunsüsteemi erinevused

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=imm.figgrp.194>, Janeway et al., 2004).

Omandatud immuunsüsteemi võib jagada kaheks:

- 1) antikehade poolt vahendatud e. humoraalne,
- 2) T-rakkude poolt vahendatud e. rakuline.

T-rakud on spetsialiseerunud tundmaks ära võõrantigene. Antikehad suudavad ära tunda vaba antigeeni, T-lümfotsüüdid seda ei suuda. Selleks peab antigeen olema seotud teise raku pinnal oleva MHC molekuliga. Molekulid, mis esitlevad peptiidseid

antigeene T-rakkudele, on membraansed glükoproteiinid, mida kodeerivad peamise koesobivuskompleksi klastri geenid. (ülevaade: Janeway et al., 2004).

Kui tsütotoksilised T-lümfotsüüdid leiavad organismist raku, mille pinnal on MHC I koos antigeeniga, mida tunneb ära vastav T-rakk, siis kutsuvad tsütotoksilised T-lümfotsüüdid esile oma märklaudraku surma. Niimoodi võetakse viiruselt võimalus organismis paljuneda. MHC I valk on olemas kõigi keharakkude pinnal. Seepärast võivad tsütotoksilised T-lümfotsüüdid tunda ära organismi kõiki nakatunud rakke.

T-lümfotsüüdi retseptor ei tunne antigeeni-koesobivusantigeeni kompleksi ära üksi. Püsiva ühenduse saamiseks T-lümfotsüüdi ja antigeeni esitleva raku või T-lümfotsüüdi ja märklaudraku vahel on vajalikud veel mitu raku pinna lisavalku. Näiteks on vaja MHC I kompleksi äratundmiseks valku CD8 ja MHC II kompleksi äratundmiseks valku CD4.

2.2 MHC geneetika

MHC jagatakse kolme põhilisse klassi – klass I geenid kodeerivad pinnamolekule kõigil keharakkudel, klass II geenid kodeerivad molekule, mida leidub peamiselt immuunsüsteemi kuuluvatel rakkudel, klass III geenid kodeerivad seerumivalke ja komplemendi komponente (Golub & Green, 1991).

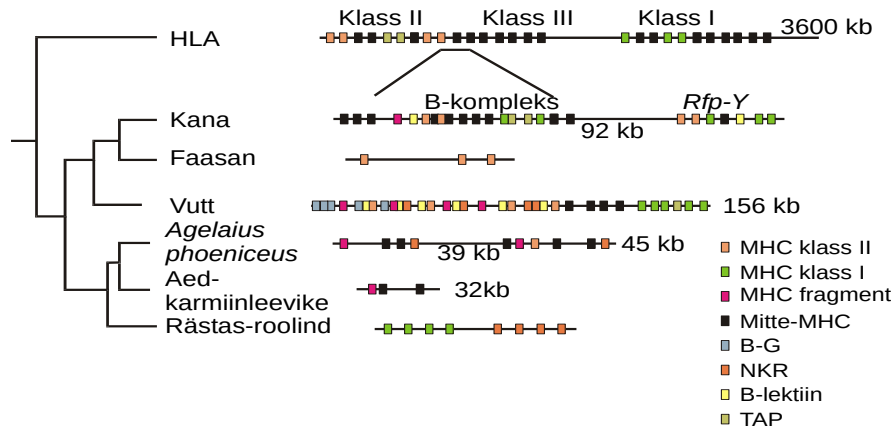
HLA geenid kodeerivad kolme erinevat klassi valke:

1) Klassi I kuuluvad HLA geenid kodeerivad transplantatsiooni antigeene (inglise k. *transplantation antigens*). Nimetus tuleneb sellest, et just need valgud vastutavad transplanteeritud kudede tagasitõrjumise eest. Neid nimetatakse ka MHC klass I valkudeks. Need valgud on oma olemuselt glükoproteiinid, mis on ankurdunud rakumembraanile, nii et antigeenne determinant ulatub rakust välja. Transplantatsiooniantigeenid esinevad praktiliselt kõigil rakkudel ning aitavad killer-rakkudel (tapjad T rakud) eristada võõraid rakke omadest. Sellesse klassi kuuluvad valgud võivad seonduda küllaltki erinevate antigeenidega teiste rakkude pinnal ja esitleda võõraid antigeene eksponeerivaid rakke killeritele ehk tapjarakkudele.

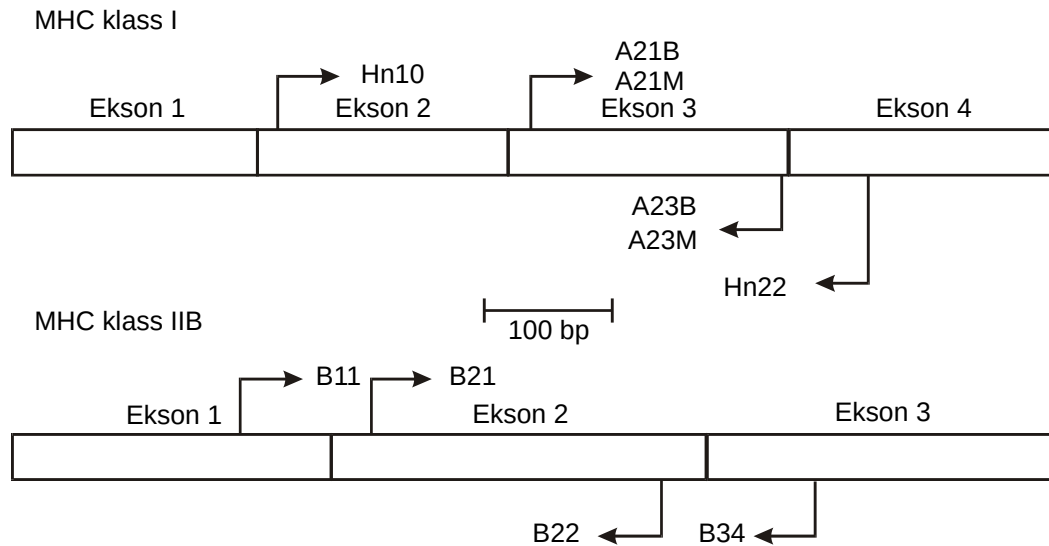
2) Klassi II kuuluvad HLA geenid kodeerivad valke, mis asuvad peamiselt B lümfotsüütide ja makrofaagide pinnal (need on rakud, mis interakteeruvad helper T rakkudega). Need on heterodimeersed valgud, mis koosnevad kahest polüpeptiidist. Polüpeptiidide polümorfseid N-terminaalsed domeenid rakupinnal moodustavad vao, kuhu võib seonduda lai valik erinevaid antigeene.

3) Klassi III kuuluvad HLA geenid kodeerivad komplement-valke (complement proteins), mis interakteeruvad antikeha-antigeen kompleksidega ning aitavad neid proteolüütiliselt degradeerida. Komplement-valgud tapavad ka võõra bioloogilise materjaliga nakatunud rakke, lõhkudes nende membraane.

MHC on bioloogias polümorfsemaid süsteeme. See koosneb mitmetest geenidest, ning igal geenil on mitu alleeli; ka on ta mitmelookuseline (joonis 3). HLA lookuse geenide polümorfism on väga suur, mis väljendub selles, et mõnel geenil on kirjeldatud kuni sada või enam alleeli (Marsh et al., 2004 seisuga; 349 HLA A alleeli, 627 HLA B alleeli, 182 HLA C alleeli (kokku on inimesel kuue lookuse kohta kokku 1180 klass I alleeli nimetatud).

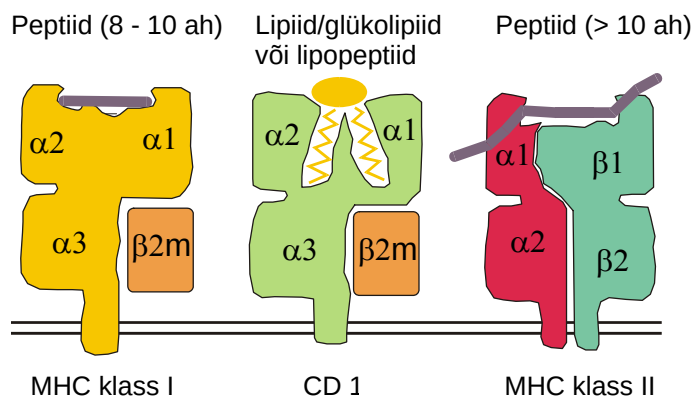


Joonis 3. MHC geneetilise struktuuri võrdlus inimesel ja lindudel. HLA on palju suurem (3600 kb) kui kana vastav genoomipiirkond (92 kb). HLA puhul tähistab iga ruuduke mitmeid geene. Faasani ja rästas-roolinnu MHC suurus ja orientatsioon genoomsel tasemel on praegu veel teadmata (NKR – natural killer receptor, TAP – tapasiin)(Hess & Edwards 2002).



Joonis 4. Koduvarblase (*Passer domesticus*) MHC arvatav geneetiline struktuur. Märgitud on ka geenide uurimisel kasutatud praimerite seondumispositsioonid. (Bonneaud et al., 2004)

Peptiidi-siduvad-piirkonnad on MHC I puhul ekson 3 (ekson 3 kodeerib $\alpha 2$ domeeni, mis on põhiline peptiidi siduv sait MHC I molekulis) ja MHC II puhul ekson 2 (ekson 2 kodeerib $\beta 1$ domeeni, mis on MHC klass II molekuli varieeruvaim osa) (joonised 4 ja 5). (Westerdahl et al., 1999) On näidatud, et polümorfismid on klasterdunud (kontsentreerunud) peptiidi-siduvasse-regiooni (Bonneaud et al., 2004).



Joonis 5. MHC valkude domeenne koosseis ja peptiidisiduvad piirkonnad (Porcelli, 2005).

2.3 MHC ja parasiidi interaktsioon

Niinimetatud „Red Queen” hüpoteesi järgi on evolutsiooniline võidurelvastumine lakkamatu, valdav ja paratamatu. Elusloodus on pidevas muutumises ja niinimetatud ökoloogiline tasakaal on põhimõtteliselt ebapüsiv, dünaamiline, ja vaadeldav vaid evolutsiooniliselt lühikese ajavahemiku jooksul. Parasiidid ja nende peremehed koevolutsioneeruvad, parima kohasusega genotüüp võib seega põlvkonniti ostsilleeruda, luues varieeruvuse resistentsusega seotud tunnustel.

Hedrick (2002) näitab, et sagedusest sõltuv valik (milline sageli peremehe ja parasiidi interaktsioonide puhul toimib), on võimalik MHC alleelide varieeruvuse säilitaja. Ta näitab ka, et patogeeni resistentsuse ajaline variatsioon (mis võiks tuleneda näiteks patogeeni ajalisest/ruumilisest varieeruvusest ja nende tüvede erinevast virulentsusest (vt nt Bensch & Akesson, 2003) võib iseenesest (ilma valikusõltuvuse või heterosügootsuse eeliseta) olla polümorfismi säilitavaks mehhanismiks.

Westerdahl ja kaastöölised (Westerdahl et al., 2004) oletavad, et tulenevalt rändlindude eri elupaikadest aasta jooksul, kus ilmselt avaldavad patogeenid erinevat valikusurvet, võiks rändlindudel olla kas kõrgem MHC polümorfism või suurem hulk MHC geene kui paigalistel lindudel.

Hõraku ja kaastööliste (Hõrak et al., 2006a) poolt läbi viidud eksperiment kinnitab infektsiooni sõltuvust peremehe resistentsusest, parasiidi virulentsusest ja nende koosmõjust. Loodusliku nakkuse intensiivsus peegeldab isendi võimet uudsetele tüvedele vastu panna ning et immuunsus ei teki tingimata kõigi parasiidi tüvede vastu.

2.4 Milline valik toimub MHC geenide suhtes?

Peremees-parasiidi interaktsioonide puhul toimib sageli negatiivne sagedusest sõltuv valik, (vt Bernatchez & Landry 2003). MHC polümorfismi ebaharilikult kõrge taseme säilitamisel võivad rakenduda kaks mehhanismi: haigusel põhinev ja reproduktiivne. Haigusel põhinevad mudelid eeldavad, et MHC geneetiline mitmekesisus

säilitatakse patogeeni ja peremehe koevolutsioonist tulenevast tasakaalustavast valikust. Selliseid mudeleid on kaht põhilist tüüpi.

Esimene haigusel põhinev mudel, mis arvestas MHC funktsiooni, oli üledominantsuse hüpotees (või heterosügoodi eelis). Doherty ja Zinkernagel (1975) arutlesid, et populatsioonis, mida eksponeeritakse reale patogeenidele, eelistatakse heterosügootseid indiviide, kuna nad on võimelised esitlema suuremal hulgal antigeene ja seega võimelised vastu panema enamatele patogeenidele kui homosügootid.

Teine mehhanism, mis seletab MHC polümorfismi, on negatiivne sagedusest sõltuva valiku hüpotees (haruldase alleeli eelis), mida esmalt pakkusid Clarke ja Kirby (1966). See mudel paneb ette, et parasiidi antigeensust valitakse, kasutamaks ära MHC-põhist peremehe levinuima genotüübi immuunvastuse defekti. See vähendaks tavalisema peremehe genotüübi suhtelist kohasust ja annaks uutele, haruldasematele MHC alleelidele selektiivse eelise. Sellistele antagonistlikele koevolutsioonilistele vastustele omane ajaline viivitus võiks viia eri genotüüpide kohasuse väärtuste tsüklilisele kõikumisele nii peremeestes kui patogeenides ning annaks tulemuseks kõrge geneetilise mitmekesisuse säilitamise.

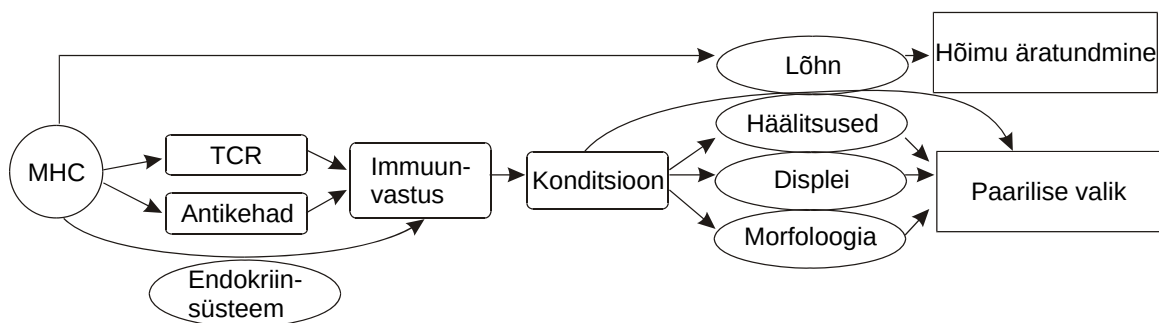
Teine tüüp mehhanisme seostub sugulise valiku geneetiliste eelistega. Hetkel on kaks peamist teooriat seletamaks MHC polümorfismi soosivate reproduktiivsete mehhanismide arengut (Penn et al., 2002). Esiteks, haigusel põhinev kohasuse erinevus eri MHC genotüüpide vahel soosib reproduktiivseid mehhanisme, mis eelistatult annavad järglastele kõrge kohasusega genotüübi. MHC-st sõltuvad paaritumiseelistused võivad võimendada parasiidiresistentsust kahel viisil.

Esiteks, MHC-disassortatiivne paaritumiseelistus (disassortatiivne suguline valik on valikuvorm, milles üks sugu valib teist nii, et järglane saab kasu vanemate genotüüpide erinevustest) võiks vanemate kohasust suurendada, kuna ebaproportsionaalselt suur hulk järglasi oleksid kõrge kohasusega MHC heterosügootid.

Teiseks, paaritumiseelistused võiksid potentsiaalselt anda tulemuseks mehhanismi, mis võimaldaks olla edukas molekulaarses võidurelvastumises koevolutsioonis parasiitidega, millist stenaariumi on nimetatud “liikuva sihtmärgi” hüpoteesiks (Penn & Potts, 1999).

Teine mudel, mis seostab MHC polümorfismi säilitamise reproduktiivsete mehhanismidega, on inbriidingu vältimise hüpotees (Potts & Wakeland, 1990), mis eeldab, et MHC-põhine valikuline paaritumine sarnaneb teistele geneetilise ühildumatuse süsteemidele, mille funktsiooniks on inbriidingu vähendamine (näiteks taimede ühildumatuse süsteem). Kuna MHC alleelid on sageli kõrgelt polümorfsed, siis on samade MHC alleelidega indiviidid tõenäoliselt sugulased. MHC alleelid mõjutavad ka eriomaseid lõhnu (Penn, 2002) ja võivad seega olla potentsiaalseks sugulusmarkeriks. Seega võib MHC-disassortatiivne paaritumiseelistus ära hoida suguluspaaritumist ja inbriidingu negatiivseid tagajärgi, nagu retessiivsete kahjulike mutatsioonide ekspressioon. See hüpotees ennustab seega, et MHC-sõltuvat paaritumiseelistust peaksid eelkõige soosima inbriidingust ohustatud liigid (Jordan & Bruford, 1998).

2.4 MHC ja paarilise valik metsikutel lindudel



Joonis 6. Peamise koosobivuskompleksi ja konditsiooni, paarilise valiku ning hõimu (sugulaste) äratundmise vahelised põhilised seosed. MHC geenide seos T-rakkude repertuaari ja humoraalse immuunvastuse moduleerimisel on ära toodud vasakul. Arvatavasti mõjutab MHC paarilise valikut peamiselt konditsioonist sõltuvate tunnuste kaudu, kuid hõimu (sugulaste) äratundmist haistmise või muid mehhanisme kasutades. (Zelano & Edwards 2002)

Zelano ja Edwards (2002) arutlevad MHC funktsioonide üle lindudes põhjalikult, kuid seni on kahjuks väga vähe tõestusi ja näiteid töötavate mehhanismide kohta. Peamiselt on uurimisobjektiks olnud kodulinnud. Raskendavaks on siinjuures muidugi

kindlasti asjaolu, et MHC geenide piirkonnas on rekombinatsioonide sagedus ja geenide aheldatus suur, mis muudavad geenide uurimise raskeks; ka on eri liikidel geenide organisatsioon ja lookuste hulk erinevad (vt nt Ekblom 2004), lisaks on leitud värvulistel olevat ka pseudogeene (Garrigan & Edwards 1999; Edwards et al., 2000; Gasper et al., 2001). Värvulistel asuvad MHC geenid eri lookustes, ning senini ei ole teada nende täpset asukohta kromosoomi(de)l (Westerdahl et al., 1999; Westerdahl et al., 2000; Bonneaud et al., 2004); kanal asuvad MHC geenid ja nendega seotud geenid 16. mikrokromosoomil (Wain et al., 1998).

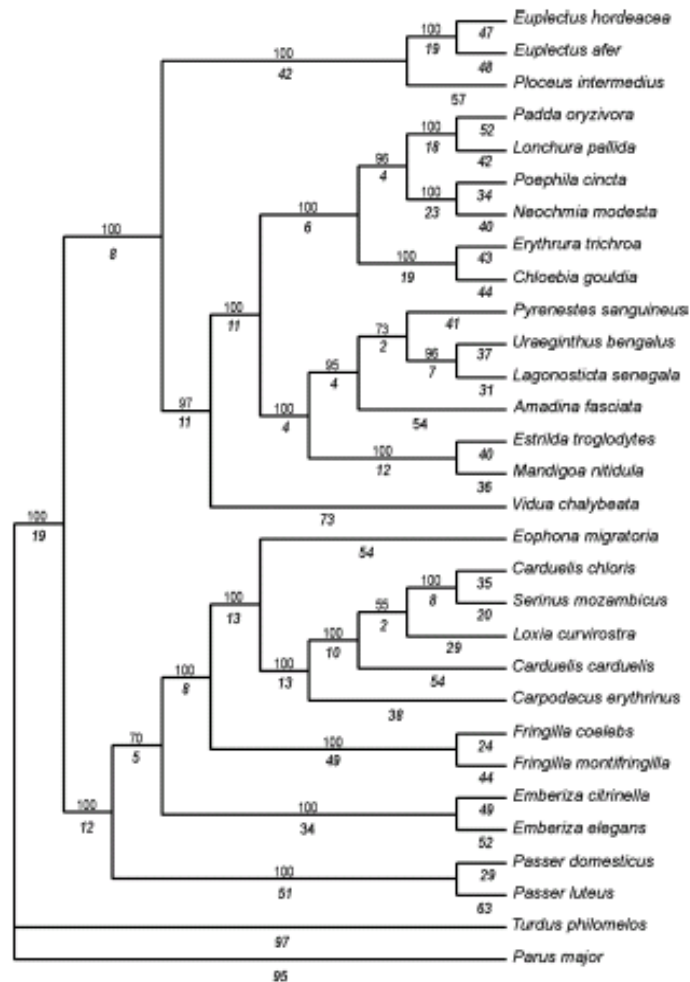
Roolinnu *Acrocephalus sechellensis* puhul näidati, et MHC klass I kolmanda eksoni varieeruvus ei mõjutanud paarilise valikut, ning et disassortatiivne valik puudus täiesti. Paarivälist isadust esines juhul, kui nõ välisisase MHC variatsioon oli oluliselt kõrgem paarilise omast. Viimane võib anda kaudset kasu järglastele, kui elumus on seotud MHC mitmekesisusega. (Richardson et al., 2005). Rohunepi *Gallinago media* emastel ei ole täheldatud MHC IIB varieeruvuse põhist paaritumiseelistust, kuid teatud alleeli kandvaid isaseid valiti sagedamini (Ekblom, 2004).

3. Materjal ja metoodika

3.1 Katseobjektid

Rohevindid (*Carduelis chloris*) on taimtoidulised, keskmise suurusega (massiga ca 28-30 g) värvuliste seltsi (*Passeriformes*) kuuluvad linnud, kes on laialt levinud kogu Euroopas, Loode-Aafrikas ja Edela-Aasias ning on inimese poolt viidud ka Austraaliasse. Elupaigana eelistavad nad kultuurmaastikke ja põõsastikke. Pesitsemine kestab reeglina aprillist juulini; munetakse kaks kurna, millele järgneb sulgimisperiood. Pehmetel talvedel on rohevint paigalind, elutingimuste halvenedes võtavad nad ette ka mõõdukaid rändeid (Cramp & Perrins, 1994). Rohevinte on kasutatud nii sootunnuste ja konditsiooni (Merilä et al., 1999); kui ka peremehe ja parasiidi vaheliste seoste uurimisel (Lindström & Lundström, 2000). Väga põhjalikult on rohevinte uurinud Hõraku töörühm (Hõrak et al., 2004; Hõrak et al., 2006a, b; Saks et al., 2006 jne).

Seni uurimistöodes kasutatud lindudest on rohevint geneetiliselt lähim koduvarblasele (Van der Meij et al., 2005; joonis 7) beeta-fibrinogeeni ja mitokondri tsütokroom b geenifragmentide järjestuste põhjal (vastavalt 87% ja 86% identsed), kasutades NCBI andmebaase (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ja BLASTN 2.2.12).



Joonis 7. Rohevindi fülogeneetiline sugulus teiste liikidega (fülogeneesipuu on koostatud beeta-fibrinogeeni ja mitokondri tsütokroom b geenifragmentide järjestuste põhjal, kasutades maksimaalse sarnasuse meetodit ja Bayesi analüüsi. Ülemised numbrid näitavad Bayesi analüüsi usaldusvahemikke, alumised maksimaalse sarnasuse analüüsi tulemit) (van der Meij et al., 2005).

Koktsiidid on eosloomade (*Sporozoa*) klassi kuuluvad parasiitsed ainuraksed, kes kuuluvad alamklassi *Coccidia* ja alamseltsi *Eimeria*. Koktsiidid on mikroskoopilised, sporuleeruvad parasiidid, kes nakatavad loomade seedetrakti. Nad on obligaatsete rakusisesed parasiidid. Perekonna *Isospora* liigid esinevad peamiselt värvulistel, nakatavad peensoole esimest osa (kaksteistsõrmikut ja tühisoolt), põhjustades kõhulahtisust ja soolestiku absorbeerimisvõime langust. Nakkuse tippfaasis langeb plasma triglütseriidide, vitamiin E ja karotenoidide kontsentratsioon vereplasmas (Hõrak

et al. 2004). (Karotenoide ei suuda loomad ise sünteesida ja immuunostimulaatorsete ning antioksidantsete omaduste tõttu usutakse et nad mõjutavad isendi tervislikku seisundit (nt Hõrak et al. 2004). Rohevindi kollaste sulepartiide värvus peegeldab otseselt karotenoidide sisaldust vereplasmas sulgede kasvamise ajal (Karu et al. 2007), mistõttu võiks karotenoidne sulevärvus olla isendi tervise, sh. nakkusresistentsuse indikaator.) Isosporat peetakse liigispetsiifiliseks, st nakatavad vaid üht liiki (Lillehoj & Trout 1994b) Eesti rohevintidel parasiteerivad koktsiidid on määratud *Isospora lacazei*ks (Hõrak et al., 2004).

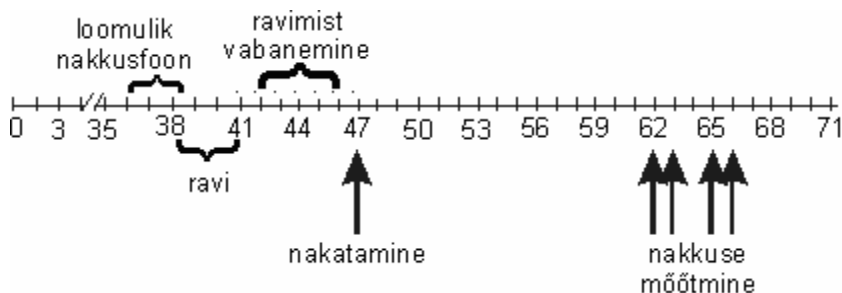
3.2 Üldandmed ja andmetöötlus

Andmed, mida selles töös on kasutatud, koguti Tartus jaanuaris-aprillis 2006 toimunud katsete (mis kuulusid suuremasse katseseeriasse: ETF grant # 6222: Immuunfunktsioon ökoloogilises kontekstis: oksüdatiivne stress, karotenoidsed signaalid ja parasiidiresistentsus) ja järgnenud laboratuursete analüüside käigus. Katse hõlmas manipulatsioone karotenoididega ja eksperimentaalset koktsiidinakkust.

Katses osalenud linnud püüti Sõrve linnujaamast Saaremaalt (57° 55' N; 22° 03' E) 20. jaanuaril 2006. Pärast transporti Tartusse paigutati linnud individuaalsetesse puuridesse (27×51×55 cm), mille aluspõhi oli kaetud liivaga. Keskmine temperatuur katse ajal lindlas oli 16.0 ± 1.6 (standardhälve) °C ja keskmine õhuniiskus 51.5 ± 2.4 (standardhälve) %. Linde toideti katsete toimumise ajal päevalilleseemnetega (mis on väikese karotenoidisisaldusega) *ad libitum*. Karotenoididega lisatoitmine seisnes 10 µg/ml luteiini ja zeaksantiini (20:1) vesilahusega jootmises (valmistati OroGlo lahusest (11 g/kg ksantofülliline aktiivsus) (Kemin AgriFoods Europe, Herentals, Belgium). Teised linnud said joogiks filtreeritud kraanivett (filter Brita® Classic; BRITA GmbH, Taunusstein, Germany). Katseseeria ajal hoiti linde looduslikes valgustingimustes.

Uuring toimus Eesti Keskkonnaministeeriumi loal ja linnud vabastati pärast katset. Kogutud andmete töötlus viidi läbi, kasutades programmi Statistica 7.1 (StatSoft Inc.).

3.3 Katse ajakava ja andmete kogumine



Joonis 8. Katse ajakava. 36.-38. katsepäeval toimusid loomuliku nakkusfooni mõõtmised, 62.-63 ning 65.-66. katsepäeval eksperimentaalse nakkuse mõõtmised.

Katse kestis 72 päeva. Päevad numereeriti, alustades lindude püüdmise päevast (joonis 8). Katses osales kokku 94 isast rohevinti, kellest 29-l (isendid valis Peeter Hõrak nakkuse intensiivsuse alusel (kõrgem ja madalam)) eraldati vereproovist DNA järgnevate geneetiliste analüüside tarbeks - 71. katsepäeval võeti kõigilt isastelt lindudelt vereproovid - ca 20-30 mikrolitrit, mis viidi kohe 20 mikrolitrisse puhvrissse (Dulbecco's PBS + 2mMEDTA); edaspidi säilitati -70 °C juures (Bonneaud et al., 2004).

3.4 Ravi

38. katsepäeval alustati neli päeva kestva koktsidioosiraviga. Lindudele anti joogina Toltrazurili preparaati (Intracox Oral, Interchemie, Castenary, The Netherlands), mida lisati joogivette vahekorras 2 ml 2.5% lahust ühe l Britta filtreeritud vee kohta.

3.5 Taasnakatamine ja nakkusresistentsuse mõõtmine

47. katsepäeval nakatati kõiki linde suukaudselt umbes 2000 ootsüstiga (*Isospora*) (eri isenditelt kogutud ootsüstide segu). Nakatamiseks koguti kõigilt lindudelt 20 päeva jooksul rooja. Kogutud roe pandi koekultuuripudelitesse ja segati 20 ml 2% kaaliumdikromaadi lahusega, mis oli vahekorras 1:1 lahjendatud veega. Roojaproove hoiti toatemperatuuril ja aereeriti iga päev. 20. päeval pandi kogutud ootsüstid sporuleeruma, st ei lisatud enam rooja. 15 päeva pärast, kui kõik ootsüstid olid

sporuleerunud, pesti nakatamismaterjal roojast välja. Selleks kurnati roojaproovid läbi marli, saadud vedelikku tsentrifuugiti 10 minutit (2500 pööret minutis), et ootsüstid põhja sadestuks. Supernatant eemaldati, allesjäänud 0.2 ml vedelikule lisati vett ja tsentrifuugiti taas 10 minutit (2500 pööret minutis). Protseduuri korrati 3-4 korda, kuni kaaliumdikromaat oli eemaldatud. Nakatamislahuse kontsentreerimiseks tsentrifuugiti saadud vedelikku veel kord 10 minutit (2500 pööret minutis), eemaldati supernatant ja allesjäänud 0.1 ml vedelikust loeti ootsüstid. Roojaproovid loomuliku nakkuse ja eksperimentaalse nakkuse määramiseks võeti vastavalt 35.-37. ja 62.-63 ning 65.-66. katsepäeval (joonis 8). Nakkusresistentsus arvutati järgnevalt: keskmistati loomuliku nakkusfooni erinevate mõõtmiste tulemused, mis lahutati eksperimentaalse nakkuse mõõtmise keskmistatud tulemustest.

3.6 Sule värvi mõõtmine

20. katsepäeval tõmmati välja parempoolne välimine sabasulg, 71. katsepäeval tõmmati välja selle asemel kasvanud sulg. Sule värvi mõõdeti nähtavalt karotenoidselt pigmenteerunud 1 mm² suuruselt alalt (vt joonis 9) spektrofotomeetriga (Ocean Optics USB2000 Ocean Optics DH2000 lambiga). *Chroma* korreleerub lineaarselt sule kasvamise ajal vereplasmas olevate karotenoidide kontsentratsiooniga (Karu et al., 2007). Värvi hindamiseks arvutati *chroma* väärtused vastavalt Endlerile (1990). *Chroma* on värvuse puhtuse või küllastuse mõõt, mida arvutati järgnevalt:

$$Chroma = \sqrt{(R-G)^2 + (Y-B)^2},$$

kus $B = (Q_b/Q_t)$, $G = (Q_g/Q_t)$, $Y = (Q_y/Q_t)$, $R = (Q_r/Q_t)$. Q_r tähistab peegeldumisspektri punase piirkonna (625-700 nm) summeeritud peegeldust, Q_g peegeldumisspektri rohelise piirkonna (475-550 nm) summeeritud peegeldust, Q_y peegeldumisspektri kollase piirkonna (550-625 nm) summeeritud peegeldust, Q_b peegeldumisspektri sinise piirkonna (400-475 nm) summeeritud peegeldust. Q_t (eredus) on summeeritud peegelduvus 400 ja 700 nm vahel.



Joonis 9. Sule värvi mõõtmise alad sulel on näidatud nooltega (Saks et al., 2003).

3.7 DNA eraldamine

DNA eraldati kümnest mikrolitrist vere ja puhvri segust (vt ptk Katse ajakava ja andmete kogumine). DNA eraldamiseks kasutati High Pure PCR Template Preparation Kit'i (Roche Applied Science, Mannheim, Saksamaa) ja vastavat protokollit.

3.8 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCRi kasutasin rohevindi MHC klass I 3. eksoni geenijärjestuste amplifitseerimiseks genoomist ja DGGE jaoks ettevalmistamiseks. Praimerite (seni publitseerimata) järjestused sain Dr Helena Westerdahlilt, kes mul neid lahkesti oma töös kasutada lubas. Need praimerid amplifitseerivad MHC klass I 3. eksonit, andes umbes 200 bp suuruse produkti. Kasutati komplekti AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System (Invitrogen, Holland) järgnevate muudatustega reaktsiooni tingimustes: reaktsiooni maht oli 40 µl, sisaldades ~10-20 ng eraldatud DNAd, 20 pmol kumbagi praimerit ja 0,4 U polümeraasi, 4 µl 10x puhvrit (AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System, PCR Buffer I), milles oli magneesiumi kontsentratsioon 2,5 mM. PCR viidi läbi Applied Biosystems'i termotsükleris (Applied Biosystems PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City,

USA). Programm algas initsiatsiooni etapiga 94°C juures 4 min, seejärel toimus 35 tsükli jooksul denaturatsioon 94°C juures 30 s, praimeri seondumine 59 °C juures 30 s ja DNA süntees 68 °C juures 30s; viimane etapp oli lõppekstensioon 68 °C juures 10 min.

3.9 PCR produktide kontroll ja visualiseerimine

Amplifitseeritud geeniproduktide olemasolu ja negatiivse kontrolli puhtust kontrolliti elektroforeetilisel 2% agarosgeelil 1 kb DNA suurusmarkeriga (Gibco, Glasgow, UK) võrdlemisel. Geel valmistati 1x TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2) ning pärast agarooosi lahustamist lisati etiidiumbromiidi (0,5 µg ml⁻¹). Visualiseerimiseks segati enne elektroforeesi läbiviimist proovid 6x elektroforeesivärviga (0,2% broomfenoolsinine, 0,2% ksüleen-tsüanool, 60% glütserool, 60 mM EDTA). Elektroforees toimus 100V juures 18 tundi.

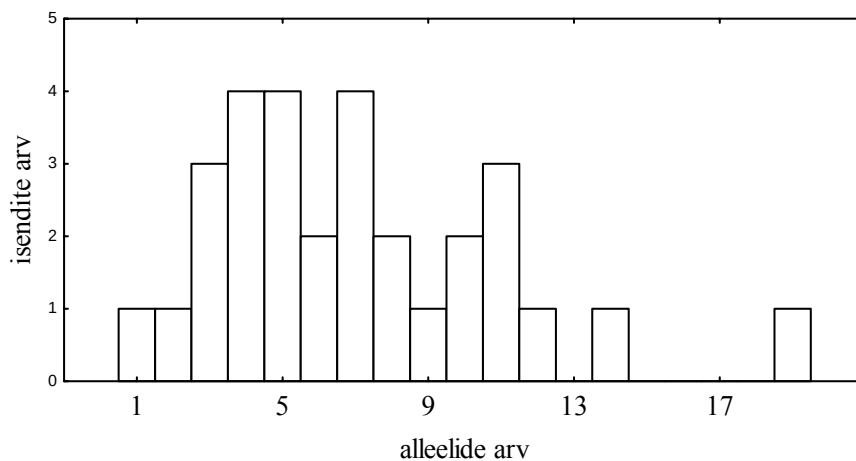
3.10 Amplifitseeritud fragmentide eraldamine DGGE meetodil

DGGE meetodiga eraldatakse denatureerivas geelis ühepikkused DNA fragmendid üksteisest vastavalt erinevustele primaarjärjestuses. Selle meetodiga on võimalik eristada ka teineteisest vaid ühe aluspaari võrra erinevad fragmendid (Muyzer et al., 1993). Amplifitseeritud fragmentide analüüsimiseks kasutati C.B.S. Scientific vertikaalset elektroforeesisüsteemi DGGE System 2001 (C.B.S. Scientific, Del Mar, USA). Valmistati 1 mm paksune 6% polüakrüülamiidgeel. Geel sisaldas 1x TAE puhvrit (50 mM Tris/atsetaat; 1 mM EDTA, pH 8.3), 6% akrüülamiidi/bisakrüülamiidi segu (37,5:1) ning denaturantide (uurea ja formamiid) lineaarset kontsentratsiooni. Geeli valamisel kasutati Heidolph SP Standard Pumpdrive 5001 (Heidolph, Schwabach, Saksamaa) peristaltilist pumpa kiirusel 4 ml/min. ja gradiendivalajat (Amersham Pharmacia Biotech AG, Uppsala, Rootsi). Fragmentide eraldamiseks kasutati denaturandi kontsentratsioonivahemikku 35%-60%. Geeli "hammaste" parema polümeriseerumise tagamiseks valati geeli ülemine, ca 4 cm kõrgune osa denaturandivabast geelist. Geelil lasti polümeriseeruda 1,5 tundi. Polümeriseerunud geelile kanti 15 µl proovi ning geeli

elektroforeesiti 1x TAE puhvris 18 tundi 180 V pingega temperatuuril 60 C. Peale elektroforeesi värviti geeli SybrGoldiga (Molecular Probes, Eugene, USA) (3 mikroliitrit 10000x värvi lahustati 15 ml 1x TAE puhvris) 20 minuti jooksul. Geeli pildistati bioanalüsaatoriga Typhoon Trio (GE Healthcare, Freiburg, Saksamaa) ja geelipilti (vt lisa 1) analüüsiti visuaalselt.

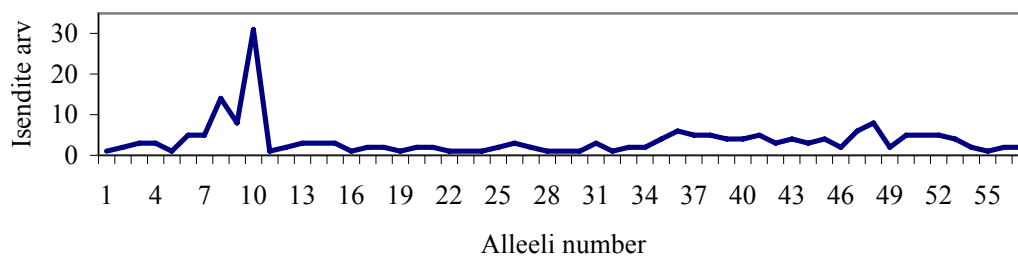
4. Tulemused

DGGE meetodiga saadi nõ triibumuster (lisa 1), millelt loendati iga proovi triipude ehk DGGE alleelide arv. Edaspidi nimetatakse neid tekstis lihtsuse huvides alleelideks, kuigi ei ole teada, kas nad pärinevad ühest või mitmest lookusest. Alleelid nummerdati ülalt alla vastavalt sellele, kui kaugele nad olid geelis migreerunud. Alleelide hulga jaotus on ära toodud histogrammina (joonis 10). Alleelide hulga jaotus isenditi ei erinenud oluliselt normaaljaotusest (Lillieforsi test, $p < 0,15$).

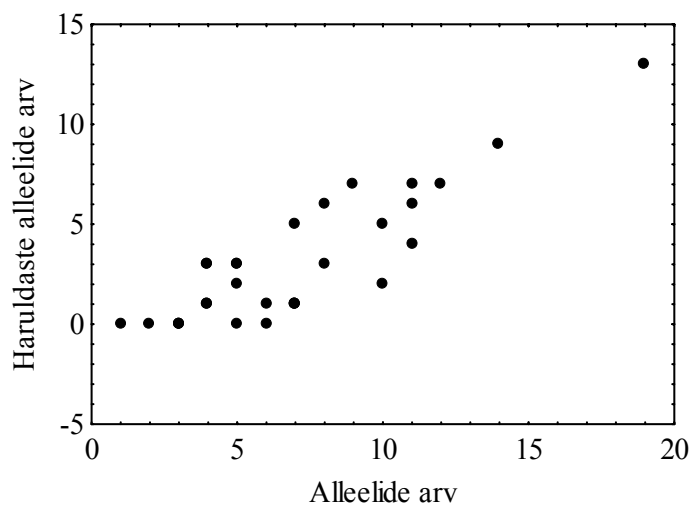


Joonis 10. Alleelide hulga jaotus isenditi.

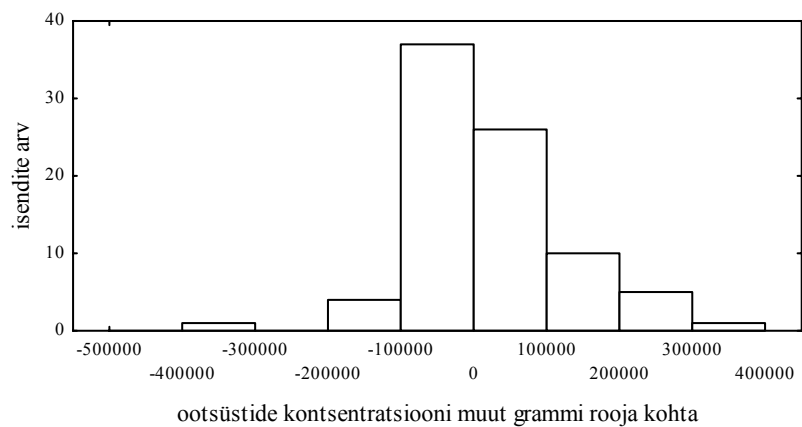
Ühtekokku loendati 30 isendil 57 erinevat alleeli, millest sagedasim esines kõigil uuritud isenditel, 13 harvimat (nn unikaalsed alleelid) vaid ühel isendil (joonis 11). Oluliselt ja positiivselt olid seotud alleelide koguhulk isendil ja harvaesinevate või unikaalsete alleelide hulk (joonis 12, Spearmani astakkorrelatsioon, $r_s = 0,87$; $p < 0,0000001$)



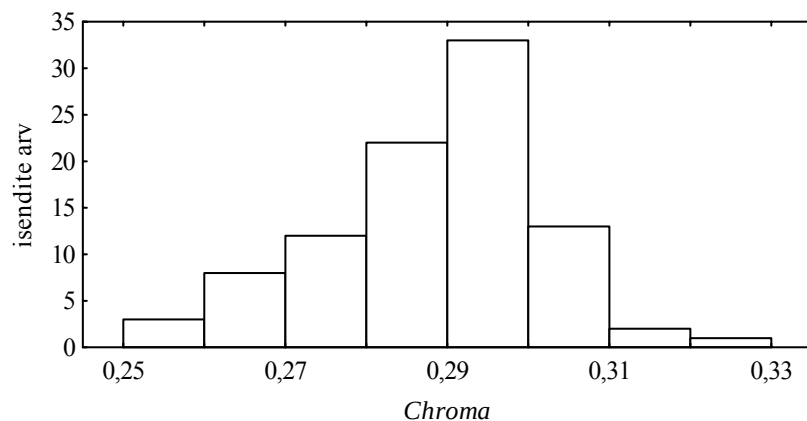
Joonis 11. Alleelide sagedusjaotus.



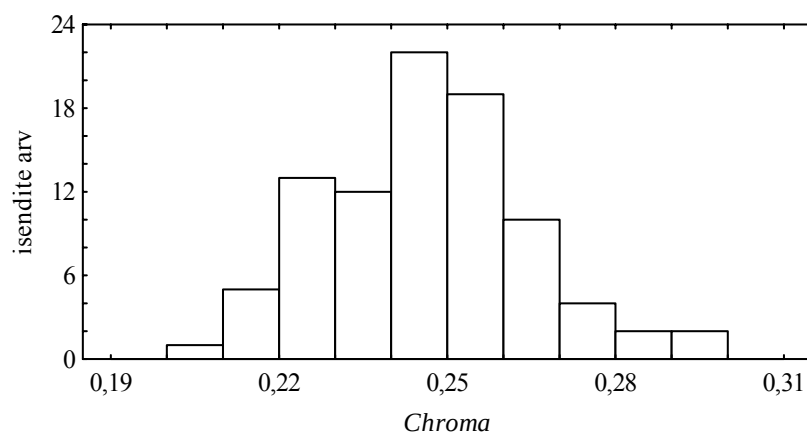
Joonis 12. Isendi alleelide koguhulga ja harvaesinevate alleelide hulga seos.



Joonis 13. Nakkusresistentsuse sagedusjaotus (Lillieforsi test, $p < 0,01$).

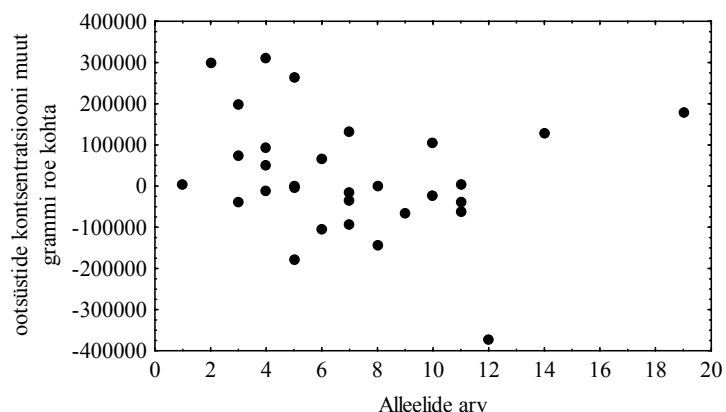


Joonis 14. *Chroma* algsete väärtuste (enne karotenoidimanipulatsiooni võetud sulgedelt) sagedusjaotus (Lillieforsi test, $p < 0,15$).



Joonis 15. *Chroma* väärtuste (karotenoidimanipulatsiooni ajal kasvanud sulgedelt) sagedusjaotus (Lillieforsi test, $p < 1$).

Alleelide hulk ja keskmistatud nakkusresistentsuse mõõt olid omavahel negatiivselt seotud (joonis 16), ehk teisiti sõnastatult – väiksema alleelide hulgaga isendid olid nakkusele vastuvõtlikumad.



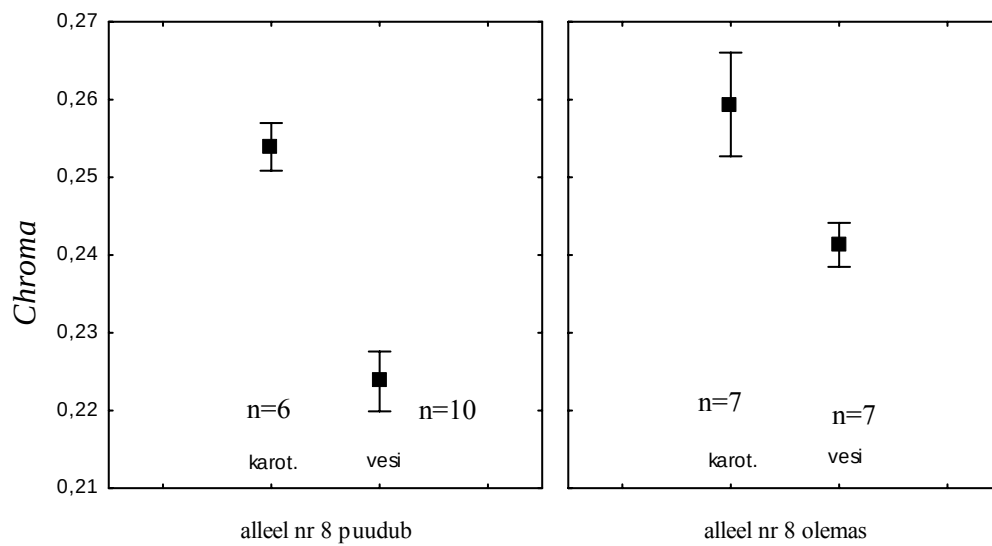
Joonis 16. Keskmistatud nakkusresistentsuse mõõdu ja isendite alleelide arvu seos (Spearmani astakorrelatsioon, $r_s = -0,29$; $p = 0,11$). Kui erind (alleelide arv=19) on eemaldatud, on Spearmani astakorrelatsiooni järgi $r_s = -0,39$; $p = 0,038$).

Haruldasmate alleelide kandmise ja nakkusresistentsuse vahel ei leitud olevat olulist seost (Spearmani astakorrelatsioon, $r_s = -0,18$, $p = 0,34$).

Üks sagedasematest alleelidest, number 8 (esines 14-l uuritud linnul) on positiivselt seotud vangistuses kasvanud sulgede värvusega, st selle alleeli kandjatel oli värv küllastunud, sõltumata karotenoididega lisatoitmisest (tabel 2, joonis 17). Looduses kasvanud sulgede värvust selle alleeli omamine ei mõjutanud (T-test, $t = 0,09$, $df = 27$, $p = 0,926$).

Tabel 2. Seos alleeli number 8 olemasolu ja vangistuses kasvanud sulgede värvuse vahel (dispersioonanalüüs)

faktor	df	F	p
alleeli olemasolu	1	7,34	0,012
karot. lisatoitmine	1	28,35	0,000016
viga	25		



Joonis 17. Alleeli number 8 seos vangistuses kasvanud sulgede värvusega. „Vurrud” tähistavad 0,95 x standardviga.

5. Arutelu

Käesolevas töös rohevintidel leitud alleelide hulk isenditi on heas kooskõlas teiste värvuliste uurimisel leitud alleelide hulgaga (Westerdahl et al., 2004, Rivero (isiklik teade)). Hariliku ogalikuga tehtud katsed näitavad, et pigem võiks keskmine individuaalne MHC mitmekesisus olla loodusliku valiku sihtmärgiks. Kuna keskmise alleelide arvuga (5,17 ; varieeruvus 2-9) isenditel leiti kõige vähem parasiidiliike arvati, et negatiivne valik T-rakkude repertuaari suhtes kitsendab detekteeritavate patogeenide hulka. (Wegner et al., 2003; Wegner et al., 2004). Harilikul ogalikul (*Gasterosteus aculeatus*) on näidatud, et ka paarilise valikul on soositud/eelistatud on keskmine, mitte maksimaalne MHC alleelide mitmekesisus (Aeschlimann et al., 2003); paarilise valiku puhul valis emane suurema (MHC IIB) alleelide arvuga isase, tõenäoliselt suurendamaks individuaalset heterosügootsust, kuid ei valitud MHC suhtes mitte kõige erinevamat, vaid pigem selliseid isaseid, kellega oleks mõni alleel ühine. Oletatavasti on see nii kõigi selgroogsete puhul, kel on mitu MHC IIB lookust (Jäger, 2006). Westerdahl (2003) järgi puudub rästas-roolinnu paaritumiseelistuste (emane valib isast) ja MHC klass I alleelide vahel seos. Bonneaud jt (2006) oletavad, et optimum tuleneb lõivsuhtest ära tundmaks suurimat antigeensete peptiidide repertuaari (mis soosiks suuremat hulka allele) ja valiku vahel, mis on suunatud minimeerimaks T rakkude kloonide kadu *self-tolerance*'i indutseerimisel (soosib vähemat alleelide arvu). MHC molekulide võime seonduda ka nõ iseenda peptiididega (st organismi muude peptiididega) näitab vajadust negatiivse valiku mehhanismide järele, et vältida autoreaktiivsust. Hiirel on näidatud kahe sellise mehhanismi olemasolu, klonaalne deletsioon ja funktsiooni inaktivatsioon või klonaalne anergia (ei teki immuunvastust). Omandatud immuunsus õpib mitte aktiveeruma organismi enda koostisosade mõjul. Kui lümfotsüütide küpsemise ajal lümfoïdses organis leiab lümfotsüüt eriomase antigeeni, mis on väga tõenäoliselt organismi enda koostisosa, siis vastav kloon mitte ei aktiveeru, vaid hoopis inaktiveeritakse või sureb. Lisaks MHC poolt esitletud antigeenile on abistaja T-rakkude edasiseks aktiveerimiseks vaja veel täiendavat signaali. Kui teine signaal puudub, siis abistaja T-rakk hävib (organism ei hävita organismiomaseid valke eksponeerivaid rakke). Seega, kui ekspresseeritavate MHC molekulide arv tõuseks, deleteeritaks või inaktiveeritaks

enam(rohkem) T-rakkude kogumist. See omakorda vähendaks ka immuunvastuse indutseerimise võimet. (Nowak et al., 1992).

Ühe erandiga võib väita, et käesolevas töös oli suurema alleelide hulga isenditel parem nakkusresistentsus. Sarnase seose leidsid ka Westerdahl ja kaastöölised (2005) malaarianakkuse puhul rästas-roolinnul, mida võib seletada suurema hulga alleelide kandjate parema elumusega. Alleelide hulk võimaldab hinnata heterosügootsust, kuna isendid, kellel on leitud vähem alleele, on tõenäoliselt homosügootsed enamates lookustes kui suurema alleelide arvuga isendid. Westerdahl ja kaastöölised (2005) näitasid rästas-roolinnul, et kuue või enama MHC alleeli kandmine (soodsate alleelide arv, millest üks on B4b, ja alleelide koguhulk näidati olevat positiivselt seotud) näib soodustavat ägeda malaarianakkuse üleelamist (teatud alleeliga isendid, kes nakatusid malaariasse *Plasmodium* sp. GRW2 tüvega, jõudsid rändelt tagasi).

Koduvarblaste emased ei vali paariliseks sellist isendit, kel pole nendega ühtki ühist alleeli, kuid säilitavad siiski suhteliselt kõrge mitmekesisuse (Bonneaud et al. 2006). Neffi (2004) järgi on keskmise genoomse divergentsusega seotud kõrgem sigimisedukus kui äärmustega. (Sama kinnitab Jäger (2006); mõlemad uurisid ogalikku, ja põhiliselt klass IIB). Optimaalne genoomse divergentsuse tase võib seega varieeruda sõltuvalt sellest, kas on soodsam toota mõnes situatsioonis (nt äge lokaalne nakkuskoht vms) paremini ellujäävaid inbriide, kelle üldine suremus on suurem (Bonneaud et al., 2006).

Huvitavaks tulemuseks võib pidada seda, et haruldasemate alleelide kandmine ei osutunud käesoleva mudeli puhul kasulikuks. (võrdle: Bonneaud et al., 2006). Selline tulemus on vastuolus negatiivse sagedusest sõltuva valiku hüpoteesiga (vt ka kirjanduse ülevaadet). Võimalik, et see hüpotees ei ole üldkehtiv ja universaalne iga peremehe-parasiidi mudeli suhtes. Antud juhul võib tegu olla ka heterosügoodi eelisega (*balancing selection*), (vt nt Hedrick 1999; ja Takahata & Nei, 1990). Väga keerukas on välja selgitada, milline valik täpselt toimib. Haruldase(ma)d alleelid võivad olla kasulikud ja kanda resistentsust mõne muu nakkuse/parasiidi vastu, mida aga kindlalt väita ei saa, kuna meie mudelis uuriti vaid koktsiidinakkust. See küsimus vajaks lähemat selgitamist, kasutades ka teisi parasiite eksperimentaalses nakkuses ning rohevindi nakkusresistentsuse mehhanismide laiemat uurimist.

Äärmiselt huvitav on ka tulemus, mille järgi üks sagedasematest alleelidest (number 8, esines 14-l uuritud linnul) on positiivselt seotud vangistuses kasvanud sulgede värvusega, st selle alleeli kandjatel oli värv küllastunud, sõltumata karotenoididega lisatoitmisest, eriti arvestades, et Karu ja kaastöölised (2007) on näidanud, et karotenoidide kättesaadavus mõjutab sulestiku värvi. Seega võiks spekuloida, et nimetatud alleeliga isenditel on kas parem karotenoidide absorptsiooni võime (mis viitab resistentsusele soolenakkustele) või kulutavad nad vähem karotenoidide vabade radikaalide kustutamiseks või immuunostimulatsiooniks. Mõlemal juhul võiks rääkida kaudsest seosest koksidioosiresistentsuse ning signaaltunnuse ekspressiooni vahel. Oluline on siiski märkida, et nimetatud alleeli esinemine ei olnud otseselt seotud nakkusresistentsusega ning selle alleeli esinemine ei olnud seotud isendi alleelide koguhulgaga. Sarnase tulemuse on saanud ka Jäger (2006), kes leidis, et teatud MHC I alleeli kandmine on seotud eredama värvusega (ogalikul;), kuid muude konditsiooninäitajatega seost ei leitud. (Harilikul ogalikul on seni teadaolevalt nakkusresistentsus seotud pigem MHC II alleelidega (nt Milinski 2003)). Käesoleva katse puhul on ka võimalik, et alleel nr. 8 osutub soodsaks vaid raskendatud elutingimustes (nt vangistus) ja tavapärastes tingimustes tema mõju ei avaldu, mis võiks selgitada seose puudumist looduses kasvanud sulgede värvuse ja alleeli esinemise vahel.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli:

1. Selgitada, kas rohevindi peamise koosobivuskompleksi alleelid on seotud resistentsusega koktsiidinakkusele, mida võiks eeldada peamise koosobivuskompleksi funktsioonidest teistes organismides
2. Selgitada, kas peamisel koosobivuskompleksil on seos konditsioonist sõltuvate indikaatortunnustega (sulestiku värvuse karotenoidsed komponendid).

Selleks viidi läbi eksperiment, mille käigus rohevinte nakatati koktsiididega ja mõõdeti erinevates tingimustes kasvanud sulgede värvust. Selle uurimistöö tulemusena leiti järgmist:

1. Rohevindi peamise koosobivuskompleksi MHC klass I alleelide arv isendil on positiivselt seotud resistentsusega koktsiidinakkusele.
2. Rohevindi peamise koosobivuskompleksi klass I ühel alleelil on positiivne seos teatud tingimustes (vangistus) kasvanud sulestiku värvi küllastumusega, mis ei sõltu lisatoitmisest karotenoididega.

Minu teada on see esimene kord, kui MHC varieeruvuse seost nakkusresistentsusega on uuritud ja demonstreeritud metsikul linnuliigil eksperimentaalse nakkuse mudelis.

Summary

Associations between the variability of the major histocompatibility complex of greenfinch and resistance to coccidiosis and plumage coloration

The aims of this study were as follows:

1. To find out if the alleles of major histocompatibility complex of greenfinch are associated to resistance to coccidiosis, which could be presumed by the functions of MHC in other organisms.
2. To find out if the major histocompatibility complex is associated to condition-dependent indices (carotenoid components of plumage coloration).

To obtain these goals, an experiment was carried out during which greenfinches were infected with coccidians and coloration of feathers grown in different conditions were measured.

The results of this study indicated following:

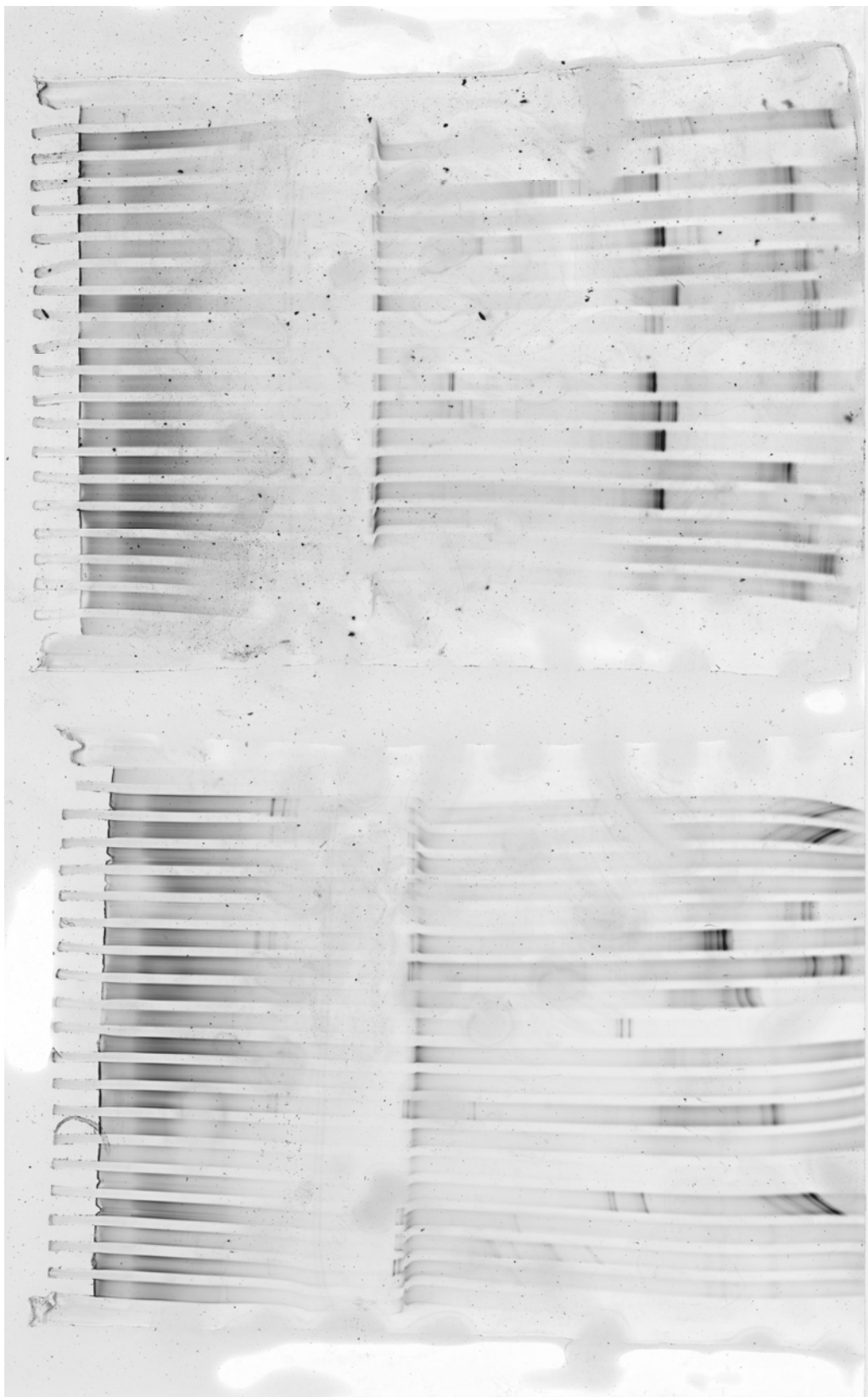
1. The number of MHC Class I alleles in an individual is positively correlated with resistance to coccidiosis.
2. Carrying one allele of the MHC Class I of greenfinch is positively correlated to *chroma* values of feathers grown in certain conditions (captivity), regardless of the additional feeding with carotenoids (the amount of carotenoids in food).

To my knowledge, this study presents the first experimental evidence about association between MHC variation and infection resistance in a wild bird species.

Tänuavaldused

Selle töö juures oli mul abiks rida toredaid inimesi, kellela ei oleks see töö valminud. Tahaksin tänada oma juhendajat Peeter Hõrakut kannatlikkuse eest. Samuti Urmas Saarmat ja Veljo Kisandit, kes lubasid mul kasutada oma laboreid. Suurim tänu kuulub neile, kellega mul on olnud rõõm koos töötada Vanemuise 21 ja Sõlvegatan 37 teisel korrusel, eriti Helena Westerdahlile praimerite ja hindamatute nõuannete eest. Tänan siiralt ka Maarja Öpikut mõistmise, kannatlikkuse ja humoorikate (kuid väga asjakohaste ja nutikate) nõuannete eest. Seda uurimistööd finantseeriti Peeter Hõraku ETF granti 6222 arvelt. Minu viibimist Dr. Westerdahli laboris Lundi Ülikoolis rahastas SA Archimedes.

Lisa 1. Digitaalselt töötlemata DGGE pilt.



Kasutatud kirjandus

- Aeschlimann, P.B., Häberli, M.A., et al., 2003. Female sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* use self-reference to optimize MHC allele number during mate selection. Behav Ecol. Sociobiol 54:119–26
- Allen, P. & Fetterer R. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. Clin. Microbiol. Rev. 15(1): 58-65.
- Andersson, M. 1994. Sexual selection. Princeton University Press, Princeton.
- Bacon, L., D. Hunter, et al. 2004. Retrospective evidence that the MHC (B haplotype) of chickens influences genetic resistance to attenuated infectious bronchitis vaccine strains in chickens. Avian Pathol. 33(6): 605-609.
- Bensch, S. & A. Akesson 2003. Temporal and spatial variation of hematozoans in Scandinavian willow warblers. J. Parasitol. 89(2): 388-391.
- Bernatchez, L. & Landry C. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? J. Evol. Biol. 16(3): 363-377.
- Bonneaud, C., G. Sorci, et al. 2004. Diversity of Mhc class I and IIB genes in house sparrows (*Passer domesticus*). Immunogenetics 55(12): 855-865.
- Bonneaud, C., J. Perez-Tris, et al. 2006. Major histocompatibility alleles associated with local resistance to malaria in a passerine. Evolution 60(2): 383-389.
- Burgess, S., B. Basaran, et al. 2001. Resistance to Marek's disease herpesvirus-induced lymphoma is multiphasic and dependent on host genotype. Vet. Pathol. 38(2): 129-142.
- Clarke B, Kirby DR 1966 Maintenance of histocompatibility polymorphisms. Nature, 211, 999–1000.
- Cramp, S., and Perrins, C.M. 1993–1994. The birds of the Western Palearctic, Vols. 7–9. Oxford. University Press, Oxford.
- Doherty P. C. and Zinkernagel R. M. 1975. A biological role for the major histocompatibility antigens. The Lancet, 1(7922): 1406-1409
- Edwards, S., C. Hess, et al. 1999. Toward an evolutionary genomics of the avian Mhc. Immunol. Rev. 167: 119-132.

- Edwards, S., J. Gasper, et al. 2000. A 39-kb sequence around a blackbird Mhc class II gene: Ghost of selection past and songbird genome architecture. *Mol. Biol. Evol.* 17(9): 1384-1395.
- Ekblom, R. 2004. Immunoecology of the Great Snipe (*Gallinago media*): Mate Choice, MHC Variation, and Humoral Immunocompetence in a Lekking Bird. Doktoritöö, käsikiri.
- Endler, J.A. 1990 On the measurement and classification of colour in studies of animal colour patterns. *Biological Journal of the Linnean Society* 41, 315–352.
- Ewald, S. & E. Livant 2004. Distinctive polymorphism of chicken B-FI (major histocompatibility complex class I) molecules. *Poultry Science* 83(4): 600-605.
- Garrigan, D. and S. Edwards 1999. Polymorphism across an exon-intron boundary in an avian Mhc class IIB gene. *Mol. Biol. Evol.* 16(11): 1599-1606.
- Gasper, J., T. Shiina, et al. 2001. Songbird genomics: Analysis of 45 kb upstream of a polymorphic Mhc class II gene in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Genomics* 75(1-3): 26-34.
- Golub, E. S. & Green, D. R., 1991, Immunology: A Synthesis. 2nd. ed., Sinauer, Sunderland.
- Hamilton, W. and M. Zuk 1982. Heritable true fitness and bright birds – a role for parasites. *Science* 218(4570): 384-387.
- Hedrick, P. W. 1999 Balancing selection and MHC. *Genetica* 104: 207-214.
- Hedrick, P. 2002. Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution* 56(10): 1902-1908.
- Hess, C. and S. Edwards 2002. The evolution of the major histocompatibility complex in birds. *Bioscience* 52(5): 423-431.
- Hess, C. M., J. Gasper, et al. 2000. MHC class II pseudogene and genomic signature of a 32-kb cosmid in the house finch (*Carpodacus mexicanus*). *Genome Research* 10(5): 613-623.
- Hill, A., C. Allsopp, et al. 1991. Common west african HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352(6336): 595-600.
- Hörak, P., L. Saks, et al. 2006a. Host resistance and parasite virulence in greenfinch coccidiosis. *J. Evol. Biol.* 19(1): 277-288.
- Hörak et al., (2007). Do dietary antioxidants alleviate the cost of immune activation? An experiment with greenfinches. *American Naturalist* (in press).

- Hörak P., Saks L., et al. 2004 How coccidian parasites affect health and appearance of greenfinches. *J. Anim. Ecol.* 73, 935-937
- Hörak, P., Zilmer, M. et al. 2006b. Antioxidant protection, carotenoids, and the costs of immune challenge in greenfinches. *J. Exp. Biol.* 209, 4329-4338
- Janeway, C. et al., 2004, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 6th ed. Garland Science, 832 pp.
- Jordan, W. and M. Bruford 1998. New perspectives on mate choice and the MHC. *Heredity* 81: 239-245.
- Jäger, I. 2006 Hosts and parasites: many ways of interactions ; an approach with two model organisms, the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and its cestode parasite (*Schistocephalus solidus*) Doktoritöö, käsikiri.
- Karu, U., Saks, L. & Hörak, P. 2007. Carotenoid coloration in greenfinches is individually consistent irrespective of foraging ability. *Physiol. Biochem. Zool.* 80, in press.
- Kaufman, J. 2000. The simple chicken major histocompatibility complex: life and death in the face of pathogens and vaccines. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355(1400): 1077-1084.
- Lakshmanan, N., J. Gavora, et al. 1997. Major histocompatibility complex class II DNA polymorphisms in chicken strains selected for Marek's disease resistance and egg production or for egg production alone. *Poultry Science* 76(11): 1517-1523.
- Lillehoj, H. & J. Trout 1994a. CD8+ T-Cell-coccidia interactions. *Parasitol. Today* 10(1): 10-14.
- Lillehoj, H. S., & J. M. Trout. 1994b. Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathol.* 22(1):3-21.
- Lindström, K. and J. Lundström 2000. Male greenfinches (*Carduelis chloris*) with brighter ornaments have higher virus infection clearance rate. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 48(1): 44-51.
- Marsh, S.G.E., Albert, E.D. et al. 2005 Nomenclature for factors of the HLA system, 2004 *Tissue Antigens* 65 (4), 301-369.
- Merilä, J., B. C. Sheldon, et al. 1999. Plumage brightness in relation to haematozoan infections in the greenfinch *Carduelis chloris*: Bright males are a good bet. *Ecoscience* 6(1): 12-18.
- Miller, M., L. Bacon, et al. 2004. 2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. *Immunogenetics* 56(4): 261-279.

- Muyzer, G., E. Dewaal, et al. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3): 695-700.
- Neff, B.D. 2004. Stabilizing selection on genomic divergence in a wild fish population. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2004;101;2381-2385
- Nowak, M. A., Tarczy-Hornoch, K. & Austyn, J. M. 1992. The optimal number of major histocompatibility complex molecules in an individual. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10896–99.
- Penn, D. and W. Potts 1999. The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. *Am. Nat.* 153(2): 145-164.
- Penn, D., K. Damjanovich, et al. 2002. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99(17): 11260-11264.
- Porcelli, S. 2005. Bird genes give new insights into the origins of lipid antigen presentation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102(24): 8399-8400.
- Potts, W. and E. Wakeland 1990. The maintenance of Mhc polymorphism. *Immunol. Today* 11(2): 39-39.
- Richardson, D.S., Burke, T. et al., 2005. MHC-based patterns of social and extra-pair mate choice in the Seychelles warbler. *Proc R Soc Lond B.* 272:759–767
- Saks, L. 2002. Immuunparameetrid ja muud konditsiooniindeksid vangistuses peetavatel rohevintidel: püsivus ajas, seos sulestiku värvusega ja reaktsioon humoraalsele immuunväljakutsele. Magistritöö, käsikiri.
- Saks, L. 2004. Immune function, parasites, and carotenoid-based ornaments in greenfinches (Parasiidid, immuunfunktsioon ja karotinoididel põhinevad ornamendid rohevintidel). Doktoritöö, käsikiri.
- Saks, L., McGraw, K. J. M. & Hõrak, P. 2003. How feather colour reflects its carotenoid content. *Funct. Ecol.* 17, 555-561.
- Shiina, T., K. Hosomichi, et al. 2006. Comparative genomics of the poultry major histocompatibility complex. *Animal Science Journal* 77(2): 151-162.
- Shiina, T., S. Shimizu, et al. 2004. Comparative genomic analysis of two avian (quail and chicken) MHC regions. *J. Immunol.* 172(11): 6751-6763.

- Sommer, S. 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front. Zool.*, 2, 16.
- Stearns, S. & Hoekstra, R. 2005. *Evolution: an introduction* 2nd Ed. Oxford University Press.
- Swinkels WJ, Post J, et al. 2007. Immune responses to an *Eimeria acervulina* infection in different broilers lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117(1-2): Pages 26-34
- Zelano, B. & S. Edwards. 2002. An Mhc component to kin recognition and mate choice in birds: Predictions, progress, and prospects. *Am. Nat.* 160: S225-S237.
- Takahata, N & Nei, M. 1990. Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* 124: 967– 78
- Trowsdale, J. 1995. Both man and bird and beast – comparative organization of Mhc genes. *Immunogenetics* 41(1): 1-17.
- Wain, H., A. Toye, et al. 1998. Targeting of marker loci to chicken chromosome 16 by representational difference analysis. *Animal Genetics* 29(6): 446-452.
- Van der Meij, M., M. de Bakker, et al. 2005. Phylogenetic relationships of finches and allies based on nuclear and mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34(1): 97-105.
- Wegner, K.M., Reusch, T.B.H., et al., 2003. Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *J. Evol. Biol.* 16(2):224-232
- Wegner, K.M., Kalbe, M. et al. 2004. Parasites and individual major histocompatibility complex diversity - an optimal choice? *Microbes & Infection.* 6(12):1110-1116
- Westerdahl, H., B. Hansson, et al. 2004. Between-year variation of MHC allele frequencies in great reed warblers: selection or drift? *J. Evol. Biol.* 17(3): 485-492.
- Westerdahl, H., H. Wittzell, et al. 1999. Polymorphism and transcription of Mhc class I genes in a passerine bird, the great reed warbler. *Immunogenetics* 49(3): 158-170.
- Westerdahl, H., H. Wittzell, et al. 2000. Mhc diversity in two passerine birds: no evidence for a minimal essential Mhc. *Immunogenetics* 52(1-2): 92-100.
- Westerdahl, H. 2003. Avian MHC: variation and selection in the wild. *Doktoritöö, käsikiri.*
- Westerdahl, H., J. Waldenstrom, et al. 2005. Associations between malaria and MHC genes in a migratory songbird. *Proc. R. Soc. B* 272(1571): 1511-1518.