

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2015

Pavla Vlková

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
Katedra ekologie

VARIABILITA GENU PRO TLR4 U
KOROPTVE POLNÍ (*Perdix perdix*)

Bc. Pavla Vlková

Vedoucí: Ing. Jana Svobodová, PhD.

2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jany Svobodové, PhD., a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Praze dne 22. 4. 2015

.....

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Janě Svobodové Ph.D. za vedení mé diplomové práce a Mgr. Hance Bainové za cenné rady, kterými mi vysvětlovala laboratorní taje analýz a za pomoc s analyzováním dat. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Anně Bryjové za odborné rady a pomoc v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mi jakýmkoliv způsobem pomohli či poradili. V neposlední řadě děkuji za poskytnutí grantů, a to konkrétně ČZU (CIGA 20114217) a částečně Grantové agentuře ČR (P206/08/1281, P506/10/0716). Bez těchto finančních prostředků by nebylo možné analyzovat získané vzorky.

Abstrakt

K rozpoznání patogenních struktur jsou imunitním systémem vytvořeny tzv. PRR receptory. Studium polymorfismu těchto PRRs stále roste. Nejvíce zkoumanými receptory jsou tzv. toll-like receptory (TLRs), kde je vysoká mezidruhová variabilita. Ta je důležitá pro pochopení selektivních tlaků na TLRs. Většina prací se omezuje na lidské populace nebo na laboratorní zvířata a v posledních letech i na hospodářská zvířata. Skupina ptačích TLRs zahrnuje 10-12 genů. Tyto geny jsou však popsány především u modelových druhů ptáků a jejich variabilita v přirozených populacích není známa. V této studii jsem se zaměřila na mezi populační variabilitu genu pro TLR4 u koroptve polní (*Perdix perdix*) mezi evropskými populacemi. Se specifickými primery byl osekvenován vazebný úsek LPS genu TLR4 uvnitř exonu 3 cca 1000bp. Zároveň byl osekvenován kontrolním neutrálním genem (mtDNA) tzv. D-loop, jehož vazebný úsek činí cca 520 bp. U zanalyzovaných 74 jedinců z 6 evropských populací pro TLR4 bylo popsáno 16 nukleotidových haplotypů a 11 aminokyselinových haplotypů. Bylo zjištěno 5 synonymních substitucí a 8 nesynonymních substitucí. Nebyla zjištěna zřejmá populační struktura v TLR4.

Klíčová slova: koroptev polní, *Perdix perdix*, toll-like receptory, TLR4, variabilita

Abstract

The immunity system creates so called PRR receptors that recognize pathogen structures. The polymorphism studies of the PRRs are growing. The most studied receptors are Toll-like receptors that are characterized by a high intra-species variability. This intra-species variability is important for the understanding of selective pressures on TLR receptors. Most studies focus on human populations or laboratory animals and recently farmed animals. Group of avian TLRs includes 10-12 genes. However, those genes are described mainly in model bird species and their variability in wild populations is not known. This study focuses on inter-population variability of gene for TLR4 in Grey partridge (*Perdix perdix*) from various European populations. Specific primers were used for sequencing of LPS binding region gene TLR4 within exon 3; length of 1000bp. Further, the TLR4 was

sequenced using the control neutral gene (mtDNA), so called D-loop, whose binding region length is approx. 520bp. I analysed TLR4 in 74 individuals from 6 European populations. I described 16 nucleotide haplotypes and 11 amino acid haplotypes. I also identified 5 synonymous substitutions and 8 nonsynonymous substitutions. Evident population structure of TLR4 was not found.

Keywords: grey partridge, *Perdix perdix*, TLR4, toll-like receptors, variability

Seznam zkratk.....	8
1 Úvod	10
2 Cíle práce:	12
3 Genetický polymorfismus	13
4 Pattern recognition receptory (PRRs) a jejich polymorfismus	16
4.1 Toll-like receptory (TLRs).....	18
4.2 Signalizace TLRs	21
5 Polymorfismus TLRs – TLR4 a TLRs u ptáků	24
6 Vlivy na variabilitu populací z chovů	26
7 Metodika a materiál	27
7.1 Vzorke	27
7.2 Izolace DNA a Sekvence DNA.....	27
7.3 Hodnocení polymorfismu.....	29
8 Výsledky.....	30
9 Diskuze.....	34
10 Závěr	36
Literatura:.....	38
Příloha	47

Seznam zkratek

AP-1	activator protein 1
ATP	adenosintrifosfát
BCR	receptor B-lymfocytů (<i>B-cell receptor</i>)
CD	diferenční antigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CLR	lektinové receptory C-typu (<i>C-type lectin receptor</i>)
CpG	úseky bakteriální DNA bohaté na cytosin a guanin
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsRNA acid)	dvouřetězcová kyselina ribonukleová (<i>double-stranded ribonucleic acid</i>)
ECD	extracelulární doména
HMGB1	<i>high-mobility group box 1</i>
HSP	protein teplotního šoku (<i>heat shock protein</i>)
IRAK	kináza asociovaná s receptorem pro interleukin 1 (<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>)
IRF	regulační faktor interferonů (<i>interferon regulatory factor</i>)
LPS	liposacharid
LRR	opakující se sekvence bohatá na leucin (<i>leucin-rich repeat</i>)
MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>
MAPK	mitogenem aktivovaná protein-kináza (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MD-2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	informační ribonukleová kyselina (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina (<i>mitochondrial DNA</i>)
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response protein</i>

NF κ B	jaderný faktor kappa B (<i>nuclear factor-kappa B</i>)
NK	přirozený zabíječ (<i>natural killer</i>)
NLR	<i>nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing family receptors</i>
NOD	oligomerizační doména vázající nukleotidy (<i>nucleotide binding and oligomerization domain</i>)
PAMP	<i>patogen-associated molecular pattern</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGN	peptidoglykan
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RLR	retinoic acid-inducible gene-like receptory
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
ssRNA	jednořetězcová kyselina ribonukleová (<i>single-stranded ribonucleic acid</i>)
TAK1/TAB	<i>transforming growth factor-β-activated kinase 1/TAK1-binding protein 1</i>)
TCR	receptor T-lymfocytů (<i>T-cell receptor</i>)
TIR	Toll-interleukin-1 receptor
TIRAP	Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein
TLR	toll-like receptor
TNF	faktor nekrotizující nádory (<i>tumor necrosis factor</i>)
TRAM	adaptorový protein podobný TRIF (<i>TRIF related adaptor molecule</i>)
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β

1 Úvod

V boji proti cizorodým, škodlivým strukturám se u organismů vytvořil různě komplikovaný imunitní systém (Pasare et Medzhitov 2005). Ten se v průběhu evoluce u jednotlivých druhů adaptoval podmínkám životního prostředí a jejich změnám. Evolučně se vyvíjel a přizpůsoboval především díky působení parazitů. Parazit je organismus, který v životní fázi či k životu potřebuje cizí organismus (hostitele) jako zdroj potravy i jako stálé nebo dočasné životní prostředí, a tím mu přímo nebo nepřímo škodí (Begon et al. 2010). Mezi parazity a jejich hostiteli probíhá neustálá koevoluce, která přispívá ke vzniku adaptivních změn tělesné i funkční struktury na obou stranách (Flegr 2009). Tyto interakce lze pak uplatnit např. v humánní i veterinární medicíně, epidemiologii nebo zoohygieně.

Mechanismy imunitního systému můžeme rozdělit na složku vrozenou (nespecifickou) a získanou (specifickou, adaptivní). Jak bylo zjištěno, obě složky se navzájem ovlivňují a pro správné fungování imunitní odpovědi je nelze od sebe oddělit (Pasare et Medzhitov 2005; Hořejší et Bartůňková 2009). Adaptivní složka je organizovaná především díky lymfocytům B a T. Každý z lymfocytů má receptory, které obsahují povrchové imunoglobuliny, a to BCR (B-cell receptory) a TCR (T receptory). Ty k aktivaci imunitní odpovědi potřebují signály přicházející od vrozené složky imunitního systému. (Hořejší et Bartůňková 2009). B a T lymfocyty jsou vysoce specializované a každý z nich obsahuje specifický receptor se specifickým antigenem. Rozmanité spektrum T a B lymfocytů, které jsou v organismu předem připraveny, umožňuje setkání individuální buňky se specifickým antigenem, a tím vyvolají aktivaci, zrání a proliferaci buněk (tzv. klonální expanzi). K adaptivní imunitě také patří hojně studované MHC glykoproteiny (hlavní histokompatibilní komplex), které vážou peptidové fragmenty proteinů, a tím umožňují rozpoznání antigenu T lymfocytů (Hořejší et Bartůňková 2009). Díky imunologické paměti je u získané imunity každá její buňka předurčena k rozpoznání pouze jediného druhu antigenu a při opakovaném setkání vyvolává o něco rychlejší imunitní reakci, tzv. sekundární (anamnestickou) odpověď. Nevýhodou specifické imunity je především doba, kdy dojde k úplnému rozvoji imunitní odpovědi (zpravidla několik dnů až týdnů; Hořejší et Bartůňková 2009), oproti vrozené imunitě, která je fylogeneticky starší a poskytuje první linii obrany vůči patogenům. Patogenem se rozumí parazit, který je schopen způsobit onemocnění svému hostiteli (Clayton et Moore 2004).

Buňky vrozené imunity jsou nespecificky zaměřené proti širokému spektru patogenů a reagují v řádu hodin. Buňkám vrozené imunity chybí imunologická paměť, a proto příslušné buňky reagují se stejnou intenzitou na setkání s antigenem, a to i po opakujícím se vzájemném kontaktu (Hořejší et Bartůňková 2009).

Mezi receptory vrozené imunity patří z buněčné složky např. NK-buňky (z angl. *natural killer cells*), fagocyty (neutrofilů, makrofágy, dendritické buňky), eozinofily, fagocyty, interferony, aj. K účinné reakci proti invazi mikrobiálních patogenů využívá vrozená část imunitního systému především tzv. pattern recognition receptory (PRRs). Ty rozpoznávají struktury parazita, tzv. PAMPs (*patogen-associated molecular patterns*, např. lipopolysacharidy, flagelin, peptidoglykany) a MAMPs („*microbe-associated molecular patterns*). MAMPs se vyskytují běžně u mikrobů, nikoliv u savců (Akira et al. 2006). Vyvolávají imunitní odpověď hostitele prostřednictvím různých signálních drah (Janeway et Medzhitov 2002). Některé však iniciují odpověď na neinfekční zánětlivé poškozené tkáně hostitele, tzv. DAMPs (*damage – associated molecular patterns*), což bývají jaderné nebo cytosolické proteiny (Oppenheim et Yang 2005). Nejznámějším PRRs receptorem jsou tzv. toll-like receptory (TLRs).

Koroptev polní (*Perdix perdix*) z rodu hrabaví (*Galliformes*) se vyskytuje v celé Evropě až po střední Asii. Úspěšně byla introdukována i do Severní Ameriky. V České republice byla ještě na počátku 20. století hojnou lovnou zvěří. Její stavy v 70. letech 20. stol., především vlivem intenzifikace zemědělství a likvidace remízků, prudce poklesly (Hudec et al. 1977). V dnešní době je snaha na znovunavrácení mnoha druhů a jedním z nich je právě i koroptev. Reintrodukce druhů přináší svá úskalí a jedním z nich by mohlo být genetická nekompatibilita jedinců. Proto se v rámci své diplomové práce zaměřím na PRRs konkrétně na TLR4 u koroptve polní a jeho variabilitu. Variabilita TLR4 byla v rámci této práce studována u divoce žijících jedinců a jedinců chovaných v zajetí. Zároveň jsem porovnávala variabilitu TLR4 mezi různými evropskými populacemi. Výsledky by mohly napomoci k porozumění problémů v odchovu a znovuzavedení populací koroptve polní do volné krajiny.

2 Cíle práce:

Cílem mé práce bude porovnat celkovou variabilitu genu TLR4 u koroptve polní. Dále bude porovnána mezi-populační variabilita mezi jednotlivými evropskými populacemi, a v neposlední řadě variabilita TLR4 u divoce žijících a uměle chovaných populací. Tyto analýzy provedu na základě molekulárně genetických metod. Výsledné vzorky budu analyzovat pomocí genetických programů. Studie může být použita pro další analýzy imunologických studií, především zhodnocení záměn nukleotidů na přestavbu aminokyselin a její vliv na predikci onemocnění.

3 Genetický polymorfismus

Vlivem různých přírodních mechanismů (selekce, genetický drift, migrace, mutace, inbreeding atd.) se jedinci v rámci populace geneticky liší. Jejich geny (sekvence nukleotidů v řetězci DNA, které kódují specifické proteiny) mají různou formu, tzv. alely. Ty mohou ovlivňovat jak vývoj, tak i fyziologii jedince (Hendrick 2005). Výsledkem je tzv. genetický polymorfismus, který je podmíněn výskytem dvou a více alel v lokusu dané populace, a zároveň musí frekvence jeho výskytu v populaci přesahovat 1% (Flegr 2009). Mezi hlavní typy genetického polymorfismu patří bodový polymorfismus a polymorfismus repetivních sekvencí. K bodovému polymorfismu patří především substituce SNP (*single nucleotide polymorphism*). Známe dvě substituce a to tzv. tranzici, kdy dochází k záměně purinu za purin nebo pyrimidinu za pyrimidin a tzv. transverzi, kdy dochází k záměně purinu za pyrimidin nebo k záměně pyrimidinu za purin. Dále k bodovému polymorfismu patří delece (ztráta úseku sekvence), inserce (vlození určitého úseku sekvence), translokace (přesun části sekvence), inverze (změna orientace sekvence).

V sekvenci deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je zapsána většina biologicky významných informací, které určují fenotyp organismu (tedy morfologické, fyziologické a biochemické charakteristiky). Tyto informace jsou tvořeny především různými aminokyselinami v proteinech, kódovanými daným lokusem (Frankham et al. 2002; Flegr 2009). Stejná aminokyselina je kódovaná celou řadou kodonů, tj. nukleotidových tripletů, a záměna nukleotidu v kodonu se nemusí na struktuře proteinu nijak projevit. Jsou to tzv. synonymní záměny (silent substitutions; samesense), a jejich působení je z hlediska přirozeného výběru neutrální. Mohou však ovlivňovat organismus působením na regulaci exprese daného genu a na sekundární strukturu syntetizované RNA, její stabilitu i intenzitu translace (Flegr 2009). K většině změn dochází mimo samotné geny v tzv. nekódujících oblastech, které tvoří převážnou část genomu (Gregory 2005). Opakem jsou mutace se změnou smyslu (nesynonymní missense), ke kterým dochází nahrazením jedné aminokyseliny jinou. Pokud je aminokyselina nahrazena aminokyselinou podobných fyzikálně-chemických vlastností, jedná se o tzv. konzervativní záměnu. Tyto záměny nemusí výrazněji měnit terciální strukturu a biologickou funkci proteinu. Frekvence nahrazení se u jednotlivých aminokyselin liší. Například záměna glycinu nebývá tak

častá jako záměna asparaginu (Flegr 2009). Rozdíly v rychlosti evoluce jednotlivých proteinů lze z velké části vysvětlit právě různým obsahem konzervativních a nekonzervativních aminokyselin. Dalším typem záměnových mutací jsou mutace nesmyslné (nonsense). Při těchto mutacích vzniká z kodonů pro aminokyselinu některý ze tří terminačních kodonů. V tomto místě, při translaci tedy dojde k předčasnému ukončení syntézy proteinového řetězce. Důsledkem je drastická změna struktury proteinu a ve většině případů vzniká nefunkční protein (Flegr 2005).

Polymorfismus u populací se udržuje několika mechanismy. Vlivem faktorů životního prostředí nastává u populací tzv. genetický drift. U tohoto náhodného jevu dochází ke změně frekvence alel, bez ohledu na jejich selektivní výhodu či nevýhodu. Genetický drift se více projevuje u malých populací (Primack et al. 2011). K zvyšování či snižování frekvence alel dochází také vlivem přírodního výběru (tzv. selekce). Souhrnně je pro tyto mechanismy zažit název balancující selekce (*balancing selection*). Mezi ní patří tzv. frekvenčně závislá selekce (*frequency dependent selection*), která zahrnuje dva typy: pozitivní a negativní selekci. Pokud alela či kombinace alel zvyšuje přežívání a reprodukční úspěšnost organismů, bude frekvence této alely či kombinace alel v následujících generacích postupně stoupat (Frakham 2005; Willi et al. 2006). Jestliže ale tato alela či kombinace alel bude jedince znevýhodňovat, její frekvence bude klesat (tzv. negativní selekce; Mayr 2001). Za další selekční tlak je považována selekce ve prospěch heterozygotů, kdy heterozygoti mají vyšší fitness, než homozygoti. Příkladem tohoto mechanismu je rezistence k malárii při srpkovité anémii. Mutantní gen u homozygotů působí závažné problémy a nositelé postižení srpkovitou anémií brzy umírají. Zatímco heterozygoti s touto alelou mají sice snížené fitness díky srpkovité anémii, ale odolávají malárii, kterou způsobuje krevnička (rod *Plasmodium*; Aidoo et al. 2002). Frekvenci selekčně neutrálních nebo i lehce nevýhodných alel může být ovlivněna tzv. evolučním svezením se (*hitch-hiking effect*). To znamená, že pokud je gen polymorfní, pak mohou být i sousední geny vysoce variabilní (Kamau et Charlesworth 2005).

Nejvíce používanými molekulárně genetickými metodami na zkoumání polymorfismu DNA jsou molekulární markery (úseky DNA, které jsou jasně definovány; Šmarda et al. 2005). Selektivní nezávisť, kdy variabilita je ovlivněna

genetickým driftem, mutační rychlostí a migrací, je jeden z hlavních předpokladů k využití DNA markerů. Těmito neutrálními markery, které se neprojevují ve fenotypu jedince a nepodléhají selekci, analyzujeme genetickou variabilitu. V posledních letech se ve studiích polymorfismu používají především jednonukleotidové polymorfismy (SNP), mikrosatelity (Höglund 2009) a mtDNA, která na rozdíl od jaderné DNA nepodléhá rekombinacím a je tak vhodná k rekonstrukci fylogenetických stromů (Allendorf et Luikart 2007). Za nejvariabilnější část z hlediska nukleotidových substitucí, krátkých inzercí a delecí mtDNA je považován kontrolní region (control region, tzv. D-loop; Liu et al. 2002).

Genetická variabilita u funkčně důležitých genů se podílí na rozvoji imunitních odpovědí a těší se velkému zájmu evolučních biologů. Tyto geny se vyvíjejí rychleji než ostatní lokusy v genomu (Khakoo et al. 2000; Zaluska et al. 2000; Sachidanandam et al. 2001; Downing et al. 2009) v důsledku selektivních tlaků spojených s neustále se měnícími patogeny a parazity (Lively et Dybdahl 2000; Kuijl et Neefjes 2009). Hledání polymorfismů bylo zaměřeno především na geny kódující hlavní složky vrozené imunity, zejména pattern recognition receptory (PRRs; Novák 2014). Zejména Toll-like receptory (TLRs) přitahují pozornost imunologů a evolučních biologů v posledních letech, protože sdružují mnoho TLRs polymorfismů u lidí s rezistencí nebo citlivostí k infekčním chorobám (Schröder et Schumann 2005; Barreiro et al. 2009; Werling et al. 2009).

4 Pattern recognition receptory (PRRs) a jejich polymorfismus

PRRs hrají klíčovou roli v obraně proti cizorodým patogenům. Mají různé struktury, které jsou specializované na různé antigeny, přičemž využívají různé signální dráhy. Mezi buňky, které obsahují PRRs patří např. makrofágy, dendritické buňky, neutrofilie nebo NK buňky, ale i B a T lymfocyty (Farnell et al. 2003). PRRs se nacházejí i na buňkách endotelu, buňkách střevních epitelů aj. Prozatím známe 5 zástupců PRRs: toll-like receptory (TLRs), NOD-like receptory (NLRs), RIG-I-like receptory (RLRs), C-type lectin receptory (CLRs) a pentraxiny (Palsson-McDermott et O'Neill 2007). Jako první PRRs byly charakterizovány TLRs (Akira et al. 2006). Zatímco TLRs a CLRs jsou vyjádřeny v buněčných membránách, RLRs a NLRs jsou exprimovány do cytoplazmy, kde jsou klíčové senzory intracelulárních mikrobů a signály nebezpečí (Mogensen 2009).

K aktivaci PRRs je zapotřebí specifického ligandu, který spouští imunitní odpověď. Vazba ligandu na specifický receptor a zapojení specifických signálních drah vede k aktivaci některého z transkripčních faktorů, např. AP-1, NFκB, IRFs (Bonizzi et Karin 2004). Důležitost těchto receptorů spočívá ve schopnosti rozpoznat celou řadu chemických struktur, které jsou součástí povrchu patogenů (PAMPs). Těmito strukturami (mikrobiálními produkty) jsou např. lipopolysacharidy (LPS, zvané též endotoxiny) gramnegativních bakterií, peptidoglykan (PGN), mikrobiální peptidové složky (např. flagelin), kyselina teichoová grampozitivních bakterií, různé mikrobiální lipopeptidy, nemetylované CpG regiony bakteriální DNA a ssRNA virů, atd. (Akira et al. 2006). Pro funkci mikroorganismů jsou tyto látky nezbytné a nemohou fungovat bez případné stopy těchto složek (Akira et al. 2006). Některé PRRs indikují endogenní molekuly („signály nebezpečí“), které při poranění tkáně mohou stimulovat podobné, avšak mírně odlišné imunitní odpovědi. Tyto tzv. DAMPs se velmi liší v závislosti na typu buňky (epiteliální nebo mezenchiální). Intracelulární proteiny (jaderné nebo cytosolické) jsou např. proteiny tepelného šoku (HSP; heat shock protein) nebo HMGB1 (High-mobility group box 1) a

bílkoviny získané z extracelulární matrix. Příkladem neproteinových DAMPs jsou ATP, kyselina močová v krvi, sulfát heparinu a DNA (Piccinini et Midwood 2010).

Polymorfismus receptorů vrozené imunity je v současnosti studován převážně v lidské populaci v souvislosti s infekčními a autoimunitními chorobami (Cook et al. 2004; Hawn et al. 2005). Nesmíme však opomenout studie laboratorních či hospodářských zvířat, které se věnují problematice onemocnění, a to především pro jejich ekonomický význam (Opsal et al. 2006; Lui et al. 2011). Tyto studie srovnávají genotyp zdravých a nakažených zvířat, jehož úskalím je výběr kontrolních vzorků. Výzkum polymorfismu PRRs naráží na svá specifika. Lidská populace nepodléhá selekci, laboratorní zvířata jsou často vysoce inbrední a na hospodářská zvířata působí především umělá selekce, jejímž cílem je dosáhnout vyšší produktivity, a to i za cenu snížení rezistence zvířat k infekčním chorobám. Problémem je také nejen odlišné genetické pozadí jedinců, ale i multifaktoriální původ mnohých chorob a vliv mnoha genů. Variabilita v alelách proteinů pozměňuje funkci proteinu a často i imunitní odpověď na PAMPs nebo DAMPs (Hawn et al. 2005).

Studie poukazují na souvislost mezi výskytem choroby a variabilitou alel. Variabilita alel často modifikuje funkci proteinů, a tím dochází k celkové změně imunitní odpovědi (Hořejší et Bartůňková 2009). Proto některé alely působí pro- nebo naopak protizánětlivě, a tím může dojít k ovlivnění míry rezistence k určité nemoci. Polymorfismus jednotlivých PRRs má vliv na jejich citlivost k některým infekčním chorobám nebo naopak na zvýšení rezistence vlivu patogenů. Například polymorfismus TLR5 podmiňuje citlivost k infekci bakteriemi *Legionella pneumophila* (Hawn et al. 2003), ale také zvyšuje rezistenci vůči některým autoimunitním onemocněním (Crohnova choroba anebo systémový lupus erythematoses; Hawn et al. 2005).

4.1 Toll-like receptory (TLRs)

Toll-like receptory se v posledních letech řadí mezi nejstudovanější receptory vrozené imunity (Kumar et al. 2009). Zároveň patří mezi nejznámější a nejdůležitější skupinu PRRs receptorů. Za objevem receptorů vrozené imunity stojí Toll protein bezobratlých, který původně plnil funkci jako receptor účastníci se morfogeneze. Byl identifikovaný u octomilky (*Drosophila melanogaster*) v roce 1985 (Stein et al. 1991). Později bylo prokázáno, že Toll protein u octomilky přispívá k odolnosti proti houbovým patogenům jako je např. *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre et al. 1996). První TLR byl identifikován v roce 1997 a označení získal na základě tohoto homologního Toll proteinu, objeveného u octomilky (Medzhitov et al. 1997). TLRs geny kódují pole receptorů přirozené imunity a funkčně se vzájemně doplňují. Při hledání TLRs receptorů u předchůdců obratlovců se zjistilo, že předchůdce genu přijal funkci imunity přibližně před 500 miliony lety, TLR10 přibližně před 300 miliony lety, zatímco savčí TLR4 před 180 milióny lety a TLRs 3, 5, 7 a 8 se odlišily před 150 miliony let (Du et al. 2000).

TLRs jsou prvním typem transmembránových glykoproteinů, které působí jako strážci vrozeného imunitního systému a jejichž působení je nezbytné k zahájení imunitní odpovědi u obratlovců (Iwasaki et Medzhitov 2010). Molekuly TLRs jsou obvykle složeny z extracelulární domény (ECD) bohaté na leucin (LRR; leucine-rich repeat) podkovovitého tvaru (Jin et al. 2007). Ta je odpovědná za zprostředkování uznání PAMPs. Dále jsou složeny z krátkého transmembránového úseku a C-terminální intracelulární domény homologní pro receptor Toll/IL-1 domény (TIR). Tato doména aktivuje následné signální dráhy (Gay et Gangloff 2007; Kawai et Akira 2011) a mění aktivitu některých transkripčních faktorů (např. NF- κ B) a zprostředkovává expresi dalších signálních molekul (viz signalizace TLRs). TLRs jsou exprimovány do vnější buněčné membrány (např. TLR1, 2, 4, 5, 6 a 10), kde reagují především na bakteriální produkty specifické pro bakterie, nikoliv na hostitelské produkty PAMPs. Nebo jsou exprimovány do membrány endosomů a lysosomů (např. TLR3, 7, 8, 9), kde reagují především na řetězce nukleové kyseliny na bázi PAMPs (Iwasaki et Medzhitov 2004). Rozpoznání patogenů pomocí různých receptorů (TLR1-TLR10) není jediná funkce TLRs. TLRs se nachází na

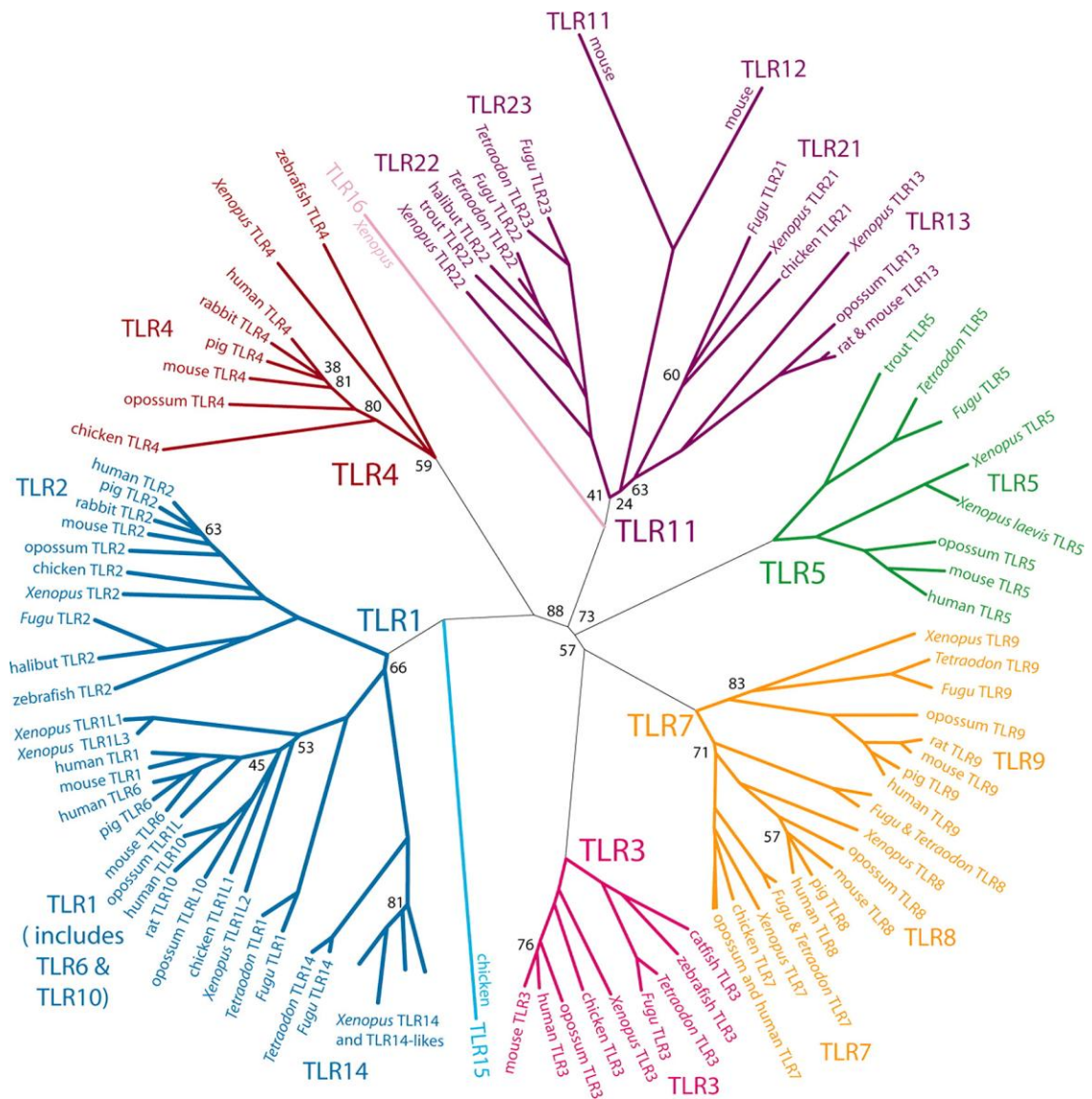
dendritických buňkách, které zahajují druhou, antigenně specifickou imunitní odpověď (Garlanda et al. 2009).

TLRs a jejich signální dráhy mají vliv, kromě aktivace různých protizánětlivých cytokinů, chemokinů aj., i na aktivaci získané imunity. Například na fagocytózu bakterií a prezentaci cizorodých antigenů T-lymfocytů. Nebo na aktivaci CD80, CD60 i MHC komplexu, protože vedení signálu přes TLRs je zakončeno mj. i zvýšením exprese těchto kostimulačních molekul (Takeda et Akira 2005; Brownlie et Allan 2011). Nebo indukce apoptózy v případě vazby PRRs s některými endogenními molekulami DAMPs. Dále byl u TLR9 prokázán i vliv na proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů (Eckl-Dorna et Batista 2009).

Zpočátku byla věnována pozornost pouze lidským TLRs, postupem času směřovala i na další obratlovce. Každý druh obratlovce je vybaven rodinou TLRs (Roach et al. 2005). TLR multigenní rodina se skládá z velkého počtu genů (10-15 genů) s podstatnými rozdíly uvnitř a mezi skupinami obratlovců (Roach et al. 2005, Werling et al. 2009). Podle fylogenetické analýzy se TLRs rozdělily do šesti skupin (Roach et al. 2005). V první skupině TLR2 jsou zastoupeny TLR1, TLR2, TLR6, TLR10, TLR14. Dalšími skupinami jsou TLR3, TLR4, TLR5, TLR7/8/9 a poslední skupina TLR11. K ní patří TLR11, TLR12, TLR13, TLR21, TLR22 a TLR23. Některé TLRs jsou společné pro všechny obratlovce, zatímco jiné jsou omezeny pouze na určité linie obratlovců (Vinkler et Albrecht 2009). Například TLR14 byl nalezen u mihulí, ryb a obojživelníků, TLR21 u obojživelníků, kostnatých a u ptáků a TLR23 u čtverzubců (Roach et al. 2005). Naopak pro TLR6, který byl nalezen u savců, nebyl nalezen ortolog (gen, kódující proteiny se stejnou funkcí) u ryb (Aoki et al. 2008). V poslední době byly popsány TLR12 a TLR13 u myší, které však nejsou plně popsány (Beutler 2005). U ptáků bylo dosud objeveno deset až jedenáct TLRs (Temperley et al. 2008; Cormican et al. 2009, Brownlie et Allan 2011).

Ptačí TLRs receptory rozpoznávají podobné ligandy jako jejich protějšky u savců (Brownlie et Allan 2011). Přirozeným ligandem pro TLR je LPS (Keestra et al. 2008), pro TLR5 flagellin (Keestra et al. 2008), a TLR7 virové jednovláknové RNA a syntetická antivirotika (Iqbal et al 2005; Brownlie et al. 2009). Současná znalost ptačích TLRs je založena na studiích kura domácího (*Gallus gallus domestica*), kde byly identifikovány všechny TLRs (Leveque et al. 2003; Tsukada et al. 2011). Z nich

TLR2a, TLR2b, TLR3, TLR4, TLR5 a TLR7 jsou jasnými ortology pro savčí TLRs. Ptačí TLR1LA a TLR1LB se vyvinuly z TLR2 přes dvojitou genovou duplikaci v rané evoluci (Temperley et al. 2008). Tyto duplicity byly paralelní ke zdvojení TLR1 do TLR1, TLR6 a TLR10 u savců. Ptačí TLR21 se zdá být ortologní k TLR21 nalezenému u ryb a obojživelníků. TLR15, fylogeneticky zařazen do TLR2 skupiny, je pravděpodobně jedinečný u ptáků (Brownlie et Allan 2011). TLR9 u ptáků vymizel, ovšem jeho funkci převzal TLR21 (Alcaide et Edwards 2011).



Obr.č.1. Toll-like receptory obratlovců (převzato z Roach et al. 2005)

Každý z TLRs rozpoznává odlišné PAMPs odvozené od různých mikrobiálních patogenů včetně virů, bakterií, hub a prvoků (Akira et al. 2006). Předpokládá se, že většina TLRs tvoří homodimery (Saitoh et al. 2004) a některé TLRs vytváří mezi sebou páry (tzv. heterodimery). Ty se sdružují do složitějších komplexů a mají funkci jako vlastní receptory (proti mikrobiálním produktům), např. TLR1 s TLR2, TLR2 s TLR6 (Farhat et al. 2008). Způsob rozpoznání patogenů závisí na jednotlivých TLRs, které se odlišují svými ligandy. Například ligandem pro TLR3 je virová dsRNA a mRNA, produkované v průběhu replikace viru (Takeda et al. 2002). TLR7 a TLR8, jsou aktivovány jednovláknovou RNA (ssRNA; Diebold et al. 2004). Pro TLR5 je ligandem bakteriální flagelin, což je hlavní složka mobilního aparátu (Hayashi et al. 2001). TLR4 je aktivovaný především na LPS. Na jeho snímání se podílí molekuly MD-2 a CD14 (Roach et al. 2005; Kim et al. 2007; Akashi-Takamura et al. 2008; Lehnardt et al. 2008). Funkce TLRs je pevně spojena s jejich lokalizací především v tkáních a různých typech buněk (Takeda et al. 2002). Například u TLR1-10 skotu a ovcí byla prokázána exprese TLRs v celém organismu. Transkripty TLRs u ovcí byly prokázány v krevních mononukleárních buňkách, alveolárních makrofágách, keratinocytech a lymfatických uzlinách (Chang et al. 2009). Dobře studovaný TLR4 je vyjádřen v makrofágách a epitelálních buňkách plic, tenkého střeva, jater, sleziny, ledvin a rohovky a to u prasat, psů a skotu (Thirumurugan et al. 2010).

4.2 Signalizace TLRs

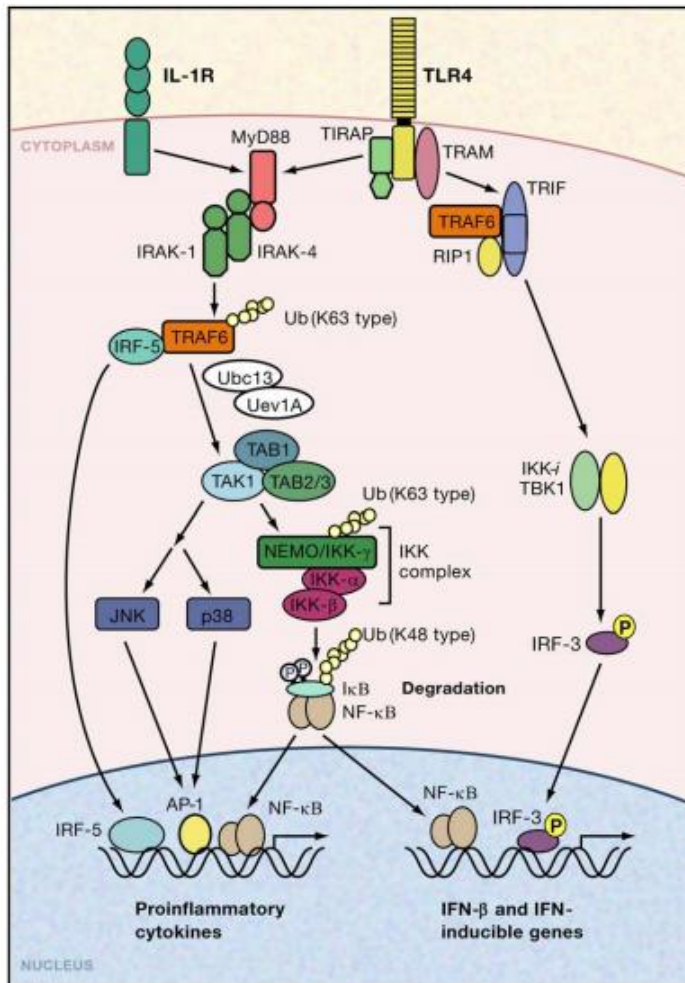
Vysoce konzervovaná signalizační kaskáda je aktivována speciálními ligandy, rozpoznáním specifických částí bakteriálních komponentů, buněčných stěn, virové RNA a jiných segmentů patogenů. PRRs indukovaná signální transdukcí vede k aktivaci fagocytů, genové expresi a k syntéze širokého spektra molekul, včetně cytokinů, chemokinů, molekul buněčné adheze, imunoreceptorů (Akira et al. 2006). Tyto látky společně organizují včasnou odpověď hostitele k infekci a zároveň představují důležitou vazbu na adaptivní imunitní odpověď (Mogensen 2009). Cormican et al. 2009 uvádí, že právě odlišnosti v signalizačních dráhách TLRs jsou zodpovědné za specifické receptory k určitým ligandům, ale také jsou pravděpodobně zodpovědné i za druhovou specifitu TLRs.

Všechny TLRs zahájí signalizaci dimerzací tedy vytvořením homodimeru nebo heterodimeru. TLRs obsahují TIR doménu, která zajišťuje přenos signálu dále do buňky, za pomoci různých kombinací těchto adaptérových molekul: MyD88, TIRAP (Mal), TRIF – (TICAM-1), TRAM nebo SRAM (O'Neill, 2008). Proteiny, obsahující TIR doménu, aktivují kinázy (fosforylační enzymy). Tím dojde k vlastnímu přenosu signálu, který aktivuje některý z transkripčních faktorů NF- κ B a AP-1, což vede k expresi protizánětlivých cytokinů a chemokinů (Akira et al. 2006). Signální dráhy TLRs lze rozdělit na MyD88 dependentní a MyD88 independentní - tzv. TRIF dependentní.

Signál vedený cytosolovým proteinem myeloidní diferenciace primární odpovědi 88 (MyD88) dependentní je podobný jako signál vedený přes IL-1 receptor. MyD88 interaguje s adaptorovou doménou IRAK-4 („IL-1R-associated kinase“), který aktivuje IRAK-1. Ten asociuje s TRAF-6 („tumor necrosis factor receptor-associated factor 6“), který později funguje jako E3 ubikvitin ligáza, která katalyzuje několikastupňovou ubikvitinaci (Brownlie et Allan 2011). Přenos signálu poté nastává dvěma různými signálními dráhami. První dráha spustí transkripční faktor AP-1 („activator protein 1“) za pomoci MAP-kináz (MAPK – „mitogen- activated protein kinase“). Druhá signální dráha aktivuje komplex TAK1/TAB („transforming growth factor- β - activated kinase 1/TAK1-binding protein 1“) a ten vede k činnosti další komplex I κ B kinázy (IKK). Po fosforylaci a následné degradaci I κ B dochází k uvolnění a spuštění transkripčního faktoru NF- κ B („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“). Tímto způsobem je de facto spuštěna odpověď mnohých protizánětlivých cytokinů jako je např. TNF α ("tumor necrosis factor α ") a mnoho dalších (Takeda et Akira 2005). S výjimkou TLR3, má MyD88 u všech ostatních TLRs vliv na expresi protizánětlivých cytokinů. Později byla objevena struktura TIRAP („TIR domain-containing adaptor protein“, označovaná jako MAL-„MyD88-adaptor-like“). TIRAP je velmi podobná proteinu MyD88, kde výslednou expresí jsou opět protizánětlivé cytokiny. Má význam například u TLR2 a TLR4 (Takeda et Akira 2005).

MyD88 independentní dráha, též označená jako TRIF („TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β “), jejímiž adaptorovým proteinem je TRAM („TRIF-related adaptormolecule“), se vyskytuje u TLR3 a TLR4. Aktivace TLR3, 7, 8 a 9 způsobuje detekci virové nukleové kyseliny a indukuje tvorbu interferonů I. typu (Uematsu et

Akira 2007). Pro názornost uvádím tabulku vedení signálu signálními dráhami MyD88 dependentní a MyD88 independentní savčího TLR4.



Obr.č.2 Signální dráhy TLRs (Akira et al. 2006).

5 Polymorfismus TLRs – TLR4 a TLRs u ptáků

Vysoká míra polymorfismu TLRs byla prokázána v mnoha studiích (Georgel et al. 2009) a je asociována s výskytem nemocí, jak infekčních tak autoimunitních a imunodeficientních chorob (Cook et al. 2004). Prozatím je známo několik TLR variant, kdy jejich výskyt zvyšuje riziko závažných infekcí u lidí, myší a, jak bylo zjištěno v nedávné době, i u skotu (Merx et al. 2006; Bhide et al. 2009). Například polymorfismus TLR2 (jeden nsSNP; (Arg753Gln) u lidí zvyšuje náchylnost na stafylokokové infekce, tuberkulózu, revmatickou horečku, na infekci močových cest (Lorenz et al. 2000; Tabel et al. 2007) a boreliózu (Schröder et al. 2005). Podobně lidský TLR5 zvyšuje citlivost na legionářskou nemoc (Hawn et al. 2003; Merx et al. 2006). Variabilita TLR7 je asociována s hepatitidou C (Shot et al. 2008). S dalšími nemocemi a infekcemi má spojitost mnoho dalších variant TLRs. Byla zkoumána i souvislost polymorfismu TLRs s výskytem rakoviny, protože jak se ukázalo, chronický zánět může být příčinou jeho vzniku. Například variabilita TLR3 asociuje s rakovinou nosohltanu (He et al. 2007) a variabilita TLR4 s rakovinou prostaty (Chen et al. 2005).

Navíc některé studie ukázaly, že polymorfismus genu pro TLR4 může ovlivňovat citlivost hostitelského organismu k některým chorobám (Misch and Hawn 2008). Beutler (2005) předpokládal, že mutace genu TLR4 u lidí bude náchylnější ke gram-negativním infekcím, jako je tomu u mutace receptoru Toll u octomilky, který je náchylnější k houbové infekci. Polymorfismus TLR4 u lidí je znám například za zvýšením rizika zánětlivých onemocnění, jako je ateroskleróza (Curtiss et Tobias 2009, Kiechl et al. 2002) nebo paradontóza (James et al. 2007), malárie (Ferwerda et al. 2009) či vznik rakoviny prostaty (Chen et al. 2005). Rovněž však variabilita TLR4 způsobuje náchylnost k *Mycobacterium tuberculosis* u myší (Abel et al. 2002), citlivost na salmonelózu u kuřat (Leveque et al. 2003), odolnost na gram negativní bakterie *N. meningitidis*, které způsobují chronickou a akutní meningitidu (Emonts et al. 2003; Rosenstein et al. 2001) nebo citlivost na bakteriální infekce mléčné žlázy u ovcí (Swiderek et al. 2006).

Přestože ptáci tvoří jednu z nejpočetnější skupiny na Zemi, není jim věnována taková pozornost. A to i přes jejich fyziologické podobnosti modelových druhů ptáků se

savci, které mohou sloužit jako ověření obecných imunologických vzorů (Kaiser 2007). Jak již bylo řečeno, známe deset ptačích TLRs, kterými jsou TLR1LA, TLR1LB, TLR2A, TLR2B, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR21 a TLR15 (citace). I když se počet studií o vývoji TLRs zvyšuje, u ptactva je v současnosti pouze několik studií, které se zaměřují na TLRs u různých druhů ptáků (Temperley et al. 2008; Vinkler et al. 2009; Alcaide et Edwards 2011). Dobře charakterizované geny pro TLRs byly popsány u kuřete (*Gallus gallus domesticus*) a z něj vychází předpoklady pro další studie (Temperley et al. 2008). Ty zahrnují zkoumání TLR1 u supa bělohlavého (*Gyps fulvus*; de la Lastra et de la Fuente 2007), TLR7 u kachny divoké (*Anas platyrhynchos*; MacDonald et al. 2008) a z řádu pěvců byla struktura TLR 4 popsána u zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata* ; Vinkler et al. 2009).

Za jeden z nejdůležitějších a nejvíce prozkoumaných PRRs lze považovat TLR4, protože slouží (mimo jiné) pro rozpoznání bakteriální infekce (Akira et al. 2006). TLR 4 funguje jako homodimer. Po navázání endotoxinu (lipopolysacharidu, LPS) na TLR4 dochází ke spuštění signální kaskády vedoucí k produkci imunomodulačních molekul, cytokinů (TNF). K aktivaci dochází za pomoci proteinu MD-2 („lymfocyte-antigen 96“) s kterým TLR4 tvoří vazebnou hydrofobní kapsu (Shimazu et al. 1999). MD-2 se nachází (alespoň u savců) v konkávním povrchu N-terminální a centrální subdomény. Do této kapsy, sloužící k vazbě ligandu, je LPS molekula převedena z receptoru CD14 (Cluster diferenciace 14). Přestože citlivost LPS je mnohem nižší u kuřat než u savců, TLR4 se podílí na LPS detekci u obou taxonů (Asea et al. 2000).

Predikce důsledků vlivu polymorfismu TLRs na fenotyp jedince usnadňuje skutečnost objevených polymorfismů ve vztahu k funkční doméně a to i před jeho experimentálním dokázáním. V současnosti nevíme moc o vztahu mezi polymorfismem TLR4 a prevalencí onemocnění u ptáků.

6 Vlivy na variabilitu populací z chovů

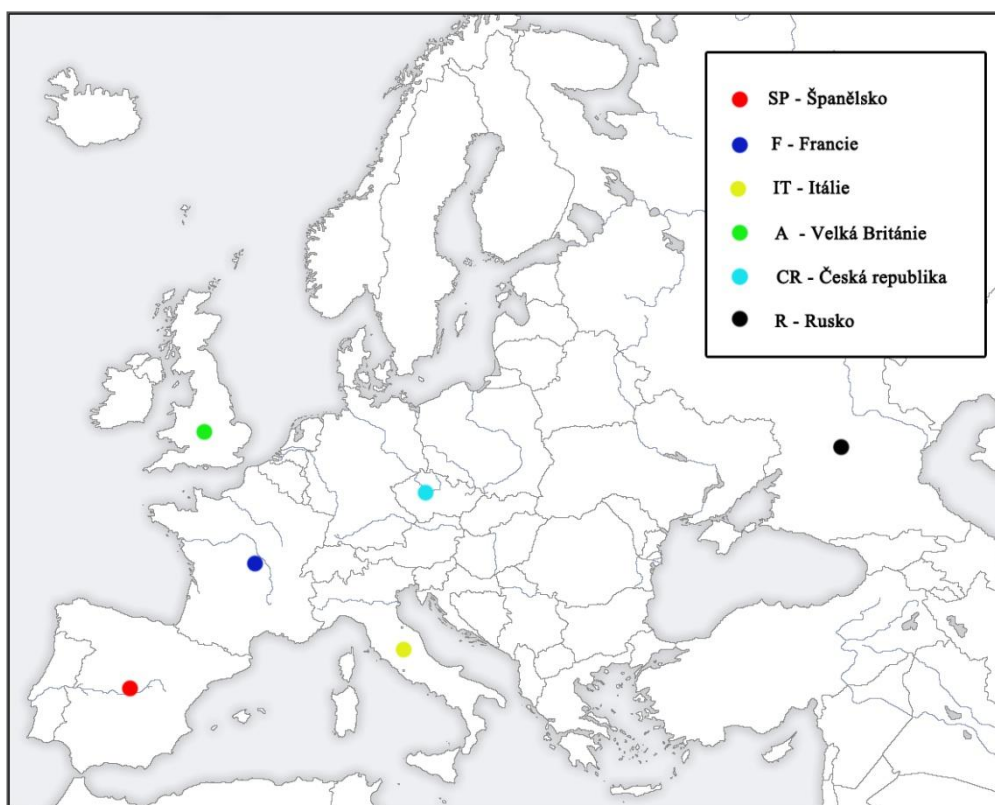
Genetická variabilita a adaptace na místní podmínky jsou klíčové složky genetické integrity, která předurčuje životaschopnost přírodních populací (Frankham 2005). Na volně žijící druhy působí mnoho vlivů, ke snížení či naopak zvýšení genetické variability. Například v důsledku introgresivní hybridizace s blízkými příbuznými poddruhy nebo druhy, dochází k zhoršení genetické struktury přírodních populací, což může vést k zániku hybridizací evolučně významných jednotek (Rhymer et al. 1996, Mank et al. 2004). Tímto zdrojem „hrozeb“ jsou především lidské aktivity, kdy vypouštíme do různých zeměpisných oblastí mnoho exotických organismů, populace s domestikovaným kmenem a různými infekčními chorobami a to vše je potenciálním oslabením genových zásob původních divokých populací (Mank et al. 2004; Randi, 2008). Navíc divoká zvěř je často využívána jako lovná zvěř a stává se tak předmětem intenzivního hospodaření. V posledních letech je cílem nárůst populace lovné a rybářské zvěře a jeho udržitelnost (Lahti et al. 2009). V chovu hospodářských zvířat má onemocnění závažný vliv jak na zdraví hospodářských zvířat a drůbeže tak na přenos nemocí, ale i na výkon (velikost snůšky atd.), kvalitu živočišných produktů a v důsledku má vliv na ekonomické ztráty (Lui et al. 2011). Doplnování stavů populací a jeho potenciální rizika byla předmětem několika studií (Mehner et al., 2009; Barbanera et al., 2010, Čížková et al. 2012).

Hospodářská zvířata jsou pod veterinární péčí a na působení různých infekcí jim je často podáván lék. Dochází k šlechtění zvěře a tím ke genotypizaci. Tyto homozygotní populace bývají vysoce inbrední pro získání „dobrých vlastností“ a předání těch „správných“ alel pro chov. Polymorfismus TLRs vychází z různých geografických a mikrobiálních prostředí (Novák 2014). Proto předpokládám, že u chovných zvířat bude menší polymorfismus než u divokých. Nejen vlivem lidské péče, ale především vlivem patogenů a jejich rezistentních kmenů (Alcaide et al. Edwards 2011). Nejčastěji se pro screening polymorfismu u významných druhů byly použity právě TLRs (Kawai et al. Akira 2010).

7 Metodika a materiál

7.1 Vzorky

Jako zdroj DNA byly použity vzorky DNA izolované z krve, peří a kostí. Naprostá většina vzorků již byla vyizolována. Ovšem u 9 vzorků jsem izolovala DNA sama (z krve a peří (viz níže v izolaci DNA)). Disponuji vzorky ze 120 jedinců: 83 z divokých populací a 37 z farem (celkově: 40 vzorků z České republiky, 12 vzorků z Itálie, 20 vzorků Francie, 37 vzorků Španělsko, 5 Rusko, 6 Anglie).



Obr. č. 3 Mapa vzorků evropských populací

7.2 Izolace DNA a Sekvence DNA

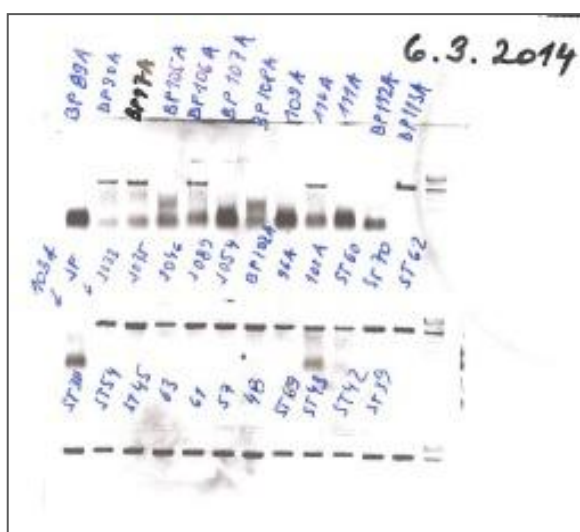
Většina vzorků již měla extrahovanou DNA ve zkumavkách, u devíti vzorků jsem DNA extrahovala sama (šest vzorků z krve a 3 vzorky z peří). Extrahace DNA byla provedena za pomoci DNeasy & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). K osekvenování LPS vazebného úseku genu pro TLR4 (cca 1000 bp. Uvnitř exonu 3 byly použity primery (Forward: 838, Revers: 2029; Forward 5'- GAG AAT CGT CTC TCC TTC CTT ACC-3' a Revers: 5'-GCT CAA GAT GGC AGG CAA CTC-

3'; PpTLR4-1652R a PpTLR4-1371F). PCR bylo provedeno pomocí Multiplex PCR Master Mixu (QIAGEN), kdy pro navázání primerů byla optimalizací zvolena teplota 62°C. Ostatní podmínky PCR reakce jsou uvedeny v tab.č.1.

PCR reakce Multiplex PCR Maste Mix(QIAGEN)				
aktivace polymerázy	35x cyklů			
95°C	94°C	62°C	72°C	72°C
15 minut	30 s	40 s	60s	5 minut

Tab.č.1 PCR reakce k navázání primerů po 35x cyklech

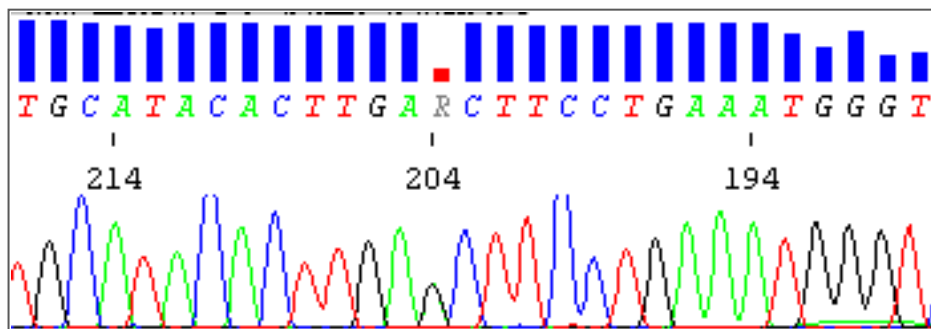
Úspěšnost PCR produktu byla zkontrolována na 1,5% agarosovém gelu pomocí elektroforézy. Amplifikované PCR produkty byly purifikovány převážně komerčním kitem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) a část byl purifikována pomocí enzymů ExoSAP – IT Clean-up Kit (GE Healthcare Life Sciences). Poté byly vzorky zesíleny sekvenčními primery pomocí BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Konečné produkty byly čištěny s BigDyeXT Terminator kit (Applied Biosystems). Připravené PCR produkty byly sekvenovány pomocí ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems; Life Technologies Corporation, Foster City, California, USA).



Obr. č. 4 kontola PCR produktů na agarózovém gelu.

7.3 Hodnocení polymorfismu

Vnitrodruhová jednonukleotidová polymorfní místa (SNPs) byla identifikována, jako dvojité vrcholy v SeqScape verze 2.5 (Applied Biosystems) u všech 74 jedinců. Sekvence pro TLR4 koroptve polní (PePeTLR4) je k dispozici na stránkách GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) pod přístupovými čísly JQ713172-77. Výsledné sekvence byly editovány programem BioEdit (Hall 1999). Počet SNP míst v rámci zkoumaného vzorku byla vizualizovaná pomocí FaBox internetového nástroje verze 1.41 (<http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/>). Za pomoci PHASE algoritmu (Stephens et al. 2001), který každou sekvenci zrekonstruoval na dvě, byly sekvence implementovány do softwaru DNAsp verze 5 (Librado et Rozas 2009). Příbuzenské vztahy TLRs byly vizualizovaný pomocí stromu programem Mega (<http://www.megasoftware.net/>.) Analyzovaná pozice byla (1109-1817bp.) tedy 708 bp.



Obr. č. 5 ukázka sekvencí v programu SeqScape

8 Výsledky

K dispozici bylo $n = 120$ vzorků z 6 populací, z nich 31 po PCR bylo vyloučeno. Po osekvenování 89 vzorků bylo v průběhu analýzy s programem SeqScape v.2.5. postoupeno do dalších analýz o 15 vzorků méně. Pro zbývající analýzy bylo použito 74 vzorků. Konkrétně 19 vzorků ze Španělska, 16 vzorků z Itálie, 3 vzorky z Ruska, 10 vzorků z Francie, 20 vzorků z České republiky a 6 vzorků z Anglie. Materiál vzorků byl následovný: 27 vzorků z peří a 31 vzorků z krve. U posledních 16 vzorků neznáme data. Do konečné analýzy bylo celkově zahrnuto 62 vzorků z divokých populací a pouze 9 z chovů. U vzorků z ruské populace nám chybí informace, zda jsou z chovů nebo z divoce žijící populace.

Pro analýzu d-loopem bylo vhodných 89 vzorků. Konkrétně 23 Španělsko, 23 Česká republika, 10 Francie, 6 Anglie, 27 Itálie. Po analýze programem SeqScape v 2.5 bylo postoupeno o 10 vzorků méně, ale o 5 vzorků více než pro gen TLR4 tedy 79.

Pro mezi populační srovnání koroptví jsem osekvenovala pomocí primerů úsek dlouhý 713bp. Konkrétně byla analyzována oblast (1109bp.-1817bp.). Vzorky obsahují 16 nukleotidových haplotypů a 11 aminokyselinových haplotypů v délce 713 bp. Frekvence jednotlivých haplotypů je uvedena v příloze č. 1 spolu se stromem příbuznosti haplotypů. Není zde zřejmá populační struktura pro TLR4. Ke změně nukleotidu došlo v 13 pozicích a z toho 5 je synonymních záměn nukleotidů a 8 je nesynonymních záměn, které vedou ke změně aminokyseliny. Nejvíce zastoupenou dvojicí alel na jednom lokusu byly T a C (Y) a to 69 x, 15x byla zastoupena kombinace A a T (W), 25x kombinace A+G (R) a 2x A+C (M). Záměna alely byla následovná: 4x nukleotid T, 13x nukleotid C a 6x nukleotid G. Nukleotidové složení bylo následovné: C 25,55%, T 29,7%, A 28,3% G16,4%.

Záměna nukleotidů vedla v 8 případech ke změně polypeptidového vlákna a zařazení odlišné aminokyseliny. Nejčastěji došlo k záměně aminokyseliny asparagin (Asn) za serin (Ser) v 32 případech. Dalšími významnými záměnami jsou aminokyseliny serin za cystein (Cys) a záměna serinu za threonin (Thr) a to v sedmi případech. Záměna aminokyseliny arginin (Arg) na lysin (Lys) ve dvou případech. A po jedné záměně to jsou tyto aminokyseliny: glutamin (Gln) na lysin, izoleucin (Ile) na metionin (Met) a valin (Val) na izoleucin. Frekvence jednotlivých alel a jejich následný vliv na stavbu proteinu, jsou shrnuty níže v tabulce.

PePeTLR4 frekvence alel a vliv na jejich strukturu ve stavbě proteinu					
Pozice SNP bp.	sekvenční posun	Aminokyselina	TYP SNP	počet	frekvence
1123	C → T		ss	17	0,115
1141	AGT → TGT	Ser → Cys	ns	7	0,047
1161	C → T		ss	18	0,122
1221	AGG → AAG	Arg → Lys	ns	2	0,014
1305	A → G		ss	1	0,007
1318	CAA → AAA	Gln → Lys	ns	1	0,007
1416	AUA → AGA	Ile → Met	ns	1	0,007
1513	GTA → ATA	Val → Ile	ns	1	0,007
1701	T → C		ss	51	0,345
1756*	A → C	Ile → Leu/His	ss/ns	1	0,007
1757	T → A		ss	1	0,007
1780	TCC → ACC	Ser → Thr	ns	7	0,047
1796	AAC → AGC	Asn → Ser	ns	32	0,216

* dvě mutace vedle sebe- může tak dojít ATT → CTT (leucin) tichá mutace anebo ATT → CAT (histidin) missense

Tab.č. 2. Frekvence jednotlivých alel a vliv na jejich strukturu ve stavbě proteinu v celkovém počtu vzorků

Analýza mezi evropskými populacemi dopadla následovně. K tichým záměnám dochází u všech populací. K nejvíce záměnám dochází u španělské a české populace. Nejvíce záměn je z nukleotidu cytosin na thymin C → T. Na pozici 1701 bp. došlo k záměně u všech studovaných populací. Pro českou, francouzskou, italskou a španělskou populaci došlo ke stejné záměně na pozici 1123 bp. a 1161 bp. K odlišné záměně došlo u španělské populace na pozici 1305bp. z adeninu na guanin A → G. Také v české populaci došlo k jedné specifické záměně a to na pozici 1757 bp. z thyminu na adenin T → A. Na pozici 1756bp. a 1757bp. se vyskytují dvě záměny, proto dojde k záměně aminokyseliny z leucinu na histidin. K záměně asparaginu za serin došlo u 4 populací z 6. Téměř ke stejným záměnám aminokyselin dochází u italské a španělské populace. Ve francouzské populaci nedošlo k žádným záměnám aminokyselin. Nejvíce se záměnami aminokyselin odlišují české populace. Ruská populace pouze o 3 jedincích vykazuje vysokou míru záměn. Pro přehlednost uvádím v samostatné tabulce počet jednotlivých haplotypů a její genovou rozmanitost haplotypu (Hd) společně s počtem synonymních a nesynonymních záměn.

	A	ČR	FR	IT	R	SP
Počet haplotypů	3	9	3	6	4	9
ss záměna	1	3	3	3	1	4
ns záměna	1	5	0	4	2	3
Hd	0,712	0,737	0,542	0,746	0,867	0,764

Tab. č. 3 Počet jednotlivých haplotypů s počtem jednotlivých ss/ns záměn v evropských populacích (A=Anglie, ČR = Česká republika, FR= Francie, IT=Itálie, R=Rusko a SP=Španělsko). Výpočet diverzity jednotlivých genotypových haplotypů (Hd).

	stát	A	ČR	FR	IT	R	SP
počet bp.							
1123		-	C→T	C→T	C→T	-	C→T
1141		-	-	-	Ser→Cys	-	Ser→Cys
1161		-	C→T	C→T	C→T	-	C→T
1220		-	-	-	Arg→Lys	-	-
1305		-	-	-	-	-	A→G
1318		-	Gln→Lys	-	-	-	-
1414		-	-	-	-	Ile→Met	-
1513		-	Val→Ile	-	-	-	-
1701		C→T	C→T	C→T	C→T	C→T	C→T
1756		-	Ile→His	-	-	-	-
1757		-	T→A	-	-	-	-
1780		-	-	-	Ser→Thr	Ser→Thr	Ser→Thr
1796		Asn→Ser	Asn→Ser	-	Asn→Ser	-	Asn→Ser

Tab. č. 4 Záměny nukleotidů na bázi v rámci jednotlivých evropských populací.

K porovnání divokých populací a populací z chovů bylo zahrnuto do celkové analýzy 74 vzorků. Analyzováno bylo 65 vzorků z divoké populace a jen 9 vzorků pochází z populací z chovu. U populací z chovu dochází především k synonymním substitucím a to v 8 případech na 3 různých pozicích. K nesynonymní záměně došlo na pozici 1796 bp. a to ve 4 případech. Frekvenčně jsou vyšší záměny vzorků u populací z chovu. Divoká populace má i vzhledem k vyššímu počtu vzorků více substitucí a to především těch nesynonymních. Frekvenční záměna nukleotidů je

nižší než u populací z chovů. Společnou záměnou aminokyseliny byla záměna asparaginu za serin (Asn →Ser) na pozici 1796bp. (viz přehled v tabulce).

počet bp.	POPULACE Z CHOVŮ			DIVOKÉ POPULACE		
	n = 9			n = 65		
	typ záměny	četnost	frekvence	typ záměny	četnost	frekvence
1123	C→T	3	0,17	C→T	14	0,11
1141	-	-	-	Ser→Cys	7	0,06
1161	C→T	2	0,11	C→T	16	0,13
1220	-	-	-	Arg→Lys	2	0,02
1305	-	-	-	A→G	1	0,01
1318	-	-	-	Gln→Lys	1	0,01
1414	-	-	-	Ile→Met	1	0,01
1513	-	-	-	Val→Ile	1	0,01
1701	C→T	5	0,28	C→T	43	0,35
1756	-	-	-	Ile→His	1	0,01
1757	-	-	-	T→A	1	0,01
1780	-	-	-	Ser→Thr	7	0,06
1796	Asn→Ser	4	0,22	Asn→Ser	28	0,23

Tab. č. 5 Záměny nukleotidů na bázi v rámci jednotlivých evropských populací.

Byl proveden test pozitivní selekce v závislosti na vyšším počtu nesynonymních substitucí než synonymních ($K_a > K_s$). Testování na pozitivní selekci bylo provedeno v programu DNAsp verze 5. Konkrétně Tajima's D test, který ukazuje změnu v distribuci frekvence alel. Výsledek Tajima's D: -0,82293 není signifikantní $P > 0,10$.

9 Diskuze

Do analýzy bylo zahrnuto pouze 74 vzorků z původních 120 vzorků, tedy 61,7 %. To může být způsobeno především díky degradované DNA a nedostatečným množstvím DNA (Zima et al. 2004). Částečně za to mohou být zodpovědny vzorky, které pocházejí z neinvazivních technik, jako je např. peří (Šmarda et al. 2005). To však nemohu potvrdit, protože u mnoha vzorků chybí informace o materiálu DNA. Vzorky DNA, které byly odebrány z peří a postoupily do další analýzy, nevykazují vyšší počet špatných sekvencí. Přestože jsem u slabších vzorků, které byly zjištěny elektroforézou, následně zvýšila množství DNA, jejich naprostá většina byla vyloučena v další analýze SeqScape. Proto i krátké avšak kvalitní úseky sekvencí nemohly být postoupeny k celkovému hodnocení. Nekvalitními vzorky jsem přišla o mnoho cenných dat, především o data z chovných populací.

V této studii byla porovnávána variabilita genu pro TLR4 u koroptve polní, která představuje nemodelový druh linie hrabavých. Porovnání variability TLR4 exonu 3 (cca 713 bp.) bylo v prvotním zjištění poměrně variabilní. Celkově osm nesynonymních záměn vypovídá pravděpodobně o vyšší variabilitě, než uvádí výsledky Vinkler et al. (2015), kteří však zkoumali variabilitu TLR4 pouze pro 10 jedinců z české populace. Vinkler et al. (2015) uvádí, že tato nízká variabilita nesynonymních záměn má pravděpodobně nižší funkční dopad. Zřejmě i u mých výsledků dochází pravděpodobně k nižšímu funkčnímu dopadu, a to především díky nízké četnosti těchto nesynonymních záměn. Celkově by se dalo říci, že záměny aminokyselin s četností pod 1 % nevypovídají o polymorfismu dané populace téměř nic (Flegr 2005). K těmto záměnám pod 1 % došlo ve čtyřech případech z osmi.

Četnost stejných alel pro jednotlivé populace naznačuje působení stejných selekčních tlaků. Může to být způsobeno především prudkým poklesem populací v 20. století (Hudec et al. 1977; Kuijper et al. 2009), kdy byly populace roztrženy, a tento zásah vedl i ke snížení genetické variability a pravděpodobně ke snížení četnosti alel (Primack et al. 2011). U takto roztržných populací by se pravděpodobně fixovaly rozdílné alely (Flegr 2005). V mé studii však není tento jev patrný, když četnost vzácných alel není vyšší, než 1 %. Mezi populacemi tak zřejmě dochází ke genovému toku nebo k vyšším selekčním tlakům na TLR4, než je patrné. Nízká variabilita v TLR4 však může být vysvětlena celkovou nízkou variabilitou TLRs,

kteřá je způsobena specifickou vazbou ligandu TLRs (Roach et al. 2005). Přestože je ruská populace zastoupena pouze třemi vzorky, vykazuje nejvyšší genotypovou variabilitu. Ruské populace jsou geograficky nejvzdálenější, přesto u nich nacházíme 2 stejné haplotypy, které jsou společné pro všechny populace koroptví a 2 specifické haplotypy. Tyto sdílené haplotypy všemi populacemi koroptví bude pravděpodobně způsobeno faxací podobných alel před fragmentací populací a jeho snížení. U ruských populací by se mohla uplatňovat fixace nových alel. U českých a španělských populací je stejný počet haplotypů. Koroptve z české populace mají více odlišných haplotypů než jiné populace. Tyto haplotypy však mají frekvenci velmi nízkou a jsou spíše nahodilé.

V současné době není mnoho studií, které porovnávají variabilitu u jednotlivých nemodelových, divoce žijících populací. Studie zkoumají především účinek TLRs na hospodářsky významná zvířata (Novák 2014). Studovaný polymorfismus pro TLR4 byl studován u kuřat v souvislosti k citlivost na *Salmonella* (Leveque et al. 2003). Citlivost jednotlivých záměn přestavby aminokyseliny předpokládá i Liu et al. (2011), který však navrhuje další prozkoumání TLR4, stejně jako Vinkler et al. (2009). Proto by měla být blíže prozkoumána záměna jednotlivých aminokyselin na přibližně podobných vazebných místech genu TLR4 jako u studií, kde byl signifikantní výsledek TLR4 pro citlivost k onemocnění.

Nízký počet nesynonymních záměn u chovných populací může naznačovat vliv efektu zakladatele a dlouhodobý úzký profil spolu s následnou genetickou izolací chovných a divoce žijících populací jak popisuje Čížková et al. 2012, která zkoumala genetickou variabilitu volně žijících kachen a kachen z chovů. Předpoklad vyšší genetické variability u divoce žijící populace se potvrdil,

Pozitivní selekci dochází ke zvýšení počtu vzácných alel (Flegr 2005). Testování na pozitivní selekci koroptví není signifikantní. To může být způsobeno nízkou frekvencí těchto alel u jednotlivých populací (Flegr 2005). Pravděpodobně u populací nedochází k významné koevoluci ze strany parazita. Prozatím nemohu tvrdit, že jsou tyto záměny pro zachování obrany proti parazitům výhodné. Polymorfismus TLR4 byla popsána především na lidské populaci, kde měla záměna nukleotidu vliv na citlivost k onemocnění (Hajjar et al. 2002).

10 Závěr

Pro organismy je nezbytné správné fungování imunitního systému. Každý organismus využívá jiných specifických mechanismů pro rozpoznání patogenů. Včasné rozpoznání patogenů je důležité pro udržení fitness. Imunitní systém je vlivem parazitů v neustálém vývoji jednotlivých mechanismů. Vlivem této koevoluce (hostitel – parazit) probíhá tzv. „závod ve zbrojení“, ten je popsán hypotézou Červené královny. Dochází tak k neustálým změnám, a to také na ztrátě alel nebo jejich získání. Tyto změny v nukleotidech mohou být důležité pro imunologickou otázku jedinců. Mezipopulační srovnání příslušných evropských populací odhalilo pravděpodobný vliv stejných mechanismů. Variabilitu mohl snížit vliv podobných patogenů u jednotlivých populací.

U koroptve polní bylo nalezeno 16 nukleotidových a 11 aminokyselinových haplotypů. Přesto nebyla zjištěna zřejmá populační struktura mezi populacemi, což může naznačovat fixaci stejných alel a působení podobných selekčních tlaků. Nejvíce různorodá byla česká a španělská populace. Přestože jsem měla k dispozici pouhých 9 vzorků z chovných populací, byly tyto vzorky relativně vysoce variabilní. Docházelo u nich především k synonymním záměnám. Přesto pro ucelené závěry bych potřebovala více dat z chovných populací. Za nejvíce variabilní populaci považuji ruskou divoče žijící. Tyto 3 vzorky byly vysoce variabilní a vyskytují se u nich 4 haplotypy. U italské a španělské populace pravděpodobně dochází k přenosu genů, neboť jejich haplotypy jsou velmi podobné.

Jak již dnes víme, toll-like receptory mohou predikovat citlivost k onemocnění, která se projeví jak ve fitness jedince, tak i v jeho fenotypových znacích. Proto bych na svoji práci dále navázala imunologickou studií. Ta by porovnávala jednotlivý vliv záměn nukleotidů na přestavbu aminokyselin a jejich vliv na imunitní systém jedinců. Tato studie je předpokladem pro další zkoumání u divoče žijící populace. Jakékoliv další poznatky by měly praktický význam v chovných zařízeních na zvýšení odolnosti jedinců proti chorobám. Otázkou však zůstává, jestli selekce vlivem šlechtění a vlivem podávání imunosupresivních látek bude prospěšná pro zachování genetické variability.

Reintrodukcii druhů považuji za přínosnou pouze v případě, že jedinci vypouštění z chovů jsou odchováni nejen v polopřirozených podmínkách, ale jejich genetický

profil je podobný jako profil divoce žijící populace a především je sledovaný vliv patogenů. Proto je moje práce přínosná pro budoucí genetické pozadí širšího počtu druhů v porovnání s funkčními složkami imunitního systému.

Literatura:

ABEL B., THIEBLEMON N., QUESNIAUX V. J. F., BROWN N., MPAGI J., MIYAKE K., BIHL F. et RYFFEL B., 2002: Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Journal of Immunology* 169: 3155 – 3162.

ADEREM A. et ULEVITCH R. J., 2000: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406(6797): 782 - 787.

ALCAIDE M. et EDWARDS S. V., 2011: Molecular evolution of the Toll-like receptor multigene family in birds. *Molecular Biology and Evolution* 28(5): 1703 - 1715.

ALLENDORF F. W. et LUIKART G. H., 2007: *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, Oxford.

ASEA A., KRAEFT S. K., KURT-JONES E. A., STEVENSON M. A., CHEN L. B., FINBERG R. W., KOO G. C. et CALDERWOOD S. K., 2000: HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* 6: 435 - 442.

AKASHI-TAKAMURA S. et MIYAKE K., 2008: TLR accessory molecules. *Current opinion in immunology* 20: 420 - 425.

AKIRA S., UEMATSU S. et Takeuchi O., 2006: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783 - 801.

BARREIRO L. B., BEN-ALI M., QUACH H., et al. 18 co-authors. 2009: Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense. *PLoS Genet.* 5:e1000562.

BEGON M., TOWNSEND C. R. et Harper J. L., 2010: *Základy ekologie*. Univerzita Palackého v Olomouci. 505s

BEUTLER B., 2005: The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods. *Immunogenetics* 57: 385 – 392.

BHIDE M. R., MUCHA R., MIKULA I., KISOVA L., SKRABANA R., NOVAK M., MIKULA I., 2009: Novel mutations in TLR genes cause hyporesponsiveness to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection. *BMC Genet* 10: 21.

BONIZZIGI G. et KARIN M., 2004: The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology* 25: 280 - 288.

BROWNLIE R. et ALLAN B., 2011: Avian toll-like receptors. *Cell and Tissue Research* 343(1): 121 - 130.

BROWNLIE R., ZHU J., ALLAN B., MUTWIRI G. K., BABIUK L. A., POTTER A. et GRIEBEL P., 2009: Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Molecular immunology* 46: 3163 - 3170.

ČÍŽKOVÁ D., JAVŮRKOVÁ V., CHAMPAGNON J. et KRESINGER J., 2012: Duck's not dead: Does restocking with captive bred individuals affect the genetic integrity of wild mallard (*Anas platyrhynchos*) population? *Biological Conservation* 152: 231 - 240.

CORMICAN P., LLOYD A. T., DOWNING T., CONNELL S. J., BRADLEY D. et O'FARRELLY C., 2009: The avian Toll-like receptor pathway-subtle differences amidst general conformity. *Dev Comp Immunol* 33(9): 967 – 973.

CLAYTON D. H. et MOORE J., 2004: *Host-Parasite Evolution*. Oxford University Press Inc., New York.

DE LA LASTRA J. M. P. et DE LA FUENTE J., 2007: Molecular cloning and characterisation of the griffon vulture (*Gyps fulvus*) toll-like receptor 1. *Developmental and Comparative Immunology* 31: 511 – 519.

DIEBOLD S. S., KAISHO T., HEMMI H., AKIRA S. et REIS E SOUSA C., 2004: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529 - 1531.

DOWNING T., LLOYD A. T., O'FARRELY C. O., BRADLEY D. G., 2010: The differential evolutionary dynamics of avian cytokine and TLR gene classes. *Journal of Immunology* 184: 6993 - 7000.

DU X., POLTORAK A., WEI Y. et BEUTLER B., 2000: Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Netw.* 11: 362 - 371.

ECKL-DORNA J. et BATISTA F. D., 2009: BCR-mediated uptake of antigen linked to TLR9 ligand stimulates B-cell proliferation and antigen-specific plasma cell formation. *Blood* 113(17): 3969 - 3977.

EMONTS M., HAZELZET J. A., DE GROOT R. et HERMANS P. W., 2003: Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infection Diseases* 3: 565 - 577.

FARHAT K., RIEKENBERD S., HEINE H., DEBARRY J., LANG R., MAGES J., BUWITT-BECKMANN U., ROSCHMANN K., JUNG G., WIESMULER K. et ULMER A. J., 2008: Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *Journal of leukocyte biology*, 83: 692 - 701.

FARNELL M. B., CRIPPEN T. L., HE H., SWAGGERTY C. L. et KOGUT M. H., 2003: Oxidative burst mediated by toll like receptors (TLR) and CD14 on avian

heterophils stimulated with bacterial toll agonists. *Developmental and comparative immunology* 27: 423 - 429.

FRANKHAM R., BALLOU J. D. et BRISCOE D. A., 2002: *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, 543 s.

FERWERDA B., FERWERDA G., PLANTINGA T. S., WILLMENT J. A., VAN SPRIEL A. B., VENSEELAR H., ELBERS C. C., JOHNSON M. D., CAMBI A., HUYSAMEN C., JACOBS L., JANSEN T., VERHEIJEN K., MASTHOFF L., MORRE S. A., VRIEND G., WILLIAMS D. L., PERFECT J. R., JOOSTEN L. A. B., WIJMENGA C., VAN DER MEER J. W. M., ADEMA G. J., KULLBERG B. J., BROWN G. D. et NETEA M. G., 2009: Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *The New England journal of medicine* 361: 1760 - 1767.

FLEGR J., 2005: *Evoluční biologie*. Nakadatelství Academia, Praha, 560 s.

GARLANDA C., ANDERS H. J. et MANTOVANI A., 2009: TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends in Immunology* 30(9): 439 - 446.

GREGORY T. R., 2005: *Genome Size Evolution in Animals*. In GREGORY T. R. [ed.]: *The Evolution of the Genome (Volume 1)*. Elsevier Academic Press.

HAJJAR AM, ERNEST R.K., TSAI J.H., WILSON C.B., MILLER S.I., 2002: Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol* 3:354–359

HALL T. A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 95-98. *Nucleic Acids Symposium Series* No. 41, Oxford University Press.

HAWN T. R., WU H., GROSSMAN J. M., HAHN B. H., TSAO B. P. et ADEREM A., 2003: A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolished flagellin signaling and is associated with susceptibility to Legionnaire's disease. *Journal of. Exp. Mediine* 198: 1563 - 1572.

HAYASHI F., SMITH K. D., OZINSKY A., HAWN T. R., YI E. C., GOODLETT D. R., ENG J. K., AKIRA S., UNDERHILL D. M. et ADEREM A., 2001: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099 - 1103.

HE J., JIA W., FAN Q., ZHOU X., QIN H., SHUGART Y. Y. et ZENG Y., 2007: Genetic polymorphisms of TLR3 are associated with Nasopharyngeal carcinoma risk in Cantonese population. *BMC cancer* 7: 194.

HEDRICK P. W., 2005: *Genetics of Populations*. Jones and Barlett Publishers, Sudbury, 737 s.

- HOŘEJŠÍ V. et BARTUŇKOVÁ J., 2009: *Základy imunologie*. Triton. Praha. 316 s.
- HUNT R., SAUNA Z. E., AMBUDKAR S. V., GOTTESMAN M. M. et KIMCHISARFATY C., 2009: Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods in molecular biology* 578: 23 - 39.
- HUDEK K., ČERNÝ W. [eds], 1977: *Fauna ČSSR Ptáci 2*. Academia, Praha.
- CHANG L. et KARIN M., 2001: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37 - 40.
- CHANG J-S., RUSSELL G. C., JANN O., GLASS E. J., WERLING D., HAIG D.M. 2009: Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127: 94-105.
- CHEN Y., GIOVANNUCCI E., LAZARUS R., KRAFT P., KETKAR S. et HUNTER D. J., 2005: Sequence variants of Toll-like receptor 4 and susceptibility to prostate cancer. *Cancer research* 65: 11771 - 11778.
- IQBAL M, PHILBIN V. J. et SMITH A. L., 2005: Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* 104(1-2): 117 - 127.
- IWASAKI A. et MEDZHITOV R., 2010: Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327: 291 - 295.
- IWASAKI A. et MEDZHITOV R., 2004: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5: 987 - 995.
- JANEWAY C. A. et Medzhitov R., 2002: Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol*, 20: 197 - 216.
- JAMES J. A., POULTON K. V., HAWORTH S.E., PAYNE D., MCKAY I.J., CLARKE F.M., HUGHES F.J., LINDEN G.J. 2007: Polymorphisms of TLR4 but not CD14 are associated with a decreased risk of aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 34, 111–117.
- LAHTI D., JOHNSON N., AJIE B., OTTO S., HENDRY A., BLUMSTEIN D., COSS R., DONOHUE K., FOSTER S. A., 2009: Relaxed selection in the wild. *Trends Ecol. Evol.* 24: 487 - 496.
- LEHNARDT S., SCHOTT E., TRIMBUCH T., LAUBISCH D., KRUEGER C., WULCZYN G., NITSCH R. et WEBER J. R., 2008: A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 2320 - 2331.

LEMAITRE B., NICOLAS E., MICHAUT L., REICHHART J. M. et HOFFMAN J. A., 1996: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973 - 983.

LEVEQUE G., FORGETTA V., MORROLL S., et al., 2003: Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in chickens. *Infection and Immunity* 71: 1116 - 1124.

LIBRADO P. et ROZAS J., 2009: DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451 – 1452.

LIVELY C. M., et DYBAHL M. F., 2000: Parasite adaptation to locally common host genotypes. *Nature* 405: 679 - 681.

LIU H., TZENG C. S. et TENG H. Y., 2002: Sequence variations in the mitochondrial DNA control region and their implications for the phylogeny of the Cypriniformes. *Canadian Journal of Zoology* 80: 569 - 581.

LIU Y., CHANG G. B., HU G. S., LI Q., XU Q., CHEN G.H., 2011: Genetic variation at Exon2 of TLR4 gene and its association with resistant trans in chicken. *Afr Journal of Biotechnology* Vol 10 (42): 8260-8266

LORENZ E., MIRA J. P., CORNISH K. L., ARBOUR N. C. et SCHWARTZ D. A., 2000: A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect. Immun.* 68: 6398 - 6401.

KAISER P., 2007: The avian immune genome a glass half-full or half-empty? *Cytogenet Genome Res* 117: 221 - 30.

KAWAI T. et AKIRA S. 2010: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11: 373 - 384.

KIM H. M., PARK B. S., KIM J. I., KIM S. E., LEE J., OH S. C., ENKHBAYAR P., MATSUSHIMA N., LEE H., YOO O. J. et LEE J. O., 2007: Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130: 906 - 917.

KEESTRA A. M., DE ZOETE M. R., BOUWMAN L. I., et VAN PUTTEN J. P. M., 2010: Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *Journal of immunology* 185: 460 - 467.

KIECHL S., LORENZ E., REINDL M., WIEDERMANN C. J., OBERHOLLENZER F., BONORA E., WILLEIT J. et SCHWARTZ D. A., 2002: Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *New England Journal of Medicine* 347: 185 – 192.

KHAKOO S. I., RAJALINGAM R., SHUM B. P., et al. (11 co-authors). 2000:

Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. *Immunity* 12: 687 - 698.

KUIJL C. et NEEFJES J., 2009: New insight into the everlasting hostpathogen arms race. *Nat Immunol.* 10: 808 - 809.

KUIJPER D. P. J., OOSTERVELD E., WYMENGA E., 2009: Decline and potential recovery of the European grey partridge (*Perdix perdix*) population – a review. *Eur J Wildl Res* 55: 455-463.

KUMAR H., KAWAI T. et AKIRA S., 2009: Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications* 388: 621 - 625.

MANK J. E., CARLSON J. E. et BRITTINGHAM M. C., 2004: A century of hybridization: decreasing genetic distance between American black ducks and mallards. *Conserv. Genet.* 5: 395 - 403.

MEDZHITOV R., PRESTON-HURLBURT P. et JANEWAY C. A., 1997: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394 - 397.

MEHNER T., POHLMANN K., ELKIN C., MONAGHAN M. T. et FREYHOF J., 2009: Genetic mixing from enhancement stocking in commercially exploited vendace populations. *J. Appl. Ecol.* 46: 1340 - 1349.

MERX S., ZIMMER W., NEUMAIER M. et AHMAD-NEJAD P., 2006: Characterization and functional investigation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human TLR5 gene. *Hum Mutat* 27: 293.

MISCH E. A. et HAWN T. R., 2008: Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clinical science* 114: 347 - 360.

MOGENSEN T. H., 2009: Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev* 22: 240 - 273

NOVÁK K., 2014: Functional polymorphisms in Toll-like receptors genes for innate immunity in farm animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 157: 1 - 11.

O'NEILL L. A. J., 2008: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunological reviews* 226: 10 - 18.

OPPENHEIM J. J. et YANG D., 2005: Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 359 - 365.

PALSSON-MCDERMOTT E. M. et O'NEILL L. A. J., 2007: Pattern-Recognition Receptors in Human Disease. *Biochemical Society Transactions.* 35: 1437 – 1444.

PASARE C. et MEDZHITOV R., 2005: Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Advances in experimental medicine and biology* 560: 11 - 18.

PICCININI A. M. et MIDWOOD K.S., 2010: DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2010/672395

RANDI E., 2008: Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Mol. Ecol.* 17: 285 - 293.

RHYMER J. M. et SIMBERLOFF D., 1996: Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 83 - 109.

ROACH J. C., GLUSMAN G., ROWEN L., KAUR A., PURCELL M. K., SMITH K. D., HOOD L. E. et ADEREM A., 2005: The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 9577 - 9582.

ROSENSTEIN N. E., PERKINS B. A., STEPHENS D. S., POPOVIC T. et HUGHES J. M., 2001: Meningococcal disease. *N. Engl. J. Med.* 344: 1378 - 1388.

SACHIDANANDAM R., WEISSMAN D., SCHMIDT S. C., KAKOL J. M., STEIN L.D., MARTH G., SHERRY S., MULLIKIN J. C., et al (42 co-authors), 2001: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928 - 933.

SAITOH S. et al. 2004: Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)- MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int. Immunol.* 16: 961.

SHIMAZU R., AKASHI S., OGATA H., NAGAI Y., FUKUDOME K., MIYAKE K. et KIMOTO M., 1999: MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine* 189(11): 1777 - 1782.

SCHRÖDER N. W. et SCHUMANN R. R., 2005: Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis.* 5: 156 - 164.

SCHOTT E., WITT H., NEUMANN K., BERGK A., HALANGK J., WEICH V., MULLER T., PUHL G., WIEDENMANN B. et BERG T., 2008: Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon-abased therapy. *Journal of viral hepatitis* 15: 71 - 78.

SCHRÖDER N. W. J., DITERICH I., ZINKE A., ECKERT J., DRAING C., VON BAEHR V., HASSLER D., PRIEM S., HAHN K., MICHELSEN K. S., HARTUNG T., BURMESTER G. R., GOBEL U. B., HERMANN C. et SCHUMANN R. R., 2005: Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by *Borrelia burgdorferi* and protects from late stage Lyme disease. *Journal of immunology* 175: 2534 - 2540.

STEIN D., ROTH S., VOGELSANG E. et NUSSLEIN-VOLHARD C., 1991: The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 65: 725 - 735.

STEPHENS M., SMITH N. J., DONNELLY P., 2001: A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68: 978 – 989.

ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V. et KOPTÍKOVÁ J., 2005: *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno, 186s.

TABEL Y., BERDELI A. et MIR S. 2007: Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children. *International journal of immunogenetics* 34: 399 - 405.

TAKEDA K., TAKEUCHI O. et AKIRA S., 2002: Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *Journal of endotoxin research* 8: 459 - 463.

TAKEDA K. et AKIRA S., 2005: Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 17(1): 1 - 14.

TEMPERLEY N. D., BERLIN S., PATON I. R., GRIFFIN D. K. et BURT D. W., 2008: Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. *BMC Genomics* 9: 62.

TIRUMURUGAAN K. G., DHANASEKARAN S., RAJ G. D., RAJA A., KUMANAN K. et RAMASWAMY V., 2010: Differential expression of toll-like receptor mRNA in selected tissues of goat, *Capra hircus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133: 296 - 301.

TSUKADA H., FUKUI A., TSUJITA T., MATSUMOTO M., IIDA T. et SEYA T., 2005: Fish soluble Toll-like receptor 5 (TLR5S) is an acute-phase protein with integral flagellin-recognition activity. *International Journal Of Molecular Medicine* 15(3): 519 - 525.

UEMATSU S. et AKIRA S., 2008: Toll-like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb Exp Pharmacol.* 1: 1 - 20.

VINKLER M. et ALBRECHT T., 2009: The question waiting to be asked: Innate immunity receptors in the perspective of zoological research. *Folia Zool* 58: 15 - 28.

WERLING D., JANN O. C., OFFORD V., GLASS E. J. et COFFEY T. J., 2009: Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends Immunol.* 30: 124 - 130.

ZELUS D., ROBINSON-RECHAVI M., DELACRE M., AURIAULT C. et LAUDET V., 2000: Fast evolution of interleukin-2 in mammals and positive selection in ruminants. *J Mol Evol.* 51: 234 - 244.

Příloha č. 1 Fylogenetický strom haplotypů

IT- ITÁLIE
 FR-FRANCIE
 SP-ŠPANĚLSKO
 CR-ČESKÁ REP.
 R-RUSKO
 A-VELKÁ BRITÁNIE

haplotyp	četnost	frekvence	n = 148
1	25	0,169	SP,A,CR,IT
2	28	0,189	SP
3	62	0,419	CR,SP,F,IT,A,R
4	23	0,155	CR,SP,F,IT,A,R
5	15	0,101	SP,F,CR,IT
6	2	0,014	CR
7	4	0,027	CR,SP
8	1	0,007	CR
9	1	0,007	CR
10	1	0,007	R
11	1	0,007	R
12	2	0,014	IT
13	3	0,020	SP,IT
14	1	0,007	CR
15	1	0,007	SP
16	2	0,014	SP

