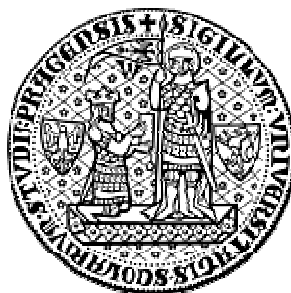


Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



**GENETICKÁ DIVERZITA V GENECH DŮLEŽITÝCH
PRO PŘEŽITÍ U KONÍ**

Diplomová práce

Bc. Barbora Vokatá

Praha 2009

školitel: **Prof. MVDr. et RNDr. Petr Hořín, CSc.**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně za použití uvedené literatury a pod vedením svého školitele.

Praha, 2009

Bc. Barbora Vokatá

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. MVDr. RNDr. Petru Hořínovi, CSc. za odborné vedení a vstřícný přístup při řešení mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat celému kolektivu Ústavu genetiky FVL VFU Brno za vytvoření příjemných pracovních podmínek.

Tato diplomová práce byla součástí projektu GAČR **523/06/1402: Geny imunitní odpovědi čeledi Equidae: genetická diversita a komparativní genomika**. Řešena byla na Ústavu genetiky FVL VFU Brno v letech 2006 – 2009.

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY IN GENES IMPORTANT FOR SURVIVAL OF THE DOMESTIC HORSE

Genetic diversity is important for a species and/or population survival. Diseases represent a permanent threat for domestic, captive and wild animal populations. Therefore, genetic diversity in genes involved in resistance/susceptibility to infectious and other diseases is of great interest. In this study, microsatellites and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in immunity-related genes were used as markers to describe genetic diversity of three different breeds of the domestic horse (*Equus caballus*): Camargue, Murgesse and Icelandic horses. 30 microsatellite and 21 SNP markers developed in this laboratory were genotyped in all three populations by using direct sequencing and PCR-RFLP techniques, respectively. Intra-population characteristics as well as genetic distances among the populations were obtained using the Arlequin3.1 software. Microsatellite analysis revealed similar genetic diversity in all three populations studied. Average observed heterozygosities (H_o) ranged from 0,683 of Icelandic horse to 0,715 of Murgesse and the mean number of alleles (N_A) varied from 6,37 of Murgesse to 7,63 of Camargue. In Icelandic horse population 13 breed-specific alleles with a frequency $\geq 0,2$ were found, suggesting a larger genetic heterogeneity of this breed. Similarly, genetic distances represented by the F_{TS} coefficient showed larger genetic differences of Icelandic horse ($F_{TS} = 0,15 - 0,17$) from those observed between the Camargue and the Murgesse populations ($F_{TS} = 0,05$). Analysis of immunity-related gene SNPs revealed high genetic diversity in the South-European breeds ($H_o = 0,313$ in Murgesse and 0,317 in Camargue) and significantly lower in Icelandic horse ($H_o = 0,252$). However, genetic distances based on SNP analysis showed only subtle differences among breeds with the highest value between Murgesse and Icelandic horse ($F_{TS} = 0,12$). Neutrality tests of the SNP markers did not reveal any significant Tajima's d value in any population. In conclusion, the parameters of genetic diversity of the populations studied in microsatellite loci were different from those in the immunity-related gene SNPs, suggesting that information provided by population analysis of candidate gene polymorphisms is different from data obtained by standard microsatellite studies.

Keywords: genetic diversity, population, horse, microsatellites, SNPs, immunity-related genes, genetic distances, neutrality tests

Klíčová slova: genetická diverzita, populace, kůň, mikrosatelity, jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs), geny imunitní odpovědi, genetické distance, testy neutrality

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1 GENY PŘEŽITÍ	10
2.2 GENETICKÁ DIVERZITA A INTERAKCE HOSTITEL – PATOGEN	10
2.3 MĚŘENÍ GENETICKÉ DIVERZITY	11
2.3.1 GENETICKÉ MARKERY	11
Mitochondriální DNA markery	12
Mikrosatelity	12
Jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs)	13
2.3.2 PARAMETRY GENETICKÉ DIVERZITY POPULACÍ	13
Heterozygotnost	13
Počet polymorfních lokusů	14
Počet alel	14
Efektivní počet alel	14
2.3.3 GENETICKÉ DISTANCE	15
Neiova (standardní genetická) distance	15
Koeficienty F	15
Koeficient genové diferenciacce (G_{ST})	15
2.4 KŮŇ JAKO MODELOVÝ ORGANIZMUS	16
Systematické zařazení	16
2.4.1 KONĚ A GENETICKÁ DIVERZITA	16
2.4.2 MODELOVÉ POPULACE A JEJICH VÝZNAM	17
Camargue	17
Murgese	18
Islandský pony	18
2.4.3 VYBRANÉ PATOGENY MODELOVÝCH POPULACÍ	19
Virus západonilské horečky	19
Anaplasma phagocytophilum	20
Piroplazmy	20
2.5 VYBRANÉ GENY OBRANYSCHOPNOSTI	21
2.5.1 CYTOKINY A JEJICH RECEPTORY	21
Interleukin 7 (IL-7) a jeho receptor (IL-7R)	21
Interleukin 10 (IL-10)	21
Interleukin 12 (IL-12), interleukin 23 (IL-23) a jejich receptory	21
Interleukin 17 (IL-17) a jeho receptor (IL-17R)	22
Interferon gamma (Ifn γ , IfnG)	22
2.5.2 TOLL-LIKE RECEPTORY	22
Toll-like receptor 2 (TLR2)	23
Toll-like receptor 3 (TLR3)	23
2.5.3 DALŠÍ GENY ÚČASTNÍCÍ SE IMUNITNÍ ODPOVĚDI	23
Nramp1	23
Indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (iNOS)	24
VISA	24
Jaderný faktor κ B (NF- κ B)	24
Oligoadenylát syntáza (OAS)	24
MXA	25

3. CÍLE PRÁCE	25
4. MATERIÁL A METODY	26
4.1 ANALYZOVANÉ VZORKY	26
Plemeno Camargue	26
Plemeno Murgese	26
Plemeno Islandský pony	26
4.1.1 IZOLACE DNA	27
4.2 GENETICKÉ MARKERY	28
4.2.1 MIKROSATELITY	28
4.2.1.1 GENOTYPIZACE MIKROSATELITŮ	29
4.2.2 SNPs V GENECH IMUNITNÍ ODPOVĚDI	29
4.2.2.1 PCR	31
4.2.2.2 AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA - KONTROLA PCR PRODUKTŮ.....	33
4.2.2.3 RFLP - ŠTĚPENÍ	33
4.2.2.4 PAAG - ELEKTROFORÉZA A BARVENÍ GELU	35
4.2.2.5 NOVĚ ZAVEDENÉ METODIKY: SNP MARKERY GENŮ TLR3 A IL23p19	36
4.2.2.6 PCR, AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA A POOL DNA	37
4.2.2.7 PŘEČIŠTĚNÍ PCR PRODUKTU, URČENÍ KONCENTRACE A SEKVENACE	37
4.2.2.8 ANALÝZA SEKVENCE A NÁVRH RESTRIKČNÍ ENDONUKLEÁZY	38
4.2.3 ASOCIACE MEZI MARKERY A INFEKČÍ	39
4.3 VÝPOČET PARAMETRŮ POPULAČNÍ DIVERZITY, GENETICKÉ DISTANCE A TESTY NEUTRALITY	39
5. VÝSLEDKY	40
5.1 IDENTIFIKACE A GENOTYPIZACE SNPs V GENU TLR3	40
5.1.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	40
5.1.2 POČÍTAČOVÉ ZPRACOVÁNÍ SEKVENCÍ	40
5.1.3 VÝBĚR VHODNÝCH RESTRIKČNÍCH ENDONUKLEÁZ A RFLP	41
5.2 GENOTYPIZACE MIKROSATELITŮ	43
5.2.1 ANALÝZA POPULACE KONÍ CAMARGUE - MIKROSATELITY	43
5.2.2 ANALÝZA POPULACE KONÍ MURGESE - MIKROSATELITY	45
5.2.3 ANALÝZA POPULACE ISLANDSKÝ PONY - MIKROSATELITY	46
5.2.4 SROVNÁNÍ STUDOVANÝCH POPULACÍ - MIKROSATELITY	48
5.3 GENOTYPIZACE SNPs	49
5.3.1 ANALÝZA POPULACE KONÍ CAMARGUE - SNPs	49
5.3.2 ANALÝZA POPULACE KONÍ MURGESE - SNPs	50
5.3.3 ANALÝZA POPULACE ISLANDSKÝ PONY - SNPs	51
5.3.4 SROVNÁNÍ STUDOVANÝCH POPULACÍ - SNPs	52
5.4 SROVNÁNÍ POPULACÍ V SNPs A MIKROSATELITECH	53
5.5 TESTY NEUTRALITY SNP LOKUSŮ U STUDOVANÝCH POPULACÍ	54
6. DISKUSE	55
6.1 METODICKÉ ASPEKTY PRÁCE	55
6.2 GENETICKÁ DIVERZITA - MIKROSATELITY	56
6.3 GENETICKÁ DIVERZITA - SNPs	58
6.4 OBECNÉ SHRNUÍ	63
7. SOUHRN	64
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	65
9. PŘÍLOHY	73
PŘÍLOHA 1: Srovnání sekvence genu TLR3 s referenční sekvencí v genové bance	73
PŘÍLOHA 2: Frekvence alel mikrosatelitů plemene Camargue	74

PŘÍLOHA 3: Analýza mikrosatelitů plemene Camargue programem Arlequin3.1	76
PŘÍLOHA 4: Frekvence alel mikrosatelitů plemene Murgese	78
PŘÍLOHA 5: Analýza mikrosatelitů plemene Murgese programem Arlequin3.1	80
PŘÍLOHA 6: Frekvence alel mikrosatelitů plemene Islandský pony	82
PŘÍLOHA 7: Analýza mikrosatelitů plemene Islandský pony programem Arlequin3.1	84
PŘÍLOHA 8: Genetické vzdálenosti populací na základě analýzy mikrosatelitů programem Arlequin3.1	86
PŘÍLOHA 9: Analýza SNPs plemene Camargue programem Arlequin3.1	88
PŘÍLOHA 10: Analýza SNPs plemene Murgese programem Arlequin3.1.....	90
PŘÍLOHA 11: Analýza SNPs plemene Islandský pony programem Arlequin3.1	92
PŘÍLOHA 12: Genetické vzdálenosti populací na základě analýzy SNPs programem Arlequin3.1	94

SEZNAM ZKRATEK

APC	buňka předkládající antigen (antigen-presenting cell)
DRD2	receptor pro dopamin D2 (dopamine receptor D2)
GPI	glykosylphosphatidylinositol
He	očekávaná heterozygotnost (expected heterozygosity)
Ho	skutečná (pozorovaná) heterozygotnost (observed heterozygosity)
Ifn γ , IfnG	interferon gamma
IL	interleukin
(i)NOS	(indukovatelná) syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)
IR	spojený s imunitou (immunity-related)
κ B	kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti
MXA	Myxovirus resistance A
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
Nramp1	Natural resistance associated macrophage protein 1
OAS	2'5'-oligoadenylát syntáza
PAAG	polyakrylamidový gel
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
SNP (SNPs)	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism; varianta se s znamená množné číslo)
T _H	pomocný T-lymfocyt (helper T-cell)
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
UTR	nepřekládaná oblast (untranslated region)
VISA	virus-induced signaling adapter
WNV	virus západonilské horečky (West Nile virus)

1. ÚVOD

Diverzita je pojem, užívaný v biologii pro popis v přírodě se vyskytujících rozdílů. Rozdíly lze najít na různé úrovni, čemuž odpovídají i různé druhy diverzity: druhová, fenotypová. Poměrně novým typem je diverzita genetická, která popisuje rozdíly na úrovni DNA.

Po staletí si lidé všímali rozdílů, které se mezi nimi vyskytují, a že se tyto rozdíly objevují v některých rodinách mnoho generací. Podobně se předpokládala dědičnost rozdílných vlastností i u domácích zvířat a pěstovaných rostlin. Nicméně až vytvoření neodarwinistické teorie evoluce ve 30. letech 20. století představuje první snahu zdokumentovat množství pozorované rozdílnosti.

První studie genetické variability se zaměřovaly na snadno zjistitelné rozdíly jako jsou morfologické parametry (Ford, 1940) nebo krevní skupiny (Landsteiner & Weiner, 1940). I když se jednalo o zajímavé znaky, nebylo možné pomocí nich popsat celkovou genetickou variabilitu studované populace. Velký posun přinesl rozvoj molekulárních technik v 70. a 80. letech 20. století, od kdy lze moderní populační genetiku datovat.

V dnešní době se studie genetické diverzity populací zaměřují především na člověka (Prugnolle et al., 2005) a domestikovaná zvířata – např. psy (Brouillette & Venta, 2002), ovce (Pariset et al., 2006) nebo koně (Aberle et al., 2004). Právě kůň domácí (*Equus caballus*), díky svému kosmopolitnímu rozšíření a své vnímavosti k řadě infekcí, včetně těch nebezpečných pro člověka, představuje zajímavý model.

Všechny organizmy žijí v určitém prostředí, které se neustále mění. Schopnost populace (či druhu) vyrovnat se s měněními se podmínkami je závislá na její (jeho) genetické variabilitě. Obzvláště významným faktorem prostředí jsou původci nemocí – patogeny. Z toho důvodu je největší důraz z celé genetické diverzity kladen na diverzitu v genech imunity.

Studium genetické diverzity přináší důležité informace pro šlechtění domácích zvířat, stejně jako pro snahy o zachování druhů smalými populacemi a populací žijících v zoologických zahradách. Důležitou součástí studia genetické diverzity je i výzkum interakce patogena a hostitele ve vzniku nemocí, jenž může vést k objevu nových genů a jejich funkcí v obranyschopnosti.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 GENY PŘEŽITÍ

Genom živočichů obsahuje velký počet genů, které lze podle různých kritérií rozdělit do různých skupin. Z funkčního hlediska tvoří důležitou skupinu geny zajišťující přežití jedince a druhu. Patří sem geny spojené s reprodukcí (např. geny zajišťující spermatogenezi, sexuální chování, oplození a další), geny účastnící se boje proti stresu (př. geny účastnící se detoxikačních procesů) a v neposlední řadě geny obranyschopnosti.

Geny obranyschopnosti čili imunity, nazývané též IR geny (z angl. immunity-related), tvoří u savců přibližně 5% genetické výbavy. Toto číslo ale pravděpodobně není konečné, protože se stále objevují nové geny a nové funkce genů již známých (Trowdsdale & Parham, 2004).

Imunitní systém je rozdělován na dvě základní složky: nespecifickou (neadaptivní, vrozenou) a antigenně specifickou (adaptivní). Nespecifická imunita je evolučně starší a vyskytuje se u všech mnohobuněčných organismů. Je založená na předem připravených buňkách a molekulách, které reagují na společné rysy mnoha různých patogenů. Specifická imunita je evolučně mladší a známá až u obratlovců. Využívá vysoce specializované molekuly a aktivuje se až po setkání s daným antigenem. Vzhledem k vzájemné provázanosti obou složek, bývá obtížné jednoznačně zařadit imunitní geny pouze do jedné z nich.

2.2 GENETICKÁ DIVERZITA A INTERAKCE HOSTITEL – PATOGEN

Genetická diverzita je ovlivňována různými mechanismy jako jsou např. drift či různé druhy selekce. Díky nim se neustále mění genetické složení populací a dá se říci, že genetická diverzita populací se tak neustále vyvíjí. Každý druh sdílí své životní prostředí s druhy dalšími a jejich střetávání může pohánět selekci. Vzájemné vztahy koexistujících druhů, hlavně pak vztahy hostitel a patogen (či parazit), predátor a kořist, mezidruhá kompetice nebo mutualismus, způsobují, že se zúčastněné druhy vyvíjejí v závislosti jeden na druhém (Thompson, 1994). Vztahy hostitel – patogen a predátor – kořist mohou navíc vést k selekci závislé na frekvenci (Ebert, 1998). Příkladem může být nová genetická

varianta patogena, která se rychle množí a šíří, protože většina populace hostitele je proti ní bezbranná. Takto se nová varianta patogena rychle rozšíří, což ale vyvolá i zmnožení počtu rezistentních jedinců hostitele a ve výsledku snížení reprodukční rychlosti patogena. Díky selekční výhodě rezistentních jedinců hostitele se jejich frekvence v populaci postupně zvýší. Mezitím ale měl patogen dostatek času, aby vyvinul další, virulentnější variantu, k níž už nový typ hostitele nebude rezistentní. Celý cyklus se pak dokola opakuje.

Schopnost hostitele vyhnout se patogenům a schopnost patogena využívat hostitele je většinou geneticky podmíněna. Pro každý druh je tedy důležité udržovat dostatečné množství různých variant genů, aby se mohl přizpůsobit novým podmínkám. Nedostatečná genetická variabilita představuje vážnou hrozbu pro zachování druhu (nebo populace).

Infekční nemoci představují neustálé nebezpečí pro všechny populace a druhy, ať už žijící volně, v zajetí nebo domestikované. Obzvláště velký význam má proto genetická diverzita v genech účastnících se imunitní odpovědi (IR genech).

2.3 MĚŘENÍ GENETICKÉ DIVERZITY

Rozvoj molekulární biologie v druhé polovině 20. století vedl ke vzniku mnoha technik pro zkoumání DNA. S jejich pomocí byly vyvinuty i ukazatele popisující celkovou variabilitu genomu – genetické markery. Pro následné zhodnocení a interpretaci dat získaných z genetických markerů byly na základě evolučně-biologických teorií vytvořeny matematické modely a ustanoveny standardní parametry genetické diverzity populací.

2.3.1 GENETICKÉ MARKERY

Genetických markerů existuje několik typů. Mezi nejstarší patří hlavně celogenomové RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů), RAPD (náhodně amplifikovaná polymorfni DNA) a AFLP (polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů). Tyto markery poskytují anonymní data, která lze těžko srovnávat s daty z jiných studií, a proto se v dnešní době už téměř nepoužívají. Moderními typy markerů jsou vybrané části mitochondriální DNA (mtDNA), mikrosatelity a jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs), které poskytují data srovnatelná napříč studiemi.

Mitochondriální DNA markery

Mitochondriální DNA představuje mimojadernou genetickou informaci. Většina mitochondriálního genomu je tvořena kódujícími sekvencemi, které jsou průběžně transkribovány. Výjimkou je zhruba 1 kbp dlouhý úsek zvaný D-smyčka, ve kterém začíná replikace a transkripce. Mitochondrie jsou děděny po mateřské linii, a proto jsou využívány převážně k evolučním studiím (př. Luis et al., 2006). Pro DNA mitochondrií je typická vyšší mutační rychlost, pramenící pravděpodobně z neefektivních reparačních mechanismů a vyšší koncentrace mutagenů (Wilson et al., 1985). Většina polymorfizmu se hromadí v D-smyčce, zatímco kódující oblasti zůstávají neměnné. Důvodem je nejspíš selekční tlak působící proti nově vzniklým, negativně se projevujícím mutacím (Brown et al., 1993). Tohoto rozdílu se využívá při výběru vhodného mitochondriálního markeru: pro studium blízké příbuzných skupin a jedinců se vybírá sekvence D-smyčky, zatímco pro vzdálenější taxony se upřednostňují kódující oblasti (např. gen pro cytochrom b). Z metodického hlediska je výhodou vyšší počet kopií mtDNA na buňku, což umožňuje snadnější amplifikaci při polymerázové řetězové reakci. Nevýhodou jsou četné jaderné kopie mitochondriálních genů, které mohou zkreslit výsledky (Zhang & Hewitt, 1996).

Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou tandemově uspořádané repetic krátkých, jedno- až šestinukleotidových sekvencí. Počet repetice se u jednotlivých mikrosatelitů liší, obvykle ale bývá od několika jednotek až po několik stovek. Mikrosatelity se vyskytují na všech chromozomech a jejich rozložení se zdá být náhodné. Nalezeny byly v kódujících oblastech, v intronech i v oblastech neobsahujících geny (Liu et al., 2001). Pro mikrosatelity je typická vysoká mutační rychlost (až 10^{-2} na generaci), která je pravděpodobně způsobena uklouznutím polymerázy během replikace (Tautz, 1989). Nově vzniklé varianty (alely) se od rodičovské liší většinou jen o jedno až dvě opakování. Během krátké doby se tak může v populaci vytvořit poměrně velké množství alel. Ke genotypizaci mikrosatelitů se používá přímá sekvenace s použitím primerů odpovídajících přilehlým sekvencím. Mikrosatelity jsou děděny kodominantně, od obou rodičů a využívají se k popisu diverzity a příbuzenských vztahů mezi plemeny (př. Achmann et al., 2004). Z velkého množství popsaných mikrosatelitů byla vybrána skupina reprezentativních, které se využívají celosvětově a umožňují tak srovnání různých studií mezi sebou.

Jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs)

SNP je polymorfismus způsobený bodovou mutací. Takto vzniklé varianty (alely) daného lokusu se liší pouze jedinou bází (jedinou pozicí v lokusu). Každý SNP se může vyskytovat ve čtyřech různých variantách (A, T, C a G), obvykle ale mívá varianty pouze dvě. Oproti mnohaalelickým mikrosatelitům poskytují SNPs jen malou informaci. Tato nevýhoda je však vyvážena obrovským množstvím jednonukleotidových polymorfizmů v genomu. Pro genotypizaci SNP se využívají různé metody. Mezi nejčastější patří SSCP (polymorfismus konformace jednořetězcové DNA), DGGE (gelová elektroforéza v denaturačním gradientu) a přímá sekvenace (Malmgren et al., 1996; Cariello et al., 1988). Velký pokrok přinesl vývoj genových chipů, které zachytí najednou stovky až tisíce různých SNP. Pomocí SNP lze zachytit polymorfismus, který nebylo možné zachytit s použitím starších typů markerů. Díky tomu a vysoce automatizované technologii chipů se SNP markery dostaly do popředí zájmu. Jednonukleotidové polymorfizmy představují kodominantní markery děděné od obou rodičů. Využívají se k popisu diverzity a příbuzenských vztahů mezi plemeny a populacemi (př. Pariset et al., 2006). Nevýhodou dodavadních technologií genotypizace SNP markerů je naprostá anonymita studovaných lokusů. To sice nevadí v populačních studiích popisujících diverzitu, ani při srovnání studií mezi sebou, ale výrazným způsobem to limituje další implikace. Například pro studium selekce je zapotřebí znát identitu lokusu a jeho funkci v organismu, aby bylo možné zhodnotit evoluční mechanismy působící na daný lokus. SNP markery lze najít i se známou anotací, jejich hromadná genotypizace pomocí chipů ale zatím není možná.

2.3.2 PARAMETRY GENETICKÉ DIVERZITY POPULACÍ

Heterozygotnost

Heterozygotnost je nejrozšířenější veličina pro měření genetické variability populací. Protože jsou jedinci diploidních druhů v daném lokusu buď heterozygoti nebo homozygoti, představuje heterozygotnost biologicky užitečné měřítko. Obvykle se používají dva druhy heterozygotnosti: h_e očekávaná (H_e ; z angl. expected heterozygosity) a h_o skutečná (pozorovaná; H_o ; z angl. observed heterozygosity). Tyto hodnoty se mohou v některých případech od sebe výrazně lišit. Jedná se o situace, kdy jsou frekvence jednotlivých genotypů ovlivněny častým samooplozením, nebo jsou dané geny děděny pouze po

mateřské/otcovské linii (mtDNA, chromozom Y). Pro tyto případy existují speciálně upravené vzorce pro výpočet. Pro účely běžných populačních studií, počítajících s dostatečným počtem jedinců v populaci, se používá následující vzorec:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) \quad (2.1)$$

kde n je počet kopií genu ve vzorku, k je počet haplotypů a p_i je frekvence i -tého haplotypu (Nei, 1987).

Počet polymorfních lokusů

Tato hodnota určuje, kolik ze studovaných lokusů se vyskytuje alespoň ve dvou variantách. Pro definování polymorfního lokusu se užívá frekvence alel, kdy frekvence častější alely nesmí překročit kritickou hranici - obvykle 0,99 u populací se 100 a více jedinci a 0,95 u populací menších. Někdy se místo počtu polymorfních lokusů používá jejich poměrné zastoupení z celkového počtu lokusů.

Počet alel

Počet alel, nebo též alelická diverzita či alelická bohatost, udává počet alel daného lokusu u dané populace. Často se uvádí i průměrný počet alel na jeden lokus u dané populace (N_A). Obě čísla mohou být ovlivněna počtem jedinců dané populace, a proto je třeba postupovat opatrně při porovnávání populací nestejně velikosti.

Efektivní počet alel

Další veličinou pro popis genetické diverzity je efektivní počet alel (n_e). Vyjadřuje se jako převrácená hodnota očekávané homozygotnosti, kdy homozygotnost je rovna $1 - \hat{H}$; a \hat{H} je heterozygotnost (viz vzorec 2.1).

2.3.3 GENETICKÉ DISTANCE

Genetické distance se používají ve velkých studiích (více populací i lokusů) ke zhodnocení množství variability sdílené studovanými skupinami. Pomáhají sjednotit získaná data a zviditelnit obecné vztahy mezi skupinami. Analogicky geometrickým distancím, i u distancí genetických nulová hodnota odpovídá nulovému rozdílu mezi skupinami.

Genetické distance je možné vyjádřit více způsoby, přičemž každý z nich má své limitace. Obecně platí, že čím více se hodnota distance vzdaluje nule, tím větší rozdíl mezi skupinami je. V rámci jedné studie tedy platí, že skupiny s větší hodnotou distance jsou si vzdálenější než skupiny s hodnotou menší. Porovnávat hodnoty z různých studií už tak snadné není, protože mohou být ovlivněny např. různým počtem jedinců nebo vnitřní variabilitou studovaných skupin. Porovnávat nelze ani hodnoty různých distancí mezi sebou, protože pro ně bývají použity jiné metody výpočtu.

Neiova (standardní genetická) distance

Asi nejčastěji používanou distancí je Neiova distance, také zvaná standardní genetická distance (D). Za předpokladu neutrality lokusů, genetického driftu a toho, že z každé mutace se stane alela, roste hodnota této distance lineárně v čase. Pokud nedochází k toku genů mezi populacemi, je Neiova distance lineární funkcí mutační rychlosti (Nei, 1972).

Koeficienty F

Jedná se o tři, vzájemně provázané koeficienty ukazující variabilitu na úrovni celé populace, subpopulací a jedinců. V populačních studiích se obvykle používá koeficient F_{ST} , který měří genetickou diferenciaci na úrovni celé populace (Wright, 1965).

Koeficient genové diference (G_{ST})

Tento koeficient, založený na Hardy-Weinbergově heterozygotnosti, je používán i jako ukazatel genetické vzdálenosti subpopulací. Nevýhodou je jeho závislost na vnitřní variabilitě subpopulací, která může zejména u multialelických lokusů (př. mikrosatelity) zkreslovat výsledky (Nei, 1973).

2.4 KŮŇ JAKO MODELOVÝ ORGANIZMUS

Kůň domácí (*Equus caballus*) provází člověka už několik tisíc let. Sloužil jako dopravní prostředek a pomocník při práci. V dnešní době se těžiště jeho využití posunulo do oblasti sportu a volného času. Vzhledem ke svému kosmopolitnímu rozšíření a přirozené citlivosti k infekcím, které jsou nebezpečné i pro člověka, představuje potenciální nebezpečí, ale i vhodný model pro výzkum.

Systematické zařazení

Říše: *Animalia* (Živočichové)

Kmen: *Chordata* (Strunatci)

Třída: *Mammalia* (Savci)

Řád: *Perissodactyla* (Lichokopytníci)

Čeleď: *Equidae* (Koňovití)

Rod: *Equus* (Kůň)

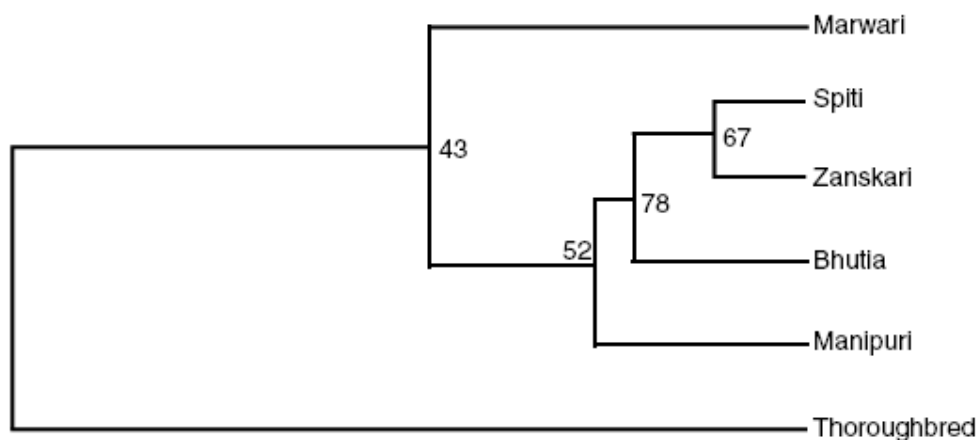
Druh: *Equus caballus* (Kůň domácí)

2.4.1 KONĚ A GENETICKÁ DIVERZITA

Stejně jako u ostatních druhů, i u koní vždy existovala přirozená variabilita v různých znacích. Od chvíle, kdy byl kůň domestikován, byli vybíráni jedinci s vlastnostmi vhodnými pro člověka. Cílené šlechtění vedlo ke vzniku velkého množství plemen, která se od sebe více či méně liší. Dnes tak můžeme najít jedince různých velikostí, tvarů a barev, navíc přizpůsobené životu v nejrůznějších podmínkách - od pouští až po severské a vysokohorské krajiny.

Dlouhodobý výběr jedinců, kteří budou použiti k rozmnožování, vede k postupnému snižování přirozené variability, včetně té genetické. Pro měření genetické diverzity, se u koní využívají převážně mikrosatelity. S jejich pomocí se popisuje různorodost jednotlivých plemen, ale i oddělených populací stejného plemene (př. Achmann et al., 2004), dále pak genetická vzdálenost či podobnost, popřípadě příslušnost jedinců k danému plemeni. Většina plemen je mnohonásobně vzájemně prokřížena, ale přesné záznamy často chybí. V takových případech se používají mitochondriální markery, které pomohou evoluční vztahy rozkrýt

(př. Luis et al., 2006). Ukázkou využití genetických markerů pro popis příbuzenských vztahů mezi plemeny lze vidět na obrázku 2.1.



Obr.2.1: Dendrogram ukazující genetické vztahy mezi pěti Indickými plemeny koní a Anglickým plnokrevníkem (Thoroughbred) vytvořený na základě analýzy mikrosatelitů (Behl et al., 2007).

2.4.2 MODELOVÉ POPULACE A JEJICH VÝZNAM

Camargue

Camargue neboli Camargský kůň je plemeno koní pocházející z oblasti Camargue v Jižní Francii. Jedná se o malé, svalnaté koně typické svou bílou barvou a velkou odolností. Původ plemene se odvozuje od divokých koní, kteří se v 7. a 8. století n.l. v oblasti Camargue mísili s plemeny, jež se tam dostala z Arábie. Ve starověku a středověku byli Camargští koně oblíbeni u Keltských a Románských nájezdníků a díky nim byli často kříženi s dalšími plemeny zejména Pyrenejského poloostrova. Po objevení Ameriky byli španělští koně dováženi za oceán, kde ovlivnili mnoho tamních plemen. Rysy Camargů lze proto najít např. u Chilského koně nebo Argentinského Criolla. Později byl Camargský kůň křížen s Berbery a Arabskými a Anglickými plnokrevníky ve snaze zušlechtit plemeno. Tyto snahy byly v roce 1978 přerušeny francouzskou vládou, která založila plemennou knihu s cílem uchovat plemeno se všemi jeho primitivními (původními) rysy (Edwards, 1994).

Většina dnešních Camargů stále žije v oblasti svého původu – v deltě řeky Rhôny. Jedná se o bažinatou krajinu porostlou keří a tvrdými travinami, s vlhkým a teplým podnebím. Oblast je typická výskytem mnoha parazitů, k nimž si Camargští koně vyvinuli rezistenci. Mezi nejzávažnější parazity této oblasti patří prvoci rodu *Babesia* a *Theileria*, bakterie rodu *Anaplasma* a virus západonilské horečky (Murgue et al., 2001).

Murgese

Koně plemene Murgese pocházejí z jižní Itálie z oblasti Murge v Apulii. Jsou to středně vysokí koně mohutné postavy s klabonosou hlavou a černou nebo tmavě hnědou barvou. Vznik plemene se datuje do 12. století n.l., kdy byla místní plemena Neapolského koně, Aveliňského koně a Italského tažného koně křížena s dovezenými Berberskými koňmi a Arabskými plnokrevníky. Největšího rozvoje dosáhlo plemeno v 15. a 16. století, kdy bylo využíváno pro vojenské účely. Jeho popularita v pozdějších staletích poklesla a počet jedinců se snížil až na hranici vyhynutí. V roce 1928 byla založena plemenná kniha a bylo vybráno 46 klisen a 9 hřebců, z nichž bylo plemeno obnoveno. Dnes čítá více než 1500 jedinců (Buonavolontà & Silvestrelli, 1986).

Mnoho koní plemene Murgese dnes stále žije v oblasti svého vzniku. Jde o aridní, kopcovitou oblast s drsným klimatem, v zimě velmi chladným a v létě horkým a suchým, poskytující chudou pastvu. I zde se vyskytuje množství parazitů, včetně prvků rodu *Babesia* a *Theileria*, zmiňovaných u plemene Camargue. Výskyt Viru západonilské horečky byl popsán u koní v severní Itálii (Cantile et al., 2000), u plemene Murgese však nebyl nikdy zaznamenán.

Islandský pony

Islandský pony či Islandský kůň je jediné plemeno koní nacházející se na území Islandu. Tito koně jsou malého vzrůstu, dožívají se vysokého věku a jsou výjimeční svou schopností pohybovat se dvěma chody se specifickým nohosledem zvanými tölt a skeið. Předci Islandských koní byli na Island pravděpodobně přivezeni Vikingy mezi lety 860 a 935 n.l. ze severní Evropy. Následně, během vlny imigrace z Britských ostrovů, byli přivezeni další koně. Jednalo se nejspíš o předchůdce dnešních Shetlandských, Skotských horských a Connemarských poníků, kteří zkřížením s dříve dovezenými koňmi dali vzniknout Islandskému ponymu. V druhé polovině 10. století byli přivezeni koně z Asie ve snaze oživit Islandské koně. Příměs východních koní však způsobila zchoulostivění místní

populace, a tak roku 982 n.l. vydal islandský parlament zákon zakazující dovážet koně na Island. Díky tomu se Islandský kůň vyvíjel izolovaně po více než 1000 let.

Ve vývoji plemene hrálo důležitou roli šlechtění a po roce 1300 n.l., kdy došlo k ochlazení klimatu, i přirozená selekce. Po výbuchu sopky v roce 1783 n.l. se původní početná populace zredukovala na 30%. V dnešní době žije na světě přibližně 180 000 Islandských koní, z nichž 80 000 na Islandu (Edwards, 1994).

Podnebí Islandu je velmi chladné a poskytuje chudou pastvu. Islandští koně žijící na Islandu nebývají nemocní, protože se zde nevyskytují téměř žádné parazity (Svansson, 2004). To je umožněno stálou platností zákona zakazujícího dovoz koní na Island, včetně těch, kteří byli z Islandu exportováni. Naivita jejich imunitního systému způsobuje problémy jedincům vyvezeným do ciziny. Ti bývají často nemocní a trpí různými alergii (Brostrom & Larsson, 1987).

2.4.3 VYBRANÉ PATOGENY MODELOVÝCH POPULACÍ

Virus západonilské horečky

Virus západonilské horečky (West Nile virus, WNV) patří do serologického komplexu viru Japonské encefalitidy rodiny *Flaviviridae* (Heinz et al., 2000). Virion o průměru 50 nm je tvořen nukleokapsidovým jádrem a pozitivní jednořetězcovou RNA (+ssRNA) obklopenou obálkou. Virus se vyskytuje ve dvou liniích. První linie byla izolovaná na severovýchodě USA, v Evropě, Izraeli, Africe, Indii a Rusku. Druhá byla nalezena jen v oblasti subsaharské Afriky a na Madagaskaru (Lanciotti et al., 2002).

Virus se obvykle přenáší pomocí krev sajícího vektoru, nicméně i přímý přenos byl popsán (Komar et al., 2003). Nejčastějším vektorem jsou komáři rodu *Culex*, ale virus byl izolován i z dalších krev sajících parazitů (Hubalek & Halouzka, 1999).

Infekce Virem západonilské horečky byla popsána u mnoha obratlovců včetně ptáků, kteří představují přirozený rezervoár (Komar et al., 2003), krokodýlů (Steinman et al., 2003), hlodavců (Chastel et al., 1982), ovcí a lidí (Olaleye et al., 1990). U koní většinou probíhá bez klinických projevů nemoci. Ty se objevují jen u 10 – 12% nakažených zvířat. Obvykle jde o ataxii, slabost a polehávání, což je výsledek nervového poškození míchy. V další fázi se může vyskytnout cvakání zubů a agresivita či jiné projevy poškození mozku. Někdy se objevuje i horečka a nechutenství. Klinické projevy se částečně liší oblast od oblasti, což je

připisováno různým variantám viru. Úmrtnost je mezi 28% (Murgue et al., 2001) a 45% (Tber, 1996).

Anaplasma phagocytophilum

Anaplasma phagocytophilum, dříve nazývaná *Ehrlichia phagocytophilum* nebo *Ehrlichia equi*, je Gram-negativní bakterie z řádu *Rickettsiales*. Jedná se o intracelulárního parazita, který napadá granulocyty mnoha savců včetně hlodavců, psů, ovcí, koní a lidí (Dumler et al., 2001). Napadení jedinci trpí horečkou, zimnicí a bolestí svalů, z krevních rozborů je patrný úbytek bílých i červených krvinek a krevních destiček. Pokud je infekce pozdně diagnostikována, bývá fatální (Lepidi et al., 2000).

Bakterie je přenášena krev sajícím vektorem. Za hlavní přenašeče jsou považována klíšťata rodu *Ixodes* (Hodzic et al., 1998). *A. phagocytophilum* má schopnost měnit svůj hlavní povrchový protein označovaný p44. Tento způsob antigenní variability využívá k úniku před hostitelským imunitním systémem a ptažmo ke zvýšení šance přenosu na další hostitele (Wang et al., 2004).

Piroplazmy

Babesia caballi a *Theileria equi* (dříve *Babesia equi*) jsou parazitické prvoci patřící do řádu *Piroplasmida*, třídy *Aconoidasida* (krvinkovky). Jejich merozoitové stádium napadá červené krvinky koní, oslů, mul a zeber a způsobuje tak onemocnění projevující se horečkou, anémií, žloutenkou a zvětšením jater a sleziny. U jedinců z oblastí bez výskytu piroplazem mívá nákaza vysoké procento úmrtnosti. (Holbrook, 1969).

Pro přenos piroplazem je také zapotřebí krev sající vektor. V tomto případě se jedná o čtrnáct druhů klíšťat patřících do rodů *Dermacentor*, *Rhipicephalus* a *Hyalomma* (Friedhoff et al., 1990).

2.5 VYBRANÉ GENY OBRANYSCHOPNOSTI

Z velkého množství genů imunitní odpovědi byly pro tuto práci vybrány následující:

2.5.1 CYTOKINY A JEJICH RECEPTORY

Cytokiny jsou tkáňové hormony bílkovinného charakteru, zajišťující základní regulaci imunitního systému. Jsou sekretovány převážně bílými krvinkami a prostřednictvím svých receptorů působí na řadu buněk nejen imunitního systému. Cytokiny se dělí do několika skupin, z nichž lze jmenovat dvě, které byly použity v této práci: interleukiny a interferony. Interleukiny jsou různorodá skupina, jejíž hlavní funkcí je regulovat rozličné aspekty vývoje a aktivace leukocytů. Interferony naproti tomu představují důležitou součást neadaptivních antivirových obranných mechanismů.

Interleukin 7 (IL-7) a jeho receptor (IL-7R)

Interleukin 7 je 25 kDa velký cytokin produkovaný ve stroma kostní dřeně. Funguje jako stimulační signál pro lymfoidní progenitorové buňky, které na svém povrchu exprimují příslušný receptor – IL-7R (Kondo et al., 1997). Signalizace pomocí IL-7 – IL-7R je zcela zásadní pro raný vývoj lymfoidních buněk a bylo prokázáno, že nepřítomnost IL-7 nebo IL-7R vede k zablokování vývoje progenitorů v B- a T-lymfocyty (Peschon et al., 1994).

Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin 10 je cytokin o velikosti 40 kDa produkovaný neutrofily, makrofágy a některými typy B- a T-lymfocytů. Slouží jako pozitivní regulátor pro aktivaci a diferenciaci B-lymfocytů (Rousset et al., 1992) a růstový faktor pro regulační (tlumivé) T-lymfocyty (Kemper et al., 2003). Kromě toho má i protizánětlivé účinky díky negativní regulaci cytokinů TNF α , IL-1, IL-8 and Ifn γ (de Waal et al., 1991).

Interleukin 12 (IL-12), interleukin 23 (IL-23) a jejich receptory

Interleukin 12 a interleukin 23 jsou členy malé rodiny heterodimerních prozánětlivých cytokinů (Langrish et al., 2004). Oba interleukiny jsou tvořeny stejnou podjednotkou p40 (podle velikosti 40 kDa) kovalentně vázanou k podjednotce p35 v případě

IL-12 a podjednotce p19 v případě IL-23 (Oppmann et al., 2000) . IL-12 i IL-23 jsou produkovány převážně aktivovanými dendritickými buňkami a fagocyty. Receptory obou cytokinů jsou opět heterodimerní proteiny složené ze společné podjednotky IL-12R β 1 vázané k podjednotce IL-12R β 2 u receptoru pro IL-12 a k podjednotce IL-23R u receptoru pro IL-23. Oba typy receptorů jsou exprimovány na T-lymfocytech a NK buňkách, ačkoliv malé množství receptoru pro IL-23 bylo nalezeno i na monocytech, makrofázích a dendritických buňkách (Parham et al., 2002) . Navzdory těmto podobnostem jsou funkce obou cytokinů odlišné. IL-12 vede k vývoji „klasických“ T_H1 buněk produkujících Ifn γ , čímž spouští cytotoxické, protimikrobiální a protirakovinné obranné mechanismy. IL-23 naproti tomu působí v dráze vedoucí k tvorbě CD4⁺ T-lymfocytů produkujících IL-17 a nepřímo aktivuje řadu prozánětlivých buněk (Aggarwal et al., 2003; Cua et al., 2003).

Interleukin 17 (IL-17) a jeho receptor (IL-17R)

Interleukin 17 je homodimerní cytokin vyskytující se v několika variantách (IL-17A-F) (Aggarwal & Gurney, 2002). Je produkován CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty (Infante-Duarte et al., 2000; Happel et al., 2003) a funguje jako signál pro tvorbu mnoha prozánětlivých cytokinů. IL-17 je rozeznáván specifickým receptorem (IL-17R), který je exprimován většinou periferních tkání (Fossiez et al., 1996).

Interferon gamma (Ifn γ , IfnG)

Interferon gamma je cytokin produkováný antigenně specifickými T_H1 lymfocyty a NK buňkami jako odpověď na řadu intracelulárních parazitů včetně bakterií rodu *Mycobacterium* a *Listeria* (Kiderlen et al., 1984) . Signalizace pomocí IfnG aktivuje makrofágy a stimuluje expresi MHC glykoproteinů, což jsou hlavní mechanismy antimikrobiální obrany (Murray et al., 1983).

2.5.2 TOLL-LIKE RECEPTORY

Toll-like receptory (dle receptoru Toll, popsaného u drosofil; Hashimoto et al., (1988)) jsou povrchové a intracelulární receptory fagocytů, které rozeznávají chemické struktury charakteristické pro celou řadu patogenů. Některé typy rozeznávají i tělu vlastní molekuly produkované při poškození tkáně. Aktivace Toll-like receptorů vede k expresi

mnoha prozánětlivých cytokinů a receptorů na povrchu antigen prezentujících buněk (APC). Sekrece cytokinů i produkce povrchových receptorů APC jsou důležité pro interakci s adaptivními složkami imunitního systému. Toll-like receptory tak zprostředkovávají spolupráci imunity nespecifické s antigenně specifickou.

Toll-like receptor 2 (TLR2)

TLR2 je povrchový receptor exprimovaný na mnoha typech buněk (mikroglíích, Schwannových buňkách, makrofázích, B- a T-lymfocytech a dalších). Rozeznává mnoho mikrobiálních komponent: lipoproteiny a peptidoglykany Gram-pozitivních bakterií, GPI kotvy trypanozom, zymosan hub a další (Takeuchi & Akira, 2002). Umění rozpoznávat tak velké množství struktur je přisuzováno schopnosti tvořit heterodimery s jinými typy TLR receptorů (Takeda & Akira, 2005).

Toll-like receptor 3 (TLR3)

TLR3 je intracelulární receptor, přítomný na membráně endosomů. Rozeznává dvouřetězcovou RNA, čímž zprostředkovává obranu proti většině RNA virů (Takeda & Akira, 2005).

2.5.3 DALŠÍ GENY ÚČASTNÍCÍ SE IMUNITNÍ ODPOVĚDI

Nramp1

Nramp1 (z angl. natural-resistance-associated macrophage protein 1), také označovaný jako Slc11a1, je integrální membránový protein typický pro fagocyty. Strukturou je velmi podobný iontovým kanálům a transportérům a pravděpodobně funguje jako pH dependentní pumpa pro přenos Fe^{2+} a Mn^{2+} iontů (Poon & Schurr, 2004). Bylo prokázáno, že gen *Nramp1* je zodpovědný za rezistenci k intracelulárním parazitům rodu *Salmonella*, *Leishmania* a *Mycobacterium* (Plant & Glynn, 1976; Bradley, 1977; Gros et al., 1981).

Indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (iNOS)

Oxid dusnatý (NO) je signální molekula mnoha tkání, ale i účinná baktericidní látka používaná k zabíjení intracelulárních parazitů makrofágy. Produkuje ho enzymový komplex NO syntáza, který se vyskytuje ve dvou variantách. Běžná NO syntáza (cNOS) je stále přítomná ve spoustě buněk. Naproti tomu NO syntáza fygocytů (iNOS) je produkována až po signalizaci cytokiny z T_H1 lymfocytů (Buchmeier & Schreiber, 1985; Xie et al. 1992).

VISA

VISA (z angl. virus-induced signaling adapter), označovaný také IPS-1, MAVS nebo Cardif, je 62 kDa velký adaptorový protein, který hraje zásadní roli v protivirové obraně. V prvotní fázi buněčné obrany vážou virovou RNA specializované receptory (TLR3) a RNA-helikázy. VISA adaptor zprostředkovává přenos signálu z RNA vázajících receptorů a helikáz na proteiny signální dráhy vedoucí k produkci interferonů α a β (Kawai et al., 2005; Xu et al., 2005).

Jaderný faktor κ B (NF- κ B)

NF- κ B je transkripční faktor, který se běžně vyskytuje v neaktivní formě (tj. vázaný k inhibitoru I κ B) v cytosolu. Obvykle funguje ve formě heterodimeru tvořeného dvěma nestejně velkými polypeptidy, ale byly popsány i homodimerní formy tvořené jedním či druhým typem polypeptidu (Baeuerle & Baltimore, 1991). K aktivaci NF- κ B dochází při přímém napadení buňky virem nebo bakteriemi, a také po obdržení signálu formou prozánětlivých cytokinů. Aktivní NF- κ B následně v jádře spouští expresi různých genů kódujících obranné a signalizační proteiny (Lenardo & Baltimore, 1989).

Oligoadenylát syntáza (OAS)

2'-5' oligoadenylát syntázy představují důležitou součást protivirové obrany savců. Virová infekce spouští signální dráhu využívající interferony, která vede k tvorbě OAS. Syntáza produkuje 2'-5' oligoadenylát, který aktivuje zvláštní endoribonukleázu zvanou RNáza L. Následuje štěpení virové i buněčné RNA a smrt infikované buňky. Kromě protivirové obrany se OAS účastní mnoha dalších buněčných pochodů (genové regulace, DNA replikace, sestřihu RNA, atd.) (Justesen et al., 2000).

MXA

MXA (z angl. Myxovirus resistance protein A) je člen rodiny velkých, dynaminu podobných GTPáz, původě popsaných jako faktory rezistence vůči influenze typu A u myší (Haller et al., 1998). U člověka byla, kromě jeho role v rezistenci vůči chřipce, popsána úloha v obraně proti celé řadě RNA virů (Haller & Kochs, 2002). Exprese genu *MXA* je indukována interferony alfa, beta a lambda, pro což je gen *MXA* využíván jako marker virové infekce (Holzinger et al., 2006).

3. CÍLE PRÁCE

- Charakterizovat genetickou diverzitu tří plemen koní ve dvou typech genetických markerů a provést jejich srovnání se zřetelem na výskyt endemických patogenů.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 ANALYZOVANÉ VZORKY

Studovaným materiálem byly tři populace koně domácího (*Equus caballus*) – Camargue, Murgese a Islandský pony. Každému z nich bylo z jugulární žíly odebráno 10 ml krve do zkumavek obsahujících 0,5 ml 0,5 M EDTA (pH 7,8) coby antikoagulant. Krevní vzorky byly následně uskladněny při teplotě - 20 °C.

Plemeno Camargue

Soubor obsahoval 50 nepříbuzných koní obojího pohlaví, narozených a celoživotně žijících v oblasti Camargue (jižní Francie). Jde o humidní oblast v deltě řeky Rhôny, kde se endemicky vyskytují prvoci *Theileria equi* a *Babesia caballi*, bakterie *Anaplasma marginale* a virus západonilské horečky (West Nile Virus – WNV). Vzorky poskytla v rámci spolupráce na společném grantovém projektu dr. Agnes Leblond z Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Francie. Jako místní plemeno je populace dlouhodobě adaptovaná na místní podmínky, včetně endemických patogenů.

Plemeno Murgese

Soubor obsahoval 50 nepříbuzných koní obojího pohlaví, narozených a celoživotně žijících v oblasti Reggio di Puglia (jižní Itálie). Také v této aridní oblasti se endemicky vyskytují prvoci *Theileria equi* a *Babesia caballi* a koně Murgese jsou zde původním plemenem. Vzorky poskytla v rámci spolupráce na společném grantovém projektu dr. Elisa Pieragostini z Facolta di Medicina Veterinaria v Bari, Itálie.

Plemeno Islandský pony

Soubor obsahoval 91 nepříbuzných koní obojího pohlaví, narozených na Islandu a v dospělosti přivezených do kontinentální Evropy. Island je charakteristický minimálním výskytem koňských patogenů. Vzorky poskytla v rámci spolupráce na grantovém projektu dr. Eliane Marti, Vetsuisse Fakultät Bern, Švýcarsko.

4.1.1 IZOLACE DNA

Pro izolaci DNA z krevních vzorků byl použit kit NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Německo). Izolace byla provedena podle standardního protokolu dodávaného společně s kitem následujícím způsobem:

1. K 200 μ l krve přidat 25 μ l proteinázy K a 200 μ l B3 pufru, 15 s protřepávat a poté inkubovat 15 min při 75°C
2. Přidat 210 μ l 96% ethanolu, přenést na kolonku ve zkumavce a centrifugovat 60 s/11000 otáček
3. Přidat 500 μ l BW pufru, centrifugovat 60 s/11000 otáček
4. Přidat 600 μ l B5 pufru, centrifugovat 60 s/11000 otáček
5. Opakovat centrifugaci
6. Kolonku předat do nové ependorfy, přidat 50 μ l EB pufru, nechat 1 min stát
7. Centrifugovat 60 s/11000 otáček
8. Opakovat kroky 6 a 7; přečištěná DNA pak bude v ependorfce

Promývací pufr:

B3 - pufr s chaotropními ionty – přispívá k lyzi buněk

BW a B5 - promývací pufr, zajistí odmytí zbytků buněk

EB - eluční pufr (slabě zásaditý), uvolní DNA ze silikagelové membrány kolonky

Úspěšnost izolace a přibližná koncentrace DNA byly zjištěny gelovou elektroforézou v 1% agarózovém gelu s použitím vzorku o známé koncentraci DNA ($c = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$) jako standardu. Složení gelu a nanášek na gel bylo následující:

1% agarózový gel: Agaróza (Serva, Heidelberg, Germany)

1 x TBE pufr: Tris (hydroxymethyl aminomethan) (Serva).... 21,56 g
Kyselina boritá (Serva)..... 11 g
0,5 M EDTA (Amresco, Boise, USA)..... 8 ml
doplnit do 2000 ml destilovanou vodou
Ethidiumbromid (0,1 mg/ml, Serva).....1 µl na 60-70ml gelu

Nanášení na gel: Vzhledem ke koncentraci standardizovaného vzorku 100ng/µl, byla z mikrotitrační destičky na gel nanášena směs (připravena pro každý vzorek zvlášť): DNA.....1µl
nanášecí pufr.....4µl
d.H₂O.....5µl

Následné elektroforetické rozdělení bylo prováděno 20 minut při napětí 100V, v 1 x TBE pufru. Výsledné hodnoty byly okometricky odečteny pomocí transiluminátoru. Získaná DNA pak byla uskladněna při teplotě 4°C pro další použití. Na izolaci DNA se podílely laborantky Ústavu genetiky VFU.

4.2 GENETICKÉ MARKERY

Pro studii byly použity dva typy genetických markerů – mikrosatelity a jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs) v genech imunitní odpovědi. Zvolené metodiky získání dat jsou popsány dále u jednotlivých typů markerů.

4.2.1 MIKROSATELITY

Bylo analyzováno 30 mikrosatelitů využívaných ke studiu genetické diverzity (Mullis-Glowatzki). Názvy mikrosatelitů a čísla chromozomů, na kterých leží jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Název lokusu	Leží na chromozomu	Název lokusu	Leží na chromozomu	Název lokusu	Leží na chromozomu
AHT4	<i>Eca</i> 24	HTG10	<i>Eca</i> 21	EB2E8	<i>Eca</i> 26
AHT5	<i>Eca</i> 08	VHL20	<i>Eca</i> 30	UM32	<i>Eca</i> 14
HMS1	<i>Eca</i> 15	ASB2	<i>Eca</i> 15	TKY301	<i>Eca</i> 23
HMS2	<i>Eca</i> 10	ASB17	<i>Eca</i> 02	UM11	<i>Eca</i> 20
HMS3	<i>Eca</i> 09	ASB23	<i>Eca</i> 03	TKY337	<i>Eca</i> 04
HMS6	<i>Eca</i> 04	CA425	<i>Eca</i> 28	TKY321	<i>Eca</i> 20
HMS7	<i>Eca</i> 01	LEX3	<i>Eca</i> X	TKY374	<i>Eca</i> 01
HTG4	<i>Eca</i> 09	TKY333	<i>Eca</i> 28	TKY294	<i>Eca</i> 27
HTG6	<i>Eca</i> 15	HMS5	<i>Eca</i> 05	TKY297	<i>Eca</i> 01
HTG7	<i>Eca</i> 04	HTG3	<i>Eca</i> 16	TKY394	<i>Eca</i> 24

Tab.4.1: Mikrosatelity použité pro studii populací Camargue, Murgese a Islandský pony

4.2.1.1 GENOTYPIZACE MIKROSATELITŮ

Všechny mikrosatelity byly sekvenovány na automatickém sekvenátoru ABI Prism310 (Applied Biosystems) v laboratoři molekulární genetiky AF (ing. Irena Vrtková). DNA všech analyzovaných jedinců byla poskytnuta naší laboratoří.

4.2.2 SNPs V GENECH IMUNITNÍ ODPOVĚDI

Ve studii bylo analyzováno 21 jednonukleotidových polymorfizmů v 18 genech. Pro analýzu byly vybrány kandidátní geny, jejichž produkty se účastní imunitní odpovědi, a které mohou být důležité v boji s endemickými patogeny studovaných populací. Základní informace o studovaných polymorfizmech včetně referencí k použité metodice shrnuje tabulka 4.2.

SNP markery byly identifikovány a metodiky jejich genotypizace byly vypracovány v laboratoři školícího pracoviště. V případě genu TLR3 jsem identifikaci SNP i metodiku genotypizace provedla sama a v případě genu IL23p19 jsem metodiku optimalizovala (metodiky popsány v 4.2.2.5 až 4.2.2.8). Jednotlivé polymorfizmy byly analyzovány metodou PCR – RFLP. Vzniklé fragmenty byly analyzovány na polyakrylamidovém gelu (PAAG).

Název lokusu	Zkratka lokusu	Pozice na kontigu	Pozice na chromozomu	Typ SNP	Reference
Interleukin 7 receptor	IL7R	NW_001867391 A25339825G	<i>Eca</i> 21 25339825	Ex, S	Nový
Interleukin 10	IL10	NW_001799719.1 T2988097C	<i>Eca</i> 05 2988097	Int	Nový
Interleukin 12, subunit 35	IL12p35	NW_001867417.1 G1189314A	<i>Eca</i> 05 1189314	Int	Kralik et al., 2006
Interleukin 12, subunit 40	IL12p40	NW_001867377.1 G20202453A	<i>Eca</i> 14 20202453	Ex, S	Kralik et al., 2006
Interleukin 12 receptor, subunit β 2	IL12R β 2	NW_001867420.1 G44643973C	<i>Eca</i> 05 44643973	Ex, NS	Kralik et al., 2006
Interleukin 23, subunit 19	IL23p19a	NW_001867424.1 C15219989A	<i>Eca</i> 06 15219989	Int	Kralik et al., 2006
Interleukin 17A	IL17A	NW_001867389.1 T49864780C	<i>Eca</i> 20 49864780	Int	Nový
Interleukin 17A receptor	IL17RAa	NW_001867423.1 T921254C	<i>Eca</i> 06 921254	3'UTR	Nový
Toll-like receptor 2	TLR2	NW_001867405.1 C6540743T	<i>Eca</i> 02 6540743	Ex, NS	Nový
Toll-like receptor 3	TLR3a	NC_009170.2 C24189093A	<i>Eca</i> 27 24189093	Ex, NS	Nový
inducible nitric oxide synthase	iNOS	NC_009154.2 C41915001T	<i>Eca</i> 11 41915001	Int	Horin et al., 2004
Interferon gamma	IfnGa	NW_001867424.1 G24585624C	<i>Eca</i> 06 24585624	Int	Horin et al., 2004
	IfnGb	NW_001867424.1 G24587636C	<i>Eca</i> 06 24587636	Int	
Natural resistance associated macrophage protein 1	Nramp1a	NW_001867422.1 G585093A	<i>Eca</i> 06 585093	5'UTR	Matiasovic et al., 2002
	Nramp1b	NW_001867422.1 C585025T	<i>Eca</i> 06 585025	5'UTR	
Virus-induced signaling adapter	VISA	NW_001867392 T19088287C	<i>Eca</i> 22 19088287	Int	Nový
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells subunit 1, resp. 2	NF κ B1b	NW_001867411.1 A734451G	<i>Eca</i> 03 734451	Ex, NS	Nový
	NF κ B2	NW_001867386.1 G27760536T	<i>Eca</i> 01 27760536	Int	Nový
2'5'-oligoadenylate synthetase, exon 2 resp. exon 4	OAS1e2	NW_001870614 C22870T	<i>Eca</i> 08*	Ex, S	Nový
	OAS1e4	NW_001870614 C8761G	<i>Eca</i> 08*	Ex, NS	Nový
Myxovirus resistance A	MXA	NW_001867397 G37086498C	<i>Eca</i> 26 37086498	Ex, NS	Nový

Tab.4.2: Studované SNPs genů imunitní odpovědi; Ex = exonový, S = synonymní, NS = nesynonymní, Int = intronový, * kontig nepřijazěn k chromozomu

4.2.2.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena u všech polymorfizmů na thermocycleru DNA Engine PTC-200 (MJ Research INC. USA) podle programu opimalizovaného pro každý polymorfizmus. Obecný program a složení reakční směsi jsou popsány níže. Parametry specifické pro každý polymorfizmus (lokus) jsou uvedeny v tabulce 4.3. Při každé reakci byla použita negativní kontrola, aby se zamežilo chybě způsobené kontaminací. Negativní kontrola obsahovala kompletní reakční směs stejnou s ostatními vzorky, ale postrádala DNA.

Složení reakční směsi:

primer1 (10pmol/μl)	1,00μl
primer2 (10pmol/μl)	1,00μl
dNTPs (2,5μmol/μl; Roche molecular biochemicals, Mannheim, Germany)	1,00μl
polymeráza (5U/μl; <i>Taq</i> nebo Hot Start <i>Taq</i>)	0,10μl
<i>(Taq</i> polymeráza - TopBio s r. o., Praha, ČR; <i>HST</i> polymeráza - Qiagen Inc., USA)	
10 x PCR pufr (Qiagen Inc., USA)	1,25μl
sterilní d.d.H ₂ O	7,15μl
DNA daného vzorku (100ng/μl)	1,00μl

Obecný program PCR:

1. 95°C 2min/15min (pro: *Taq* polymerázu/ Hot Start *Taq* polymerázu)
2. 94°C 30s
3. T_A°C 30s
4. 72°C t_{synt} min: s
5. go to 2 34 x (zpět na krok 2, 34 krát)
6. 72°C 10min
7. 6°C ∞ (neomezeně dlouho)

Zkratka lokusu	Primer 1 (5'→3') Primer 2 (5'→3')	Teplota anealing u T _A [°C]	Polym eráza	Délka množenéh o úseku [bp]	Délka synt. fáze t _{synt} [min:s]
IL7R	tggtggtgtgtctctcttcttc tgggtttcttacacttactgg	60	HST	573	0:40
IL10	tctgccctgtgaaaataagagc tgtcaaacactcactcatggcttt	62	HST	1195	1:20
IL12p35	gccaggcaaaccttagaat ctgcatcagcttgcaatgg	60	Taq	817	1:00
IL12p40	cttgccctggacctgaatagag ctacaccagcggcttctcatc	67	Taq	1582	2:30
IL12Rβ2	gctccagaacagcctcaaaa gtgaatgtggatggaagtgaag	57	Taq	1213	1:20
IL23p19a	gcagagattccacagggact ccaacggacaaggacagat	58	HST	652	0:40
IL17A	ctctctcttgccttctcag ggctgtcctgtgtcctatca	60	HST	411	0:30
IL17RAa	gcaggcacacacctaaccct ggggacagaagatgaccaga	60	HST	1732	1:50
TLR2	ttgtgatccactggtgtc ccaggtaggtcttgggttctc	64	Taq	2122	2:20
TLR3a	gagctgtgcagtagagggatg ggacgtggaggtgagaaaga	60	HST	1212	1:20
iNOS	catcagaggggacctgcctct gatgttgtagcgtggcatcac	65	HST	1800	1:50
IfnGa,b	tactctggaactcagtcattgctgaga gaaatggattctgactcctcttc	62	HST	2391	2:20
Nramp1a,b	ggctggccacttctgcctttg cactccccatccaggcactgtc	60	HST	239	0:25
VISA	ctaaagtgcctgccaatcaag agcagacacaaggcaggaag	64	HST	1600	1:45
NFκB1b	tgtatctcctgcccttctg ccttacctgctgctttgagg	62	HST	1354	1:25
NFκB2	ctagcccagagacatggag ccagacagcagtgaccat	56,5	HST	712	0:45
OAS1e2	gcaaaggcacgaccctcaga tcaaattccaccctcattg	62	HST	164	0:20
OAS1e4	tgcaaggataaactgggaaa gggtttcttgagctgccttt	59	HST	231	0:30
MXA	aacaagaaaatgaagctgagaagtcgatcc catcgaggactctgtggaagtgtttgagc	60	HST	182	0:20

Tab.4.3: Primery pro jednotlivé lokusy byly vyrobeny firmou Generi Biotech, Hradec Králové. Taq = Taq polymeráza, HST = Hot Start Taq polymeráza

4.2.2.2 AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA - KONTROLA PCR PRODUKTŮ

Úspěšnost PCR byla zjištěna elektroforézou v 1% agarózovém gelu (složení viz podkapitola 4.1.1). Elektroforéza probíhala 40 minut při napětí 100V, v 1x TBE pufru. Z mikrotitrační destičky byla na gel nanášena směs (připravena pro každý vzorek zvlášť):

produkt PCR.....3μl
nanášecí pufr.....3μl

Na gelu byla u každého vzorku sledována přítomnost proužku o správné velikosti. K určení velikosti sloužil DNA marker 2-Log Ladder (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA), který umožňuje určit délku řetězce 100 bp až do 10 kbp.

4.2.2.3 RFLP – ŠTĚPENÍ

Produkty PCR byly naštěpeny příslušnou restrikční endonukleázou. Jednotlivé endonukleázy byly voleny tak, aby rozeznávaly sekvenci v místě polymorfizmu, a to v přítomnosti jen jedné z variant polymorfizmu. Složení štěpné směsi a podrobnosti štěpení jednotlivých lokusů jsou shrnuty v následujícím odstavci a tabulkách 4.4 a 4.5.

Složení štěpné směsi – celkové množství = 20μl:

enzym (restrikční endonukleáza) y μl
pufr 2,0μl
100xBSA 0,2μl (jen u některých enzymů)
produkt PCR 2,0μl
H₂O 15,1μl – 15,9μl (dle množství
enzymu a (ne)přítomnosti BSA)

Enzym (restr. endonukleáza)	Koncentrace enzymu [U/ μ l]	Pufr	Nutnost BSA	Rozeznávaná sekvence 5'→3' 3'←5'	Výrobce
<i>Aci</i> I	10	NEB3	ne	C [↓] CGC GGC [↑] G	NEB
<i>Afa</i> I	10	10xT	ano	GT [↓] AC CA [↑] TG	TB
<i>Bsa</i> HI	10	NEB4	ano	GR [↓] CGYC CYGC [↑] RG	NEB
<i>Bsr</i> DI	2	NEB2	ano	GCAATGNN [↓] CGTTAC [↑] NN	NEB
<i>Bsr</i> I	5	NEB3	ne	ACTGGN [↓] TGAC [↑] CN	NEB
<i>Dde</i> I	10	NEB3	ne	C [↓] TNAG GANT [↑] C	NEB
<i>Fok</i> I	4	NEB4	ne	GGATG(N) ₉ [↓] CCTAC(N) ₁₃ [↑]	NEB
<i>Hha</i> I	20	NEB3	ano	GCG [↓] C C [↑] GCG	NEB
<i>Hinc</i> II	10	NEB3	ano	GTY [↓] RAC CAR [↑] YTG	NEB
<i>Hpy</i> AV	2	NEB4	ano	CCTTC(N) ₆ [↓] GGAAG(N) ₅ [↑]	NEB
<i>Hpy</i> CH4III	10	NEB4	ne	ACN [↓] GT TG [↑] NCA	NEB
<i>Mbo</i> II	5	NEB2	ne	GAAGA(N) ₈ [↓] CTTCT(N) ₇ [↑]	NEB
<i>Msp</i> I	20	NEB2	ne	C [↓] CGG GGC [↑] C	NEB
<i>Taq</i> ^o I	20	NEB3	ano	T [↓] CGA AGC [↑] T	NEB

Tab.4.4: Restrikční endonukleázy použité při RFLP analýze studovaných polymorfizmů; U = jednotky (units); NEB = New England Biolabs Inc., Ipswich, USA; TB = Takara Bio INC., Japan.

Zkratka lokusu	SNP a jeho poloha v produktu PCR	Restrikční endonukleáza / množství na vzorek	Délka štěpení [hod] / Teplota štěpení [°C]	Vznikající fragmenty (5'→3') – velikost v párech bazí (bp)
IL7R	A/G 168	<i>Ac</i> I / 2U	16 / 37	458/166+292; 115
IL10	T/C 532	<i>Fok</i> I / 1U	16 / 37	80; 1115/438+677
IL12p35	A/G 242	<i>Taq</i> ^o I / 4U	16 / 65	817/242+575
IL12p40	A/G 1453	<i>Ac</i> iI / 2U	18 / 37	1582/1453+129
IL12Rβ2	C/G 1077	<i>Bsr</i> DI / 2U	16 / 65	1213/1077+136
IL23p19a	C/A 301	<i>Mbo</i> II / 2U	16 / 37	420/309+111; 7; 58; 167
IL17A	T/C 296	<i>Dde</i> I / 5U	16 / 37	42; 82; 58; 229/114+115
IL17RAa	A/G 1576	<i>Hpy</i> AV / 1U	16 / 37	793; 591; 258/165+93; 90
TLR2	T/C 1786	<i>Bsa</i> HI / 10U	16 / 37	1071; 1051/729+322
TLR3a	A/C 373	<i>Hpy</i> CH4III / 1U	4 / 37	104; 97; 886/173+713; 126
iNOS	C/T 187	<i>Msp</i> I / 18U	19 / 37	1100/187+913; 700
IfnGa	G/C 2048	<i>Afa</i> I / 4U	19 / 37	249; 305; 1837/1492+345
IfnGb	G/C 36	<i>Afa</i> I / 4U	19 / 37	249/34+215; 305; 1837
Nramp1a	A/G 148	<i>Msp</i> I / 5U	16 / 37	239/145+94
Nramp1b	T/C 80	<i>Taq</i> ^o I / 5U	16 / 65	239/80+159
VISA	T/C 526	<i>Taq</i> ^o I / 10U	16 / 65	1457/526+931
NFκB1b	A/G 824	<i>Hinc</i> II / 3U	18 / 37	1260/821+439; 94
NFκB2	G/T 675	<i>Bsr</i> I / 2U	16 / 65	712/671+41
OAS1e2	T/C 83	<i>Taq</i> ^o I / 10U	16 / 65	164/82+50
OAS1e4	C/G 141	<i>Afa</i> I / 3U	16 / 37	231/140+91
MXA	C/G 152	<i>Hha</i> I / 2U	2 / 37	182/152+30

Tab.4.5: Informace o RFLP štěpení jednotlivých polymorfizmů; U = jednotky (units)

4.2.2.4 PAAG – ELEKTROFORÉZA A BARVENÍ GELU

Po štěpení byly fragmenty rozděleny elektroforézou v 6% polyakrylamidovém gelu a vizualizovány barvením stříbrem. Elektroforéza probíhala 1hodinu 30 minut při napětí 300V, v 1 x TBE pufru. Na gel byl nanášen vždy celý obsah zkumavky po štěpení navýšený o 2μl nanášecího pufru. Jako ukazatel velikosti byl opět použit 2-Log Ladder.

6% polyakrylamidový gel:

5 x TBE (složení viz 1 x TBE, jen 5x koncentrovanější)	6,9 ml
H ₂ O	51,8 ml
40% acryl/bis (37,5:1; Serva)	10,4 ml
Amonium persulfát 1% (Amresco, Boise, USA)	644 µl
Temed (Amresco, Boise, USA)	55,2 µl

Barvení gelu stříbrem:

1. Stop/Fixace - 300ml roztoku (100 ml etanolu + 5 ml kyseliny octové doplněno do 1000 ml) 10 minut
2. Roztok stříbra- 300 ml 0,2% AgNO₃ (2 g AgNO₃ do 1000 ml H₂O) 15 minut
3. promýt v dest. H₂O, opakovat 3x 1,5 minuty
4. Vývojka – 300ml roztoku (30g NaOH + 1000ml H₂O) + 4ml Formaldehydu těsně před použitím 5-10 minut
5. Stop/Fixace (jako v kroku 1) 10 minut
6. dest. H₂O 10 minut

4.2.2.5 NOVĚ ZAVEDENÉ METODIKY: SNP MARKERY GENŮ TLR3 A IL23p19

Gen TLR3 byl vybrán jako kandidátní gen vzhledem ke své úloze v přirozené imunitě. Jeho sekvence byla vyhledána v genové bance, byl vybrán exon s již popsáním polymorfismem u koní (<http://www.broadinstitute.org/mammals/horse>). Primery byly navrženy pomocí programu Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) tak, aby pokrývaly oblast s popsáním polymorfismem a aby amplifikovaný úsek bylo možné najednou celý sekvenovat.

Pro gen IL23p19 již byly k dispozici primery, umožňující identifikaci dvou polymorfizmů. U velkého množství mnou analyzovaných vzorků však byla amplifikace pomocí PCR neúspěšná, pravděpodobně kvůli přítomnosti dalšího, dosud nepopsaného

polymorfizmu v oblasti některého z primerů. Proto byly navrženy primery jiné - uvnitř úseku ohraničeného původními primery, ale stále pokrývající polymorfni oblast. I zde byl použit program Primer3.

Primery pro lokus TLR3 získané programem Primer3:

primer	délka	t_m	GC%	any	3'	sekvence
LEVÝ	21	60.03	57.14	4.00	0.00	GAGCTGTGCAGTAGAGGGATG
PRAVÝ	20	60.24	55.00	4.00	0.00	GGACGTGGAGGTGAGAAAGA
délka produktu: 1212 bp,		pair any compl.: 2.00,		pair 3' compl: 0.00		

4.2.2.6 PCR, AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA A POOL DNA

Vybraný úsek genu TLR3 i IL23p19 byl u 7 náhodně zvolených vzorků amplifikován pomocí PCR standardním způsobem popsaným v podkapitole 4.2.2.5 PCR za použití navržených primerů. Teplota anealingu byla zvolena dle charakteristik obou primerů. PCR produkt byl detekován elektroforézou v 1% agarózovém gelu způsobem popsaným v podkapitole 4.2.2.2

V případě genu TLR3 byly poté produkty PCR z jednotlivých mikrozkušavek smíchány ekvimolárně dohromady v tzv. pool DNA o celkovém množství 50 μ l a následně sekvenovány.

4.2.2.7 PŘEČIŠTĚNÍ PCR PRODUKTU, URČENÍ KONCENTRACE A SEKVENACE

Pool DNA genu TLR3 byla sekvenována s cílem ověřit identitu amplifikovaného fragmentu a vyhledat polymorfizmy. Nejprve byla přečištěna pomocí kitu QIA-quick (Qiagen Inc., Valencia, USA), poté byla pomocí spektrofotometru změřena koncentrace DNA a požadované množství (20ng DNA PCR produktu na 100 bp jeho délky, t.j. 242,4ng v případě genu TLR3) bylo vysušeno a posláno na sekvenaci. Automatická sekvenace byla provedena zakázkově na automatickém sekvenátoru firmou MWG Biotech AG (Martinried, Germany).

Přečištění DNA pomocí kitu QIA-quick

QIA-quick systém kombinuje výhody kolonkové technologie se schopností silikagelové membrány selektivně vázat molekuly DNA. Kromě nečistot jako jsou soli, enzymy, detergenty a oleje, jsou odstraněny i nezačleněné nukleotidy, primery a všechny ostatní fragmenty DNA do velikosti 40 nukleotidů.

Postup:

1. K 50 µl pool DNA přidat 250 µl PB pufru
2. Přenést na QIA kolonku ve zkumavce centrifugovat 30-60 s
3. Přidat 750 µl PE pufru, centrifugovat 30-60 s
4. Opakovat centrifugaci, tentokrát 90 s
5. Kolonku předat do nové ependorfky, přidat 30µl EB pufru, nechat 1 min stát
6. Centrifugovat 90 s – přečištěná DNA pak bude v ependorfce

Promývací pufr:

PB - guanidium-hydrochlorid a isopropanol - váže DNA na membránu kolonky

PE - promývací pufr s ethanolem, zajistí odmytí nečistot

EB - eluční pufr

4.2.2.8 ANALÝZA SEKVENCE A NÁVRH RESTRIKČNÍ ENDONUKLEÁZY

Sekvence získané sekvenováním genu TLR3 byly analyzovány v programu Bio Edit. V sekvenci byla vyhledána polymorfní místa. Pomocí programu NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) byly vyhledány restriční endonukleázy, které rozeznávají jednu z možných sekvencí polymorfního místa. Z těchto endonukleáz byla vybrána ta, která zároveň štěpí produkt PCR na úseky, které lze jednoznačně odlišit na polyakrylamidovém gelu. Stejným způsobem byla nalezena vhodná endonukleáza i pro gen IL23p19.

4.2.3 ASOCIACE MEZI MARKERY A INFEKČÍ

U následujících markerů byla v různých studiích nalezena asociace s nemocemi (tabulka 4.6).

Marker	Nemoc	Plemeno koní
IL10	WNV	Camargue
IL12p35	Ehrlichioza	Camargue
IL12p40	WNV Ehrlichioza Piroplazmóza	Camargue Camargue Camargue, Murgese
Nramp1a,b	Piroplazmóza	Camargue, Murgese
IfnGa,b	WNV Přecitlivělost na bodnutí hmyzem	Lusitano Starokladrubský kůň

Tab.4.6: Markery, u kterých byly nalezeny asociace s nemocemi. WNV = virus západonilské horečky.

4.3 VÝPOČET PARAMETRŮ POPULAČNÍ DIVERZITY, GENETICKÉ DISTANCE A TESTY NEUTRALITY

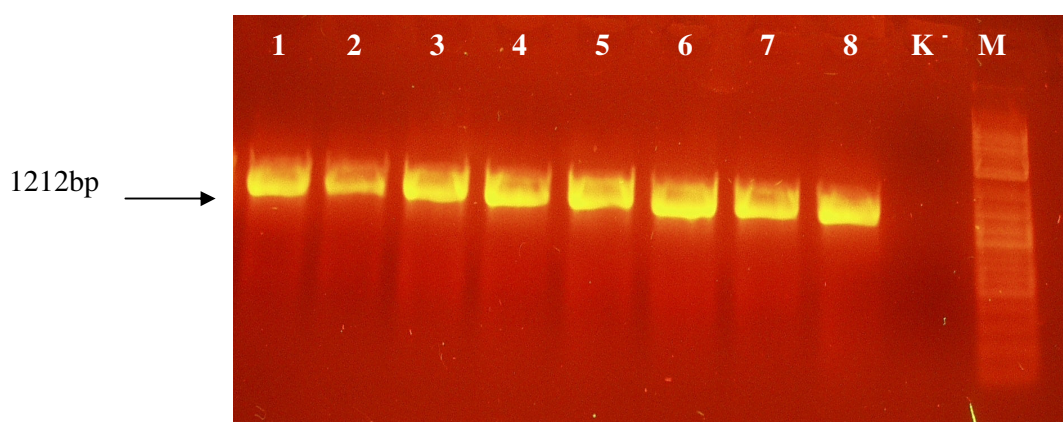
Výpočet parametrů genetické diverzity populací, genetických distancí a testy neutrality byly provedeny standardním postupem programem Arlequin3.1 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>).

5. VÝSLEDKY

5.1 IDENTIFIKACE A GENOTYPIZACE SNPs V GENU TLR3

5.1.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

S použitím navržených primerů byl amplifikován úsek DNA o délce 1212 párů bazí. Produkty této polymerázové řetězové reakce je možné vidět na obrázku 5.1.

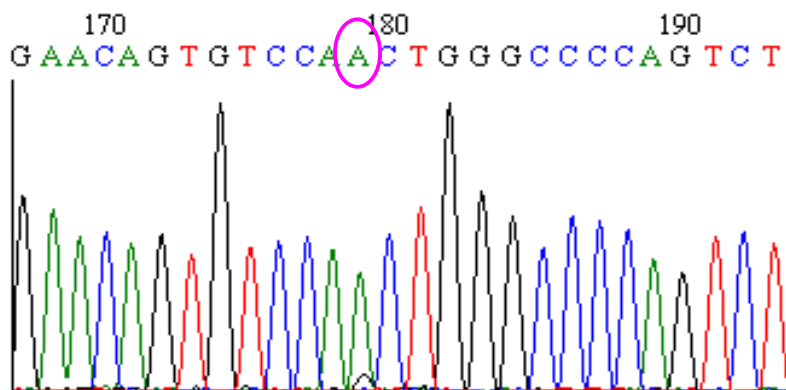


Obr.5.1: 1% agarózový gel s PCR produkty genu TLR3 o délce 1212 bp. M označuje hmotnostní marker, K⁻ je negativní kontrola.

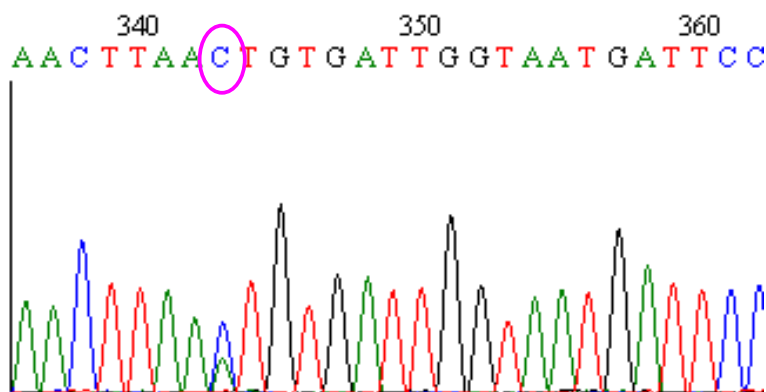
5.1.2 POČÍTAČOVÉ ZPRACOVÁNÍ SEKVENCÍ

Analýza sekvence potvrdila přítomnost polymorfizmu známého z databáze SNP a odhalila jeden nový, dosud nepopsaný polymorfismus vzdálený 164 bp od polymorfizmu známého. Na obrázku 5.2 a 5.3 jsou ukázány oba polymorfizmy v sekvenci pool DNA.

Oba polymorfizmy leží ve 4. exonu. První z nich je synonymní mutace A/G (CAA/CAG ~ Gln) v pozici 209 PCR produktu a 24189257 na chromozomu 27, druhý je nesynonymní mutace C/A (ACT/AAT ~ Thr/Asn) v pozici 373 PCR produktu a 24189093 na chromozomu 27. Část sekvence pool DNA dlouhá 600 bazí byla srovnána s referenční sekvencí v genové bance. Toto srovnání je v příloze 1, červeně byly vyznačeny oba polymorfizmy.



Obr. 5.2: Ukázka polymorfizmu v pozici 209 v PCR produktu nalezeného v sekvenci pool DNA genu TLR3. Polymorfnní místo je označené kolečkem. Na obrázku je polymorfizmus vyznačen v pozici 179. Rozdíl 30 bází je způsoben sekvenací, kdy prvních 30 bází nebylo zachyceno a záznam sekvence začíná až bází 31 v PCR produktu.

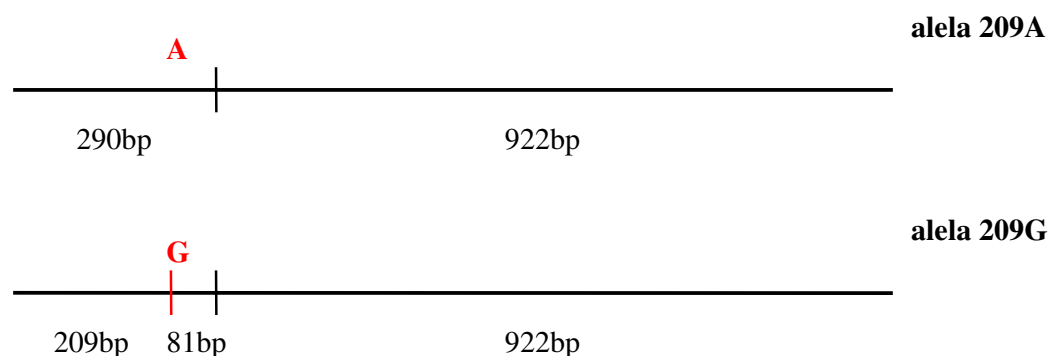


Obr. 5.3: Ukázka polymorfizmu v pozici 373 v PCR produktu nalezeného v sekvenci pool DNA genu TLR3. Polymorfnní místo je označené kolečkem. Na obrázku je polymorfizmus vyznačen v pozici 343. Rozdíl 30 bází je způsoben sekvenací, kdy prvních 30 bází nebylo zachyceno a záznam sekvence začíná až bází 31 v PCR produktu.

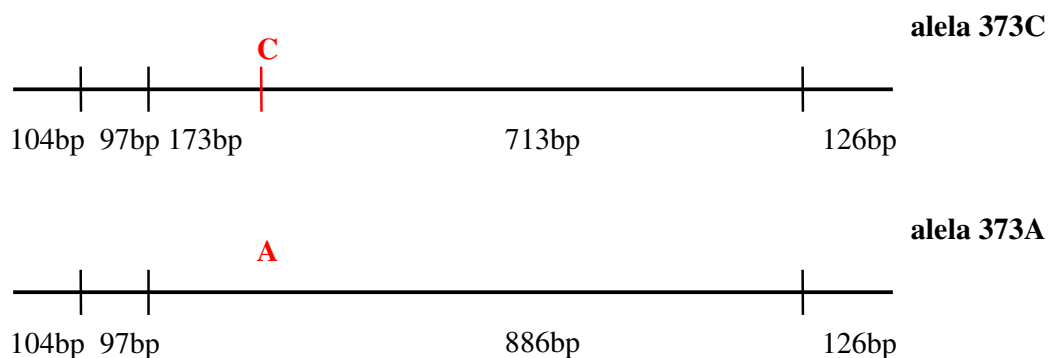
5.1.3 VÝBĚR VHODNÝCH RESTRIKČNÍCH ENDONUKLEÁZ A RFLP

Pro polymorfizmus 209A/G byla vybrána endonukleáza *PvuII*. Štěpením vznikají fragmenty o délce **290** a **922** párů bází pro alelu **209A** a **209**, **81** a **922** párů bází pro alelu **209G** (viz obrázek 5.4). Pro polymorfizmus 373C/A byla zvolena endonukleáza *HpyCH4III*. Vznikající fragmenty mají délku **104**, **97**, **173**, **713** a **126** párů bází pro alelu **373C** a **104**, **97**, **886** a **126** párů bází pro alelu **373A** (viz obrázek 5.5).

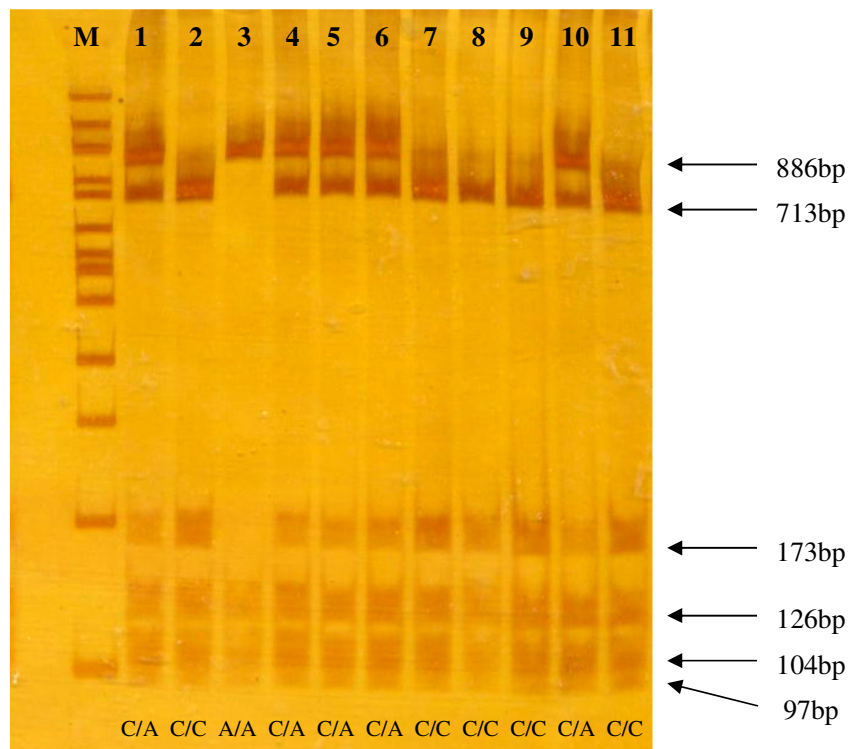
Polymorfismus 373C/A byl genotypizován u koní plemene Camargue, Murgese a Islandský pony metodou RFLP. Vzorový polyakrylamidový gel s genotypy některých koní je na obrázku 5.6. Polymorfismus 209A/G nebyl zatím u žádných koní hromadně vyšetřován.



Obr.5.4: Znázornění štěpných míst při štěpení PCR produktu genu TLR3 enzymem *PvuII*. Červeně je znázorněno polymorfní místo 209A/G. U jednotlivých fragmentů je uvedena jejich délka.



Obr.5.5: Znázornění štěpných míst při štěpení PCR produktu genu TLR3 enzymem *HpyCH4III*. Červeně je znázorněno polymorfní místo 373C/A. U jednotlivých fragmentů je uvedena jejich délka.



Obr.5.6: RFLP polymorfizmu 373C/A genu TLR3 na 6 % polyakrylamidovém gelu; štěpení enzymem *HpyCH4III*, elektroforéza 300V/90 min. M je zkratka pro hmotnostní marker. V dolní části obrázku je označení genotypů jednotlivých vzorků – C/A je heterozygot, C/C a A/A jsou homozygoti.

5.2 GENOTYPIZACE MIKROSATELITŮ

Výsledky získané sekvenací mikrosatelitů jsou v tabulkách 5.1-3 následujících podkapitol a v přílohách 2, 4 a 6.

5.2.1 ANALÝZA POPULACE KONÍ CAMARGUE - MIKROSATELITY

Testováno bylo 30 lokusů u 50 jedinců. Z 30 lokusů byly všechny použitelné pro analýzu a všechny byly polymorfní. V těchto 30 lokusech bylo nalezeno celkem 229 alel. Průměrný počet alel na lokus byl 7,633 (s.d. = 2,089), přičemž se počty alel na lokus pohybovaly v rozmezí 3 (u lokusu HMS5) a 12 (u lokusu ASB17). Nejmenší rozpětí alel bylo 6 opakování (u lokusu HMS5), největší 36 (u lokusu TKY394) a průměr činil 16,667

(s.d. = 6,074). Frekvence nejčastější a nejméně časté alely jednotlivých lokusů jsou shrnuty v tabulce 5.1. Kompletní informace o frekvencích všech alel všech lokusů jsou v příloze 2.

Lokus	Nejčetnější alela		Nejméně četná alela		Průměrná f na jednu alelu
	alela	f	alela	f	
AHT4	148	0,370	154; 160	0,010	0,111
AHT5	137	0,180	143	0,040	0,125
HMS1	182	0,490	190	0,010	0,143
HMS2	224	0,340	230	0,010	0,125
HMS3	163	0,326	159	0,045	0,143
HMS6	167	0,520	157; 163	0,030	0,167
HMS7	178	0,270	170	0,050	0,167
HTG4	130	0,520	134	0,020	0,143
HTG6	95	0,530	83; 91	0,050	0,200
HTG7	125	0,570	121	0,040	0,250
HTG10	98	0,356	100	0,011	0,111
VHL20	96	0,210	90; 102	0,010	0,111
ASB2	238	0,310	240; 252	0,010	0,091
ASB17	119	0,230	97; 109; 113	0,030	0,083
ASB23	210	0,412	182; 204	0,011	0,125
CA425	239	0,330	229	0,040	0,167
LEX3	154	0,370	162	0,020	0,111
TKY333	105	0,320	97; 101	0,010	0,125
HMS5	100	0,540	106	0,100	0,333
HTG3	116	0,430	126	0,010	0,143
EB2E8	127	0,420	131	0,011	0,167
UM32	151	0,330	147	0,060	0,167
TKY301	153	0,290	149	0,020	0,143
UM11	163	0,390	159; 165	0,010	0,100
TKY337	174	0,340	166; 176	0,040	0,167
TKY321	195	0,290	193; 197	0,010	0,091
TKY374	211	0,510	215	0,020	0,125
TKY294	222	0,350	214; 216	0,020	0,167
TKY297	230	0,360	240	0,010	0,111
TKY394	242	0,330	241; 253; 255, 263	0,010	0,091

Tab.5.1: Frekvence nejčetnějších a nejméně četných alel studovaných mikrosatelitů populace Camargue. f = frekvence alely.

Pozorovaná heterozygotnost (H_o) se pohybovala od 0,52000 (u lokusu HMS5) do 0,94872 (u lokusu HMS3) s průměrem 0,70688 (s.d. = 0,16882). Očekávaná heterozygotnost (H_e) byla nejmenší opět u lokusu HMS5 s hodnotou 0,57455, největší u lokusu ASB17 s hodnotou 0,87394 a průměr byl 0,76050 (s.d. = 0,07528). Čtyři ze studovaných lokusů byly mimo Hardy – Weinbergovu rovnováhu. Byly to LEX3 ($p = 0,00000$, s.d. = 0,00000),

EB2E8 ($p = 0,00000$, s.d. = 0,00000), UM32 ($p = 0,00017$, s.d. = 0,00001) a TKY321 ($p = 0,04523$, s.d. = 0,00022). Garza – Williamsonův index měl průměrnou hodnotu 0,44631 (s.d. = 0,07570) s hodnotami od 0,27586 (u lokusu ASB23) do 0,54545 (u lokusů HMS6, HMS7 a UM32). Locus HMS5 je ze všech 30 lokusů nejméně polymorfní. Kompletní hodnoty jednotlivých mikrosatelitů jsou v příloze 3.

5.2.2 ANALÝZA POPULACE KONÍ MURGESE - MIKROSATELITY

Testováno bylo 30 lokusů u 50 jedinců. Z 30 lokusů byly všechny použitelné pro analýzu a všechny byly polymorfní. V těchto 30 lokusech bylo nalezeno celkem 191 alel. Průměrný počet alel na lokus byl 6,367 (s.d. = 1,683), přičemž se počty alel na lokus pohybovaly v rozmezí 3 (u lokusu HMS5) a 11 (u lokusu ASB17). Nejmenší rozpětí alel bylo 6 opakování (u lokusu HMS5), největší 30 (u lokusu ASB2) a průměr činil 15,933 (s.d. = 5,899). Frekvence nejčastější a nejméně časté alely jednotlivých lokusů jsou shrnuty v tabulce 5.2. Kompletní informace o frekvencích všech alel všech lokusů jsou v příloze 4.

Pozorovaná heterozygotnost (H_o) se pohybovala od 0,55102 (u lokusu CA425) do 1,00000 (u lokusu ASB23) s průměrem 0,71496 (s.d. = 0,14465). Očekávaná heterozygotnost (H_e) byla nejmenší opět u lokusu CA425 s hodnotou 0,56957, největší u lokusu TKY337 s hodnotou 0,82620 a průměr byl 0,73753 (s.d. = 0,06502). Čtyři ze studovaných lokusů byly mimo Hardy – Weinbergovu rovnováhu. Byly to EB2E8 ($p = 0,00000$, s.d. = 0,00000), LEX3 ($p = 0,00334$, s.d. = 0,00005), ASB23 ($p = 0,01724$, s.d. = 0,00013) a TKY337 ($p = 0,04132$, s.d. = 0,00019). Dva další lokusy, TKY301 ($p = 0,05285$, s.d. = 0,00019) a TKY374 ($p = 0,05641$, s.d. = 0,00023), kritickou hodnotu Hardy – Weinbergovy rovnováhy překročili jen nepatrně. Garza – Williamsonův index měl průměrnou hodnotu 0,39755 (s.d. = 0,09095) s hodnotami od 0,22581 (u lokusu ASB2) do 0,54545 (u lokusů AHT5, HMS7 a HTG4). Kompletní hodnoty jednotlivých mikrosatelitů jsou v příloze 5.

Lokus	Nejčetnější alela		Nejméně četná alela		Průměrná f na jednu alelu
	alela	f	alela	f	
AHT4	144	0,420	150	0,020	0,167
AHT5	135	0,340	133	0,031	0,167
HMS1	176	0,410	180	0,010	0,200
HMS2	222	0,300	230	0,020	0,167
HMS3	163	0,267	161	0,035	0,143
HMS6	161	0,460	163	0,010	0,167
HMS7	172	0,420	176	0,030	0,167
HTG4	130	0,490	132	0,050	0,167
HTG6	95	0,440	79	0,030	0,250
HTG7	125	0,387	121	0,065	0,250
HTG10	98	0,260	88; 106	0,010	0,111
VHL20	86	0,420	92; 102; 104	0,010	0,111
ASB2	242	0,360	220	0,020	0,143
ASB17	109	0,340	97	0,010	0,091
ASB23	192	0,356	186	0,056	0,167
CA425	239	0,626	225	0,010	0,167
LEX3	140	0,310	158	0,030	0,143
TKY333	105	0,450	97; 99	0,010	0,125
HMS5	102	0,440	100	0,240	0,333
HTG3	120	0,432	122	0,034	0,200
EB2E8	127	0,560	125	0,048	0,200
UM32	151	0,517	145	0,054	0,250
TKY301	151	0,333	147	0,040	0,167
UM11	163	0,281	159	0,010	0,125
TKY337	180	0,232	184	0,011	0,143
TKY321	195	0,330	185	0,010	0,125
TKY374	205	0,363	215	0,011	0,167
TKY294	226	0,350	216	0,110	0,200
TKY297	236	0,360	242	0,030	0,143
TKY394	243	0,427	247	0,021	0,125

Tab.5.2: Frekvence nejčetnějších a nejméně četných alel studovaných mikrosatelitů populace Murgese. f = frekvence alely.

5.2.3 ANALÝZA POPULACE ISLANDSKÝ PONY - MIKROSATELITY

Testováno bylo 30 lokusů u 80 jedinců. Z 30 lokusů byly všechny použitelné pro analýzu a všechny byly polymorfní. V těchto 30 lokusech bylo nalezeno celkem 208 alel. Průměrný počet alel na lokus byl 6,933 (s.d. = 2,032), přičemž se počty alel na lokus pohybovaly v rozmezí 3 (u lokusu HMS5) a 12 (u lokusu ASB17). Nejmenší rozpětí alel bylo 4 opakování (u lokusu EB2E8), největší 32 (u lokusu ASB2) a průměr činil 16,633

(s.d. = 6,921). Frekvence nejčastější a nejméně časté alely jednotlivých lokusů jsou shrnuty v tabulce 5.3. Kompletní informace o frekvencích všech alel všech lokusů jsou v příloze 6.

Lokus	Nejčetnější alela		Nejméně četná alela		Průměrná f na jednu alelu
	alela	f	alela	f	
AHT4	141	0,376	154	0,007	0,125
AHT5	129	0,361	135	0,019	0,167
HMS1	182	0,451	180	0,007	0,200
HMS2	218	0,507	226	0,007	0,143
HMS3	157	0,320	165	0,049	0,167
HMS6	167	0,480	161	0,041	0,167
HMS7	174	0,561	170; 178	0,007	0,143
HTG4	130	0,458	126	0,013	0,167
HTG6	95	0,750	83	0,013	0,200
HTG7	117	0,738	123	0,054	0,250
HTG10	104	0,310	92	0,014	0,111
VHL20	94	0,276	98	0,013	0,125
ASB2	244	0,179	242	0,021	0,100
ASB17	111	0,366	99; 115; 121	0,007	0,083
ASB23	210	0,255	192	0,044	0,167
CA425	237	0,366	243	0,014	0,143
LEX3	152	0,283	140; 160	0,035	0,111
TKY333	91	0,312	103; 111	0,013	0,100
HMS5	102	0,400	104	0,275	0,333
HTG3	117	0,600	119	0,050	0,167
EB2E8	128	0,910	126	0,019	0,333
UM32	153	0,363	151	0,006	0,143
TKY301	165	0,493	145; 161	0,007	0,143
UM11	167	0,213	175	0,006	0,100
TKY337	178	0,30	182	0,044	0,143
TKY321	204	0,594	206	0,019	0,143
TKY374	212	0,381	204; 208	0,013	0,125
TKY294	228	0,456	222	0,013	0,200
TKY297	237	0,325	229	0,025	0,125
TKY394	243	0,463	227; 245; 249	0,025	0,143

Tab.5.3: Frekvence nejčetnějších a nejméně četných alel studovaných mikrosatelitů populace Islandský pony. f = frekvence alely.

Pozorovaná heterozygotnost (H_o) se pohybovala od 0,17949 (u lokusu EB2E8) do 0,89062 (u lokusu ASB23) s průměrem 0,68301 (s.d. = 0,16956). Očekávaná heterozygotnost (H_e) byla nejmenší opět u lokusu EB2E8 s hodnotou 0,16716, největší u lokusu ASB2 s hodnotou 0,88746 a průměr byl 0,69888 (s.d. = 0,06502). Čtyři ze studovaných lokusů byly mimo Hardy – Weinbergovu rovnováhu. Byly to LEX3

($p = 0,00000$, s.d. = 0,00000), HTG7 ($p = 0,02810$, s.d. = 0,00015), ASB23 ($p = 0,03518$, s.d. = 0,00018) a TKY297 ($p = 0,04294$, s.d. = 0,00020). Garza – Williamsonův index měl průměrnou hodnotu 0,42352 (s.d. = 0,10757) s hodnotami od 0,24000 (u lokusu ASB23) do 0,60000 (u lokusu EB2E8). Kompletní hodnoty jednotlivých mikrosatelitů jsou v příloze 7.

5.2.4 SROVNÁNÍ STUDOVANÝCH POPULACÍ - MIKROSATELITY

Populace byly srovnány na základě hodnot mikrosatelitů, které byly použity i pro analýzu jednotlivých populací. Výsledky srovnání jsou shrnuté v tabulce 5.4

Plemeno	Ho (s.d.)	He (s.d.)	Prům. genet. diverzita na lokus	Prům. počet alel, (s.d.)	Prům. rozpětí alel, (s.d.)	G-W index, (s.d.)	Počet BSA
Cam.	0.70688 (0.16882)	0.76054 (0.07528)	0.757808 +/-0.373868	7.633 (2.089)	16.667 (6.074)	0.44631 (0.07570)	26
Murg.	0.71496 (0.14465)	0.73753 (0.06502)	0.730953 +/-0.363282	6.367 (1.683)	15.933 (5.899)	0.39755 (0.09095)	8
IP	0.68301 (0.16956)	0.69888 (0.14664)	0.664812 +/-0.335653	6.933 (2.032)	16.633 (6.921)	0.42352 (0.10757)	58

Tab.5.4: Srovnání studovaných populací na základě analýzy mikrosatelitů. Cam.= Camargue, Murg. = Murgese, IP = Islandský pony, Ho = pozorovaná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, G-W index = Garza-Williamsonův index, BSA = alela nacházející se jen u jedné ze studovaných populací, s.d. = směrodatná odchylka

Alely přítomné jen u jedné ze studovaných populací lze najít u všech populací. Většinou jsou málo frekventované. Pouze u plemene Islandský pony lze nalézt tyto alely s vysokou frekvencí ($f \geq 0,2$). Shrnuty jsou v tabulce 5.5.

Lokus	Alela	f	Lokus	Alela	f	Lokus	Alela	f
HMS2	220	0,214	TKY321	196	0,231	TKY294	228	0,456
TKY333	91	0,312		204	0,594	TKY297	231	0,300
HMS5	104	0,275	TKY374	206	0,275		237	0,325
	108	0,325		212	0,381	HTG3	117	0,600
EB2E8	128	0,910						

Tab.5.5: Alely mikrosatelitů nalezené pouze u plemene Islandský pony, s frekvencí $\geq 0,2$.

Z tabulek 5.4 a 5.5 je patrné, že všechny populace jsou značně geneticky variabilní, přičemž populace Islandského ponyho o něco méně než zbylé dvě populace. Rozdíly mezi populacemi lze pozorovat i v počtu alel a Garza-Williamsonově indexu, kde nejvyšších hodnot dosahuje plemeno Camargue a nejnižších plemeno Murgese. Rozpětí alel mají všechny tři populace přibližně podobné. Největší rozdíly lze pozorovat v unikátních alelách. U plemene Islandský pony bylo nalezeno vysoké množství alel, které nejsou přítomny u zbylých dvou populací, a navíc 13 z nich s frekvencí vyšší než 20%. U 20% mikrosatelitů (v tabulce 5.5 tučně) představují unikátní alely 60 a více procent všech alel daného lokusu. To ukazuje na genetickou odlišnost plemene od zbylých dvou populací.

V tabulce 5.6 jsou uvedeny genetické vzdálenosti populací. Z tabulky vyplývá, že populace Camargue a Murgese jsou si navzájem velmi blízké a populace Islandský pony je od nich vzdálená. Podrobnosti analýzy genetických distancí jsou v příloze 8.

Populace	Cam.	Murg.	IP
Cam.	0.00000		
Murg.	0.05030	0.00000	
IP	0.14865	0.16682	0.00000

Tab.5.6: Genetické distance vyjádřené koeficienty F_{TS} pro dvojice studovaných populací, na podkladě analýzy mikrosatelitů. Cam. = Camargue, Murg. = Murgese, IP = Islandský pony

5.3 GENOTYPIZACE SNPs

Výsledky získané genotypizací SNPs jsou shrnuté v tabulkách 5.7-9 v následujících podkapitolách.

5.3.1 ANALÝZA POPULACE KONÍ CAMARGUE - SNPs

Testováno bylo 21 lokusů u 50 jedinců. Všech 21 lokusů bylo použitelných pro analýzu. Jeden lokus (iNOS) byl monomorfní. Zbylých 20 lokusů bylo polymorfních a každý obsahoval dvě alely. Frekvence minoritních alel jsou uvedeny v tabulce 5.7.

Pozorovaná heterozygotnost (H_o) se pohybovala od 0,08000 (u lokusu IL7R) do 0,57143 (u lokusu Nramp1b) s průměrem 0,31742 (s.d. = 0,18698). Očekávaná heterozygotnost (H_e) byla nejmenší opět u lokusu IL7R s hodnotou 0,07758, největší u lokusu MXA s hodnotou 0,50323 a průměr byl 0,31022 (s.d. = 0,16694). Mimo Hardy – Weinbergovu rovnováhu se nenacházel žádný z lokusů, nicméně p hodnota lokusu Nramp1b ($p = 0,05401$, s.d. = 0,00023) jen o málo překračovala stanovenou hranici 0,05. Kompletní statistika všech SNPs je v příloze 9.

Lokus	Alela	MAF	Lokus	Alela	MAF	Lokus	Alela	MAF
IL7R	1	0,040	IL17RAa	0	0,102	Nramp1b	0	0,327
IL10	0	0,210	TLR2	0	0,070	VISA	1	0,400
IL12p35	0	0,300	TLR3a	0	0,330	NFkB1b	0	0,070
IL12p40	1	0,449	iNOS	0	0,000	NFkB2	1	0,110
IL12Rβ2	0	0,050	IfnGa	0	0,395	OAS1e2	1	0,270
IL23p19a	0	0,200	IfnGb	1	0,094	OAS1e4	0	0,430
IL17A	1	0,081	Nramp1a	0	0,449	MXA	0	0,280

Tab.5.7: Frekvence minoritních alel jednotlivých SNP lokusů u plemene Camargue. Označení alel: 0 = neštěpící, 1 = štěpící (tzn. enzym u dané alely rozeznává o jedno štěpné místo víc než u alely neštěpící); MAF = frekvence minoritní alely

5.3.2 ANALÝZA POPULACE KONÍ MURGESE - SNPs

Testováno bylo 21 lokusů u 50 jedinců. Všechny 21 lokusů bylo použitelných pro analýzu. Jeden lokus (IL23p19a) byl monomorfní. Zbýlých 20 lokusů bylo polymorfních a každý obsahoval dvě alely. Frekvence minoritních alel jsou uvedeny v tabulce 5.8.

Pozorovaná heterozygotnost (H_o) se pohybovala od 0,02000 (u lokusu IL7R) do 0,54000 (u lokusu IL12p40) s průměrem 0,31331 (s.d. = 0,17630). Očekávaná heterozygotnost (H_e) byla nejmenší opět u lokusu IL7R s hodnotou 0,02000, největší u lokusu VISA s hodnotou 0,50424 a průměr byl 0,32582 (s.d. = 0,17115). Lokus IL17RAa se nacházel mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu ($p = 0,00625$, s.d. = 0,00008). Kompletní statistika všech SNPs je v příloze 10.

Lokus	Alela	MAF	Lokus	Alela	MAF	Lokus	Alela	MAF
IL7R	1	0,010	IL17RAa	0	0,360	Nramp1b	0	0,280
IL10	1	0,398	TLR2	0	0,250	VISA	1	0,480
IL12p35	0	0,430	TLR3a	0	0,210	NFkB1b	0	0,130
IL12p40	1	0,390	iNOS	0	0,100	NFkB2	1	0,020
IL12Rβ2	0	0,060	IfnGa	0	0,106	OAS1e2	1	0,270
IL23p19a	0	0,000	IfnGb	0	0,410	OAS1e4	0	0,400
IL17A	1	0,130	Nramp1a	1	0,380	MXA	0	0,320

Tab.5.8: Frekvence minoritních alel jednotlivých SNP lokusů u plemene Murgese. Označení alel: 0 = neštěpící, 1 = štěpící (tzn. enzym u dané alely rozeznává o jedno štěpné místo víc než u alely neštěpící); MAF = frekvence minoritní alely.

5.3.3 ANALÝZA POPULACE ISLANDSKÝ PONY - SNPs

Testováno bylo 21 lokusů u 91 jedinců. Všechny 21 lokusů bylo použitelných pro analýzu. Lokusy IL7R a IL12Rβ2 byly monomorfní. Zbýlých 19 lokusů bylo polymorfních a každý obsahoval dvě alely. Frekvence minoritních alel jsou uvedeny v tabulce 5.9.

Pozorovaná heterozygotnost (H_o) se pohybovala od 0,01099 (u lokusu NFkB1b) do 0,59341 (u lokusu Nramp1a) s průměrem 0,25216 (s.d. = 0,18052). Očekávaná heterozygotnost (H_e) byla nejmenší opět u lokusu NFkB1b s hodnotou 0,01099, největší u lokusu Nramp1b s hodnotou 0,49669 a průměr byl 0,26296 (s.d. = 0,18094). Lokus IL17RAa se nacházel mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu ($p = 0,00001$, s.d. = 0,00000) a u lokusu Nramp1a ($p = 0,05401$, s.d. = 0,00023) hodnota p jen o málo překračovala stanovenou hranici 0,05. Kompletní statistika všech SNPs je v příloze 11.

Lokus	Alela	MAF	Lokus	Alela	MAF	Lokus	Alela	MAF
IL7R	1	0,000	IL17RAa	0	0,322	Nramp1b	0	0,445
IL10	0	0,287	TLR2	0	0,077	VISA	0	0,233
IL12p35	0	0,056	TLR3a	0	0,250	NFkB1b	0	0,005
IL12p40	1	0,300	iNOS	0	0,017	NFkB2	1	0,049
IL12Rβ2	0	0,000	IfnGa	0	0,361	OAS1e2	1	0,412
IL23p19a	0	0,099	IfnGb	1	0,094	OAS1e4	1	0,203
IL17A	1	0,050	Nramp1a	1	0,429	MXA	0	0,280

Tab.5.9: Frekvence minoritních alel jednotlivých SNP lokusů u plemene Islandský pony. Označení alel: 0 = neštěpící, 1 = štěpící (tzn. enzym u dané alely rozeznává o jedno štěpné místo víc než u alely neštěpící); MAF = frekvence minoritní alely.

5.3.4 SROVNÁNÍ STUDOVANÝCH POPULACÍ - SNPs

Populace byly srovnány na základě hodnot SNPs, které byly použity i pro analýzu jednotlivých populací. Výsledky srovnání jsou shrnuté v tabulce 5.10

Plemeno	Ho (s.d.)	He (s.d.)	Prům. genet. diverzita na lokus	Počet polymorf. lokusů	Monomorf. lokus
Cam.	0.31742 (0.18698)	0.31022 (0.16694)	0.304319 +/-0.161028	20	iNOS
Murg.	0.31331 (0.17630)	0.32582 (0.17115)	0.323848 +/-0.170377	20	IL23p19a
IP	0.25216 (0.18052)	0.26296 (0.18094)	0.259709 +/-0.139009	19	IL7R, IL12Rβ2

Tab.5.10: Srovnání studovaných populací na základě analýzy SNPs. Cam.= Camargue, Murg. = Murgese, IP = Islandský pony, Ho = pozorovaná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, s.d. = směrodatná odchylka

Z tabulky 5.10 je patrná existující genetická variabilita u všech populací, přičemž populace Islandského ponyho je variabilní méně než zbylé dvě populace. V počtu polymorfních lokusů nejsou mezi populacemi rozdíly.

U lokusů IL12p35 a IL12p40 genu IL12 byla již dříve u koní popsána asociace s Piroplazmózou. V tabulce 5.11 jsou srovnány frekvence alel lokusů genu IL12 u jednotlivých populací. Z tabulky je patrné, že u lokusu IL12p35 je několikanásobně vyšší frekvence neštěpící alely u populací Camargue a Murgese než u populace Islandský pony. U lokusu IL12p40 je rozdíl v zastoupení alel mezi Islandskými poníky a plemeny Camargu/Murgese menší. U lokusů IL23p19 a IL12Rβ2 mezi plemeny rozdíly nejsou.

Lokus	Camargue		Murgese		Islandský pony	
	f (1)	f (0)	f (1)	f (0)	f (1)	f (0)
IL12p35	0,700	0,300	0,570	0,430	0,944	0,056
IL12p40	0,449	0,551	0,390	0,610	0,300	0,700
IL23p19	0,800	0,200	1,000	0,000	0,901	0,099
IL12Rβ2	0,950	0,050	0,940	0,060	1,000	0,000

Tab.5.11: Srovnání studovaných populací v lokusech genu IL12. f (1) = frekvence štěpící alely, f (0) = frekvence neštěpící alely

V tabulce 5.12 jsou uvedeny genetické vzdálenosti populací. Z tabulky plyne, že populace Camargue je poměrně blízká oběma dalším populacím, kdežto populace Murgese a Islandský pony jsou si navzájem vzdálenější. Podrobnosti analýzy genetických distancí jsou v příloze 12.

Populace	Cam.	Murg.	IP
Cam.	0.00000		
Murg.	0.08800	0.00000	
IP	0.07492	0.12562	0.00000

Tab.5.12: Genetické distance vyjádřené koeficienty F_{TS} pro dvojice studovaných populací, na podkladě analýzy SNPs. Cam. = Camargue, Murg. = Murgese, IP = Islandský pony

5.4 SROVNÁNÍ POPULACÍ V SNPs A MIKROSATELITECH

Srovnání výsledků mikrosatelitních markerů s výsledky SNP markerů ukazuje, že populace Islandský pony je nejméně variabilní v obou typech markerů. Rozdíl v mikrosatelitech je menší než rozdíl v SNP markerech. Populace Camargue a Murgese jsou v obou typech markerů variabilní.

Genetické distance spočítané z mikrosatelitů ukazují odlišnost Islandských koní od zbylých dvou plemen. Distance spočítané z SNP markerů udávají největší rozdíl mezi Islandskými poníky a koňmi Murgese, plemeno Camargue je s oběma populacemi poměrně blízké.

5.5 TESTY NEUTRALITY SNP LOKUSŮ U STUDOVANÝCH POPULACÍ

Výsledky testu neutrality jednotlivých SNP lokusů u všech tří populací jsou shrnuté v tabulce 5.13. Z tabulky vyplývá, že u žádného studovaného lokusu nedosahují kritickou hodnotu významnosti ($p = 0,05$). Nejnižší Tajimovu hodnotu D mají lokusy IL7R u plemene Camargue i plemene Murgese a NFκB1b u plemene Islandský pony. Nejvyšší Tajimovu hodnotu D mají lokusy MXA u plemene Camargue, VISA u plemene Murgese a Nramp1b u plemene Islandský pony. Nejvyšší a nejnižší Tajimovy hodnoty D pro každou populaci, stejně jako nejnižší hodnoty p jsou v tabulce zvýrazněny.

Lokus	Camargue		Murgese		Islandský pony	
	Tajima's D	p	Tajima's D	p	Tajima's D	p
IL7R	-0.68607	0.24700	-1.02786	0.12100	0.00000	1.00000
IL10	0.84297	0.85500	1.72302	0.95800	1.40935	0.92300
IL12p35	1.37184	0.91500	1.79278	0.97300	-0.40285	0.31200
IL12p40	1.81671	0.97100	1.70644	0.95400	1.47786	0.91900
IL12Rβ2	-0.57694	0.24500	-0.47021	0.27200	0.00000	1.00000
IL23p19a	0.77222	0.87000	0.00000	1.00000	0.03662	0.75200
IL17A	-0.25189	0.32200	0.20977	0.77100	-0.46218	0.29300
IL17RAa	-0.05202	0.38500	1.61649	0.93400	1.57808	0.91900
TLR2	-0.36587	0.27500	1.10201	0.88400	-0.17964	0.37000
TLR3a	1.50496	0.94900	0.84297	0.86700	1.20924	0.91400
iNOS	0.00000	1.00000	-0.06726	0.36200	-0.83360	0.19900
IfnGa	1.71403	0.94700	-0.01972	0.34200	1.72510	0.94200
IfnGb	-0.13646	0.36700	1.75441	0.96500	0.03662	0.75900
Nramp1a	1.81671	0.97800	1.67885	0.94600	1.89642	0.97000
Nramp1b	1.48693	0.93400	1.27111	0.90600	1.92129	0.97600
VISA	1.73162	0.95900	1.84675	0.98000	1.10643	0.89400
NFκB1b	-0.36587	0.31500	0.20977	0.77800	-0.96213	0.06700
NFκB2	0.02748	0.76000	0.00000	1.00000	-0.46618	0.24900
OAS1e2	1.21714	0.91000	1.21714	0.87200	1.86506	0.96400
OAS1e4	1.79278	0.96600	1.73162	0.95600	0.90633	0.87700
MXA	1.84075	0.98200	1.46299	0.93300	1.38065	0.92300

Tab.5.13: Tajimovy hodnoty D studovaných lokusů.

6. DISKUSE

6.1 METODICKÉ ASPEKTY PRÁCE

Plemena Camargue a Murgese jsou součástí širší studie interakce prvoků *Theileria/Babesia* s hostiteli z čeledi *Equidae* a představují dvě z více studovaných populací vystavených dlouhodobému působení stejného patogena. Rozdílné je v tomto případě prostředí, v němž obě plemena žijí a výskyt dalších patogenů u plemene Camargue. Camargští koně žijí v bažinaté deltě řeka Rhône na jihu Francie, kdežto koně Murgese v suché, hornaté krajině jižní Itálie. Třetí studované plemeno, Islandský pony, bylo vybráno jako vhodný kandidát pro srovnání s prvními dvěma jmenovanými. Toto plemeno se na Islandu vyvíjelo izolovaně po více než 1000 let v prostředí s minimálním výskytem patogenů.

Z hlediska genetické diverzity bylo možno definovat genetickou odlišnost mezi těmito nepřibuznými plemeny v mikrosatelitních lokusech, které se často využívají k odhadům genetické vzdálenosti. Cílem práce bylo zjistit, jestli SNPs v kandidátních genech souvisejících s obranou proti infekčním patogenům odrážejí pouze meziplenné genetické rozdíly, srovnatelné s mikrosatelity, nebo jestli se u nich projeví jiný trend související s rozdílností v expozici patogenům obecně nebo specificky prvokům způsobujícím piroplasmózu. V takovém případě by si populace Murgese a Camargue měly být podobnější v genech asociovaných s vnímavostí k této infekci (IL12p35, IL12p40) než v mikrosatelitech. Otázkou také bylo, zda bude zřetelný rozdíl v genetické diverzitě v SNPs IR genů mezi islandskými koňmi na jedné straně a plemeny Camargue a Murgese na straně druhé.

K populačním studiím se dnes používají tři druhy genetických markerů: mikrosatelity, mtDNA a jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs). Mitochondriální DNA markery se používají spíše k evolučním studiím (např. Luis et al., 2006). Mikrosatelity jsou používány k popisu diverzity a příbuzenských vztahů mezi plemeny a populacemi. Obecně jsou považovány za selekčně neutrální. Markery SNPs se dají také k popisu diverzity využít, zejména proto, že při využití komerčně dostupných chipů je možno genotypovat v jednom kroku 55.000 SNPs. Jde však o anonymní polymorfizmy, tj. s neznámou anotací a z hlediska popisu diverzity není jisté, zda se nenacházejí například v duplikovaných oblastech genomu.

V této práci byly proto použity potenciálně funkční SNPs v kandidátních genech imunitní odpovědi, z nichž u některých (geny interleukinu 12) byla prokázána asociace s nemocemi (Futas et al., dosud nepublikováno). Opakovaným sekvenováním homozygotních genotypů bylo prokázáno, že všechny testované SNPs jsou dialelické a zvolená metoda PCR-RFLP je plně informativní, tzn. že nepřítomnost štěpného místa znamená přítomnost pouze jednoho ze tří dalších možných nukleotidů. Použitý software Arlequin je nadto schopen zpracovávat data jak pro mikrosatelity, tak pro markery RFLP.

Pro studium diverzity jsou obecně doporučovány počty minimálně 30, nejlépe však 50 nepříbuzných jedinců. To bylo v této studii splněno, v případě populace Islandského ponyho dokonce výrazně překročeno. SNPs byly u Islandské populace genotypizovány u 91 jedinců, zatímco mikrosatelity jen u 80. Rozdíl je způsoben genotypizací mikrosatelitů na jiném pracovišti, kde 11 koní ze setu vyřadili.

6.2 GENETICKÁ DIVERZITA - MIKROSATELITY

Studovaná populace Camargských koní se zdá být průměrně variabilní ve všech sledovaných kriteriích. V porovnání s teprve nedávno publikovanými hodnotami Camargských koní ze studie Leroy et al. (2009) vychází tato populace v mé studii mírně variabilnější. Např. průměrné heterozygotnosti (H_o a H_e) v mé práci mají hodnoty 0,71 resp. 0,76 a ve zmíněné studii (Leroy et al., 2009) 0,68 resp. 0,73. Podobně i průměrný počet alel je 7,63 v mé studii oproti 6,36 u Leroy et al. (2009). Ve své práci jsem studovala populaci čítající o 13 jedinců více a také jsem použila o 19 víc mikrosatelitních markerů. Předpokládám, že toto je důvodem rozdílu hodnot. Počet lokusů mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu byl v mé studii čtyřnásobný (4 oproti 1 u Leroy et al. (2009)). To může být připsáno většímu počtu studovaných lokusů, ale i výskytu nulových alel, tedy alel, které se nepovedlo genotypovat.

Také hodnoty populačních parametrů plemene Murgese naznačují standardní úroveň genetické diverzity. Pieragostini et al. (2005) publikovali studii diverzity koní Murgese, při níž vycházeli z genealogických záznamů a 12 mikrosatelitních markerů. Neuvádějí však žádné běžně používané parametry (skutečná a očekávaná heterozygotnost, průměrný počet alel apod.), se kterými bych mohla své výsledky srovnat. Čtyři studované lokusy jsou u této populace mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu a dva další se kritické hranici velmi blíží.

Příčinou toho můžou být nulové alely, ale i potenciální příbuzenské vztahy některých studovaných jedinců, čemuž se u této malé populace nedalo vyhnout.

I u plemene Islandský pony naznačují hodnoty populačních parametrů standardní úroveň genetické diverzity. Toto plemeno, ač nebylo nikdy středem žádné populační studie, je často používáno jako referenční skupina ve studiích jiných populací. Výsledky genetické diverzity Islandských koní v mojí práci (heterozygotnosti $H_o = 0,683$, $H_e = 0,699$; průměrný počet alel 6,933) potvrzují výsledky dalších autorů. Glowatzki-Mullis et al. (2005) a Leroy et al. (2009), dospěli k téměř stejným hodnotám H_o a H_e , ale nižšímu počtu alel (5,9 resp. 6,27). Ve studiích Aberle et al. (2004) nebo Plante et al. (2007) vychází téměř stejně průměrný počet alel a o něco vyšší heterozygotnosti (H_o / H_e : 0,716 / 0,732 resp. 0,72 / 0,74). Rozdíly mohou být dány různými počty mikrosatelitních markerů (11 až 50) a koní (33 až 80) použitými v jednotlivých studiích. I u populace Islandských koní jsou čtyři lokusy mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu. Příčiny tohoto stavu nejsou ani zde známy.

Při srovnání genetické diverzity s jinými populacemi mají koně Camargue, Murgese i Islandští poníci podobné hodnoty jako Jihoněmecký chladnokrevník, Schleswický tažný kůň (Aberle et al., 2004), Selle Français nebo Merenský kůň (Leroy et al., 2009). Nižší genetickou diverzitu (H_o a H_e v rozmezí 0,47 – 0,61, průměrný počet alel od 3,43 do 5,64) vykazují zejména plemena s malým množstvím jedinců, u nichž je často praktikováno příbuzenské křížení. Příkladem mohou být plemena Marwari, Bhutia (Behl et al. 2007) či Sorraia, ale i Kůň Převalského (Aberle et al., 2004). Nejvyšší genetickou diverzitu (H_o a H_e až 0,79 a průměrný počet alel až 8,25) překvapivě nalézáme u některých plemen, jež byla obnovena z malého počtu jedinců. Jsou jimi třeba plemena Appaloosa, Pottok či Newfoundlandský kůň (Plante et al., 2007), u nichž cílené šlechtění a občasné křížení s jedinci jiného plemene vedlo ke znovuzískání dostatečné variability.

Srovnání tří populací, studovaných v této práci, ukazuje, že nejméně variabilní je plemeno Islandský pony. Rozdíly mezi jednotlivými plemeny však nejsou nijak významné. Nejnižší hodnoty by na podkladě znalosti historie plemen bylo možné očekávat u plemene Murgese, které bylo před 80 lety vzkříšeno z 46 klisen a 9 hřebců. Zbývá dvě plemena vždy disponovala dostatečným počtem jedinců a nepředpokládá se u nich žádný efekt hrdla láhve. Této hypotéze nejlépe odpovídají průměrné počty alel i Garza – Williamsonův index populací, které vycházejí nejnižší právě u plemene Murgese. Nicméně i zde je rozdíl mezi populacemi malý. Garza-Williamsonův index je hodnota citlivá k prudkému snížení počtu jedinců v populaci, při němž často dochází ke snížení počtu alel při současném zachování alelického rozmezí (Garza & Williamson, 2001). Je ale třeba podotknout, že program

Arlequin.31, použitý pro statistické analýzy v této studii, neprovádí žádný test významnosti Garza – Williamsonova indexu. Získané hodnoty jsou proto jen relativní a mají pouze informativní charakter.

U každé ze tří populací se vyskytovaly alely, které nebyly nalezeny u zbylých dvou. Většinou neměly velké frekvence výskytu a jejich význam tudíž není velký. U plemene Islandský pony se ale vyskytlo 13 takových alel s frekvencí vyšší než 20%. To zcela potvrzuje historické údaje o izolovaném vývoji plemene, kdy se díky izolaci populace postupně vyvinuly specifické alely.

Porovnáním genetických distancí zjišťujeme, že plemena Camargue a Murgesse jsou si velmi blízká, kdežto Islandský pony je vzdálenější. Hodnota je srovnatelná s distancemi, které byly zjištěny mezi některými subpopulacemi Lipicánů (Achmann et al., 2004). Hypotetickým vysvětlením může být fakt, že v době než byly založeny oficiální plemenné knihy obou plemen, bylo častým jevem zušlechťovat stávající stáda anglickými a arabskými plnokrevníky. Vysoká genetická podobnost tak může být způsobena přílivem stejných cizích genů. Hodnota udávající vzdálenost Islandských koní k oběma zbylým plemenům je také poměrně malá, i když trojnásobná než mezi jihoevropskými populacemi. Vypočtené genetické distance je však nutné brát spíše relativně (srovnání populací mezi sebou). Metody jejich výpočtu se v různých studiích mohou lišit a absolutní hodnoty tudíž nejsou vždy plně srovnatelné. Celkově se dá říct, že mezi třemi studovanými plemeny nejsou na podkladě mikrosatelitů velké rozdíly ve stupni genetické variability. Patrný je rozdíl v unikátních alelách a genetických distancích mezi populací Islandský pony a dvojicí Camargue/Murgesse, což je v souladu s našimi vědomostmi o původu těchto plemen.

6.3 GENETICKÁ DIVERZITA – SNPs

Na rozdíl od mikrosatelitů nemusí být markery SNP vždy selekčně neutrální. Existují různé typy jednonukleotidových polymorfizmů. Podle polohy je lze rozdělit na intronové, exonové nebo v nepřekládaných oblastech (3' a 5' UTR). Nesynonymní exonové substituce, tedy ty, které vedou k záměně aminokyseliny, mohou měnit funkci vznikajícího proteinu. V případě mutací synonymních, mutací v nepřekládaných oblastech mRNA a mutací intronových není případný následek tak zjevný. Synonymní exonové mutace byly dlouho považovány za neutrální, protože nevedou ke změně aminokyseliny a tím ani ke změně funkce výsledného produktu. Většina organismů ale u aminokyselin kódovaných více

triplety preferuje jeden triplet před ostatními. Synonymní substituce tak může vést k pomalejší tvorbě proteinu a ve výsledku třeba k nedostatečnému počtu funkčních molekul produktu. Dále může synonymní mutace v exonu ovlivnit stabilitu mRNA a tím i tvorbu kódovaného proteinu. Bylo prokázáno, že mutace C957T v genu pro lidský receptor dopaminu D2 (DRD2) mění sekundární strukturu mRNA DRD2 a tím snižuje její stabilitu (Duan et al., 2003). V neposlední řadě může synonymní exonová mutace ovlivnit splicing pre-mRNA. Jedná se o případ, kdy taková mutace leží na okraji exonu (blízko hranice exon/intron) v tzv. splicingovém kontrolním elementu. Tyto elementy mohou být buď enhancery nebo silencers, v obou případech jde o oblasti rozpoznávané proteiny spliceosomu. Mutace ve splicingovém kontrolním elementu může zavinit špatný sestřih pre-mRNA a tvorbu výrazně změněného proteinu. Jako příklad lze uvést mutaci C/G na začátku exonu 4 genu pro lidskou transmembránovou protein-tyrosin fosfatázu CD45, která způsobuje roztroušenou sklerózu (Thude et al., 1995; Jacobsen et al., 2000). Podobně mohou působit i SNPs v intronech, pokud se vyskytnou poblíž hranice exon/intron, nebo mutace uvnitř intronu, které dají vzniknout nově rozpoznávanému sestřihovému místu. 5' a 3' nepřekládané oblasti ovlivňují stabilitu mRNA, její translabilitu a lokalizaci produktu v buňce. Mutace UTR oblastí mohou ovlivnit jak tvorbu produktu, tak jeho dopravení na místo určení. Například u mutace, ležící downstream od terminačního kodónu lidského dopaminového receptoru D2, byla prokázána asociace s alkoholizmem a drogovou závislostí (Comings et al., 1994). Výše zmíněné příklady jsou ukázky, kdy jediná substituce přímo onemocnění způsobí. Většina mutací však má jen malý účinek na procesu vzniku nemoci, který bývá kombinován s účinky dalších genů. Konkrétní SNPs mohou přispívat menším nebo větším účinkem ke vzniku komplexní nemoci a jednotlivé SNPs mívají adaptační význam, ale jen malého rozsahu.

V této práci byly použity SNPs ležící v genech účastnících se imunitní odpovědi. Vybrány byly jak geny, jejichž produkty se účastní nespecifické (neadaptivní) imunity, tak geny imunity antigenně specifické (adaptivní). Některé z nich jsou spíše obecné součásti složitých regulačních drah účastnících se i imunity (př. transkripční faktor NFκB). Jiné se účastní poměrně specializovaných drah protivirové obrany (př. MXA nebo VISA) a další se ukazují jako součást obranných mechanismů proti bakteriálním a protozoálním infekcím (př. iNOS, TLR2 nebo Nramp1). Cílem výběru těchto genů bylo pokud možno pokrýt hlavní obranné mechanismy, které se u vyšších obratlovců vyskytují. Mezi testovanými markery byly i takové, které byly v naší laboratoři v různých studiích asociovány s infekcemi (Hořín

et al., 2004, Hořín et al., 2008, Futas et al., dosud nepublikováno, Stejskalová et al. rukopis v přípravě) – viz tabulka 4.6.

Jako příklad práce se SNP markerem v kandidátním genu, od jeho zvolení na základě funkce v organismu až po genotypizaci a počítačové vyhodnocení, byl zvolen gen TLR3 a později nalezený polymorfismus C24189093A (373 v PCR produktu). Toll-like receptor 3 (TLR3) rozeznává dvouřetězcovou RNA (dsRNA), která se vyskytuje v buňkách napadených RNA viry (Alexopoulou et al., 2001). Vazba ligandu na receptor zapíná signální dráhy vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů NFκB a MAP kináz, které dále přímo či nepřímo spouštějí expresi různých genů (Jiang et al., 2003). Role v protivirové obraně je pro naši laboratoř zajímavá, protože jedním z řešených úkolů je i studium asociace imunitních genů s výskytem viru západonilské horečky u koní z jižní Francie. Proto byl TLR3 vybrán jako další vhodný kandidátní gen. Už několik let je v genomové bance k dispozici kompletní koňský genom a seznam jednonukleotidových rozdílů (substitucí) oproti referenční sekvenci. V době, kdy se začínalo s genem pracovat, byla zveřejněna jedna substituce (A24189257G) v exonu 4 poblíž hranice s intronem 3. Všechny ostatní známé rozdíly se nacházely v intronech. Primery byly navrženy tak, aby pokrývaly začátek exonu 4 s popsaným polymorfismem. Exonový SNP byl zvolen z důvodu větší pravděpodobnosti vlivu na výsledný produkt genu. Následná sekvenace potvrdila přítomnost polymorfismu A24189257G (poloha 209 v PCR produktu) a odhalila další dosud nepopsaný polymorfismus C/A v poloze 373 v PCR produktu (C24189093A). Srovnáním naší sekvence se sekvencí mRNA genu TLR3 v genomové bance bylo zjištěno, že SNP A/G je záměna synonymní a SNP C/A nesynonymní. Pro další analýzu byl zvolen nesynonymní polymorfismus C/A, který byl následně genotypován u 191 koní tří populací.

Průměrná heterozygotnost populace Camargue s hodnotami přesahujícími 0,31 je na tento typ markerů poměrně vysoká. Hodnoty heterozygotnosti ze studií SNPs u ovcí (Pariset et al., 2006) a psů (Brouillette & Venta, 2002) jsou 0,28 nebo nižší. To svědčí o značné variabilitě markerů SNP u koní Camargue. Z dvaceti polymorfních lokusů je u šesti výrazná převaha jedné z alel ($f \geq 0,9$). Mezi nimi jsou IL12Rβ2, TLR2 a iNOS (monomorfní lokus), které se účastní obrany proti bakteriím a prvokům, dále IfnG, který je spojen s protivirovou obranou, ale i IL7R a NFκB1, jež se účastní spíše obecných pochodů. Testování Hardy-Weinbergovy rovnováhy nicméně neodhalilo žádný lokus mimo rovnováhu, pouze jeden z lokusů genu Nramp1 se kritické hranici blížil. Tento gen se účastní v boji proti intracelulárním patogenům a u některých jeho mutací byla u člověka prokázána vyšší náchylnost k různým onemocněním (Poon & Schurr, 2004). Tento údaj je v souladu

s nálezem marginální asociace mezi markery tohoto genu a infekcí piroplasmami (Futas et al., dosud nepublikováno).

Populace Murgese je také velmi variabilní s hodnotami heterozygotnosti překračujícími 0,31. Z dvaceti polymorfních lokusů, je u čtyř pozorovatelná výrazná převaha jedné z alel. Mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu je ale pouze lokus IL17RAa, který je exprimován v endotelech, epitelech a fibroblastech, které produkují prozánětlivé cytokiny. Jde také o gen účastnící se obrany proti prvokům a bakteriím.

Populace Islandských koní je variabilní méně než u předchozích dvou plemen, ve srovnání se studií u psů (Brouillette & Venta, 2002) je její variabilita srovnatelná. U této populace bylo polymorfních lokusů 19, z nichž u osmi byla pozorována výrazná převaha jedné z alel. Jednalo se o geny působící v imunitě všeobecně, geny protivirové obrany i geny obrany proti prvokům a bakteriím. Mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu se nacházel lokus IL17RAa a lokus Nramp1a kritickou hranici $p = 0,05$ jen o málo překračoval.

Srovnáním zastoupení alel mezi populacemi navzájem zjistíme několik rozdílů. V lokusech VISA a OAS1e4 jsou si podobnější jihoevropské populace, kdežto u Islandských koní je častější druhá alela. Tyto geny jsou důležité pro obranu proti RNA virům. Pro Island je charakteristický minimální výskyt koňských virových patogenů (Svansson, 2004). Zjištění, zda je mezi těmito alelami rozdíl ve vnímavosti k infekcím je předmětem pokračující studie.

V genech v SNP markerech genů IL12p35 a IL12p40, které jsou asociovány s vnímavostí k piroplasmóze byly mezi sledovanými populacemi rozdíly. Frekvence alely B lokusu IL12p35 u Islandských koní je přibližně 0,05, kdežto u jihoevropských populací je několiknásobně vyšší. Rozdíl je v alelových frekvencích je i u lokusu IL12p40 (viz tabulka 5.11). Ve zmíněné probíhající širší studii bylo zjištěno, že alela A SNP markeru IL12p35 je u obou plemen asociována s vnímavostí k infekci prvoky Theileria/Babesia. Její frekvence je o řád vyšší u Islandských poníků, kde se tyto prvoci nevyskytují. Naproti tomu je frekvence „vnímavé“ alely stále ještě značná v populacích s výskytem patogena (0,30-0,43), což je v souladu s vysokou prevalencí infekce v obou populacích – téměř 90%, která je vyšší než v ostatních populacích sledovaných v rámci celé studie - (Dr. M. Sloboda, osobní sdělení). Studie dalších dvou plemen ukazuje podobné rozdíly ve frekvenci „vnímavé“ alely: 0,87 u Starokladrubských koní, kteří představují malou izolovanou populaci bez výskytu piroplazem a 0,45 u Anglického plnokrevníka, který představuje velice variabilní skupinu (Králík et al., 2006). Přímou souvislost mezi frekvencemi alelických variant SNP

a vnímavostí k patogenům však tyto statistické údaje neprokazují. K tomuto účelu jsou v budoucnu plánovány funkční experimenty *in vitro*.

Obecně je genetická diverzita studovaná pomocí SNP markerů nejnižší u Islandských koní a jihoevropské populace jsou srovnatelně variabilní, oproti výsledkům založeným na mikrosatelitech, kde byla variabilita všech tří populací na podobné úrovni, i když trend byl stejný. Genetické distance, spočítané na podkladě dat z jednonukleotidových polymorfizmů, ukazují podobnou vzdálenost Camargských koní k oběma dalším populacím. Plemena Murgese a Islandský pony jsou si vzdálena více. Vzhledem k tomu, že jsou zahrnuty různé typy SNPs a vzhledem k hodnotám genetických vzdáleností může jít o náhodnou variabilitu. Souvislost mezi výskytem patogenů, konkrétními polymorfizmy a populačními daty v této fázi neumožňuje žádné závěry a bude předmětem dalšího studia.

Srovnání výsledků analýzy SNPs s analýzou mikrosatelitů ukazuje, že populace Islandských koní je v obou typech markerů nejméně variabilní a populace z jižní Evropy jsou srovnatelné. Rozdíl v mikrosatelitech není u Islandských koní tak velký jako rozdíl v SNPs.

Genetické vzdálenosti spočítané z mikrosatelitních a SNP dat se navzájem liší. Distance v mikrosatelitech jednoznačně oddělují Islandské poníky od jihoevropských plemen. Distance v SNP markerech tak jednoznačné nejsou a udávají největší rozdíl mezi koňmi Murgese a Islandskými. Výsledky naznačují, že markery SNP poskytují jiný typ informace než neutrální mikrosatelity. Teprve další analýzy poskytnou podklad pro jejich biologickou interpretaci., zejména s ohledem na primárně rozdílný typ variability obou typů markerů. Ve stejném stádiu jsou dnes také podobné analýzy u lidských populací (Balaresque et al., 2007).

Jednou z možností, jak studovat biologický význam SNPs jsou testy neutrality, které poskytují svědectví o tzv. „signature of selection“ v daném místě daného genu. Tajima (1989) vyvinul test pro ověření neutrality lokusu založený na frekvenci výskytu rozdílných sekvencí lokusu a rozdílu mezi nimi. Pokud je populace v neutrální rovnováze, Tajimova hodnota by měla být rovna nule. Různé události, které se v populaci odehrají ovlivňují i Tajimovu hodnotu. Například mírně nevýhodné varianty genů způsobují posun hodnoty mezi záporná čísla. Selekcční výhoda heterozygotů nebo nedávný efekt hrdla láhve naopak hodnotu zvyšují a ta je pak kladná. Negativní vychází Tajimova hodnota i v případě, kdy populace roste z rovnovážného stavu nebo se v ní uplatňuje slabá očišťující selekce. Rozhodnout do jaké míry je hodnota ovlivněna selekcí a do jaké míry demografickými

událostmi je však někdy obtížné. Díky tomu je síla Tajimova testu značně omezena (Braverman et al., 1995; Simonsen et al., 1995; Fu, 1997).

Tajimův test je nejsilnější v případě většího počtu SNPs ve studované sekvenci. V případě jednoho SNP pracuje zejména s frekvencemi alel a jeho informativnost je omezená. Z toho důvodu pravděpodobně všechny získané Tajimovy hodnoty studovaných lokusů byly statisticky nevýznamné. V rámci této nevýznamnosti byla u necelé poloviny námi testovaných lokusů u všech studovaných populací Tajimova hodnota výrazně kladná. Protože žádná z populací nezaznamenala v nedávné době výrazné snížení počtu jedinců, je možné, že v těchto SNPs se uplatňuje výhoda heterozygotnosti. Tato hypotéza je v současné době testována na úrovni celé studie u lokusů, kde je k dispozici větší počet SNPs. Výsledky Tajimova testu neutrality jsou tedy v této podobě uváděny pouze jako předběžné a pro dokreslení významu dat získaných v mé diplomové práci a jejich uplatnění v dalším řešení problému.

6.4 OBECNÉ SHRUTÍ

Byla studována genetická diverzita tří modelových populací - plemen domácího koně za využití standardních mikrosatelitních markerů a markerů SNP v kandidátních genech imunitní odpovědi. Ve vztahu k mikrosatelitům je tato práce prvním popisem diverzity většího rozsahu. Všechny dřívější práce použily mnohem menší počet jedinců a většinou i menší počet mikrosatelitních markerů. SNPs v kandidátních genech představují nový typ markeru, jehož význam se v této souvislosti teprve studuje, což bylo i jedním z cílů této práce. Všechny SNP markery použité v této práci byly identifikovány naší laboratoří. Popis jejich populační distribuce je proto prioritní. Výsledky této studie dávají základní představu o variabilitě koňských plemen a poskytují první podklady pro interpretaci jejich významu.

7. SOUHRN

- Byla popsána genetická diverzita populací Camargue, Murgese a Islandský pony v mikrosatelitních markerech. Všechny tři populace byly srovnatelně variabilní.
- Byla popsána genetická diverzita populací Camargue, Murgese a Islandský pony v jednonukleotidových polymorfizmech (SNPs). Populace Islandských poníků byla méně variabilní než jihoevropská plemena. Byly nalezeny rozdíly ve frekvencích alel SNP v genu IL12p35 asociovaných s vnímavostí k piroplasmóze mezi islandskými a jihoevropskými koňmi.
- Test neutrality neprokázal statisticky významné hodnoty Tajimova D.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aberle, K. S., Hamann, H., Drögemüller, C. and Distl, O. (2004): Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. *Animal Genetics*, **35**: 270 - 277

Achmann, R., Curik, I., Dovc, P., Kavar, T., Bodo, I., Habe, F., Marti, E., Sölkner, J. and Brem, G. (2004): Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Animal Genetics*, **35**: 285 - 292

Aggarwal, S. and Gurney, A. L. (2002): IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc. Biol.*, **71**: 1 - 8

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. and Gurney, A. L. (2003): Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.*, **278**: 1910 - 1914

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, **413**: 732 - 738

Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. (1991): The physiology of the NF- κ B transcription factor. pp. 409-432 in: Cohen, P. and Foulkes, J. G. (Eds.): *Molecular aspects of cellular regulation: hormonal control regulation of gene transcription*. Elsevier/North Holland and Biochemical Press, Amsterdam, The Netherlands.

Balaresque, P. L., Ballereau, S. J. and Jobling, M. A. (2007): Challenges in human genetic diversity: demographic history and adaptation. *Human Mol. Genet.*, **16**, R134 - R139

Behl, R., Behl, J., Gupta, N. and Gupta, S. C. (2007): Genetic relationships of five Indian horse breeds using microsatellite markers. *Animal*, **1**: 483 - 488

Bradley, D. J. (1977): Regulation of *Leishmania* populations within the host. II. genetic control of acute susceptibility of mice to *Leishmania donovani* infection. *Clin. Exp. Immunol.*, **30**: 130 - 140

Braverman, J. M., Hudson, R. R., Kaplan, N. L., Langley, C. H. and Stephan, W. (1995): The hitchhiking effect on the site frequency spectrum of DNA polymorphism. *Genetics*, **140**: 783 - 796

Brostrom, H. and Larsson, A. (1987): Allergic dermatitis (sweet itch) of Icelandic horses in Sweden: An epidemiological study. *Equine vet. J.*, **19**(3): 229 - 236

Brouillette, J. A. and Venta, P. J. (2002): Within-breed heterozygosity of canine single nucleotide polymorphisms identified by across-breed comparison. *Animal Genetics*, **33**: 464 - 467

- Brown, J. R., Bechenbach, A. T. and Smith, M. J. (1993): Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Mol. Biol. Evol.* **10**: 326 - 341
- Buchmeier, N. A. and Schreiber, R. D. (1985): Requirement of endogenous interferon- γ production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7404 - 7408
- Buonavolontá, G. and Silvestrelli, M. (1986): *Il Murgese*. Ed. Equestri, Milano, Italy
- Cantile, C., Di Guardo, G., Eleni, C., Arispici, M. (2000): Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet J.*, **32**: 31 - 35
- Cariello, N. F., Scott, J. K., Kat, A. G., Thilly, W. G. and Keohavong, P. (1988): Resolution of a missense mutant in human genomic DNA by denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing using in vitro DNA amplification. *Am. J. Hum. Genet.*, **42**: 726 - 734
- Chastel, C., Launay, H., Bailly-Choumara, H., Le Lay, G., Beaucournu, J. C. (1982): Arbovirus infections in Morocco: serosurvey in small wild mammals in the northern part of the country. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.*, **75**: 466 - 475
- Comings, D. E., Muhleman, D., Ahn, C., Gysin, R. and Flanagan, S. D. (1994): The dopamine D2 receptor gene: a genetic risk factor in substance abuse. *Drug Alcohol Depend.*, **34**: 175 - 180
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A. and Sedgwick, J. D. (2003): Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, **421**: 744 - 748
- de Waal, M.R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G. and de Vries, J.E. (1991): Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, **174**: 1209 - 1220.
- Duan, J., Wainwright, M. S., Comeron, J. M., Saitou, N., Sanders, A. R., Gelernter, j. and Gejman, P. V. (2003): Synonymous mutations in human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum. Mol. Genet.*, **12**: 205 - 216
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H. , Ray, S. C., Rikihisa, Y. and Rurangirwa, F. R.. (2001): Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**: 2145 - 2165.
- Ebert, D. (1998): Experimental evolution of parasites. *Science*, **282**: 1432 - 1435
- Edwards, E. H. (1994): *The Encyclopedia of the Horse* (1st American ed.). New York, NY, pp. 260 - 261, 194 - 195

- Ford, E. B. (1940): Polymorphism and taxonomy. pp. 493 – 513 in: Huxley, L. (Eds.): *The new systematics*. Clarendon Press, Oxford, UK
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarar, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das Mahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J. and Lebecque, S. (1996): T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.*, **183**: 2593 - 2603
- Friedhoff, K. T., Tenter, A. M., Muller, I. (1990): Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev Sci Tech*, **9**(4): 1187 - 1194
- Fu, Y-X. (1997): Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**: 915 - 925
- Garza, J. C., Williamson, E. G. (2001): Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol. Ecol.* **10**: 305 - 318
- Glowatzki-Mullis, M. L., Muntwyler, J., Pfister, W., Marti, E., Rieder, S., Poncet, P. A. and Gaillard, C. (2005): Genetic diversity among horse populations with a specific focus on the Franches-Montagnes breed. *Anim. Genet.*, **37**: 33 - 39
- Gros, P., Skamene, E. and Forget, A. (1981): Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J. Immunol.*, **127**: 2417 - 2421
- Haller, O., Frese, M. and Kochs, G. (1998): Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech.*, **17**: 220 - 230
- Haller, O. and Kochs, G. (2002): Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, **3**: 710 - 717
- Happel, K. I., Zheng, M., Young, E., Quinton, L. J., Lockhart, E., Ramsay, A. J., Shellito, J. E., Schurr, J. R., Bagby, G. J., Nelson, S. and Kolls, J. K. (2003): Cutting Edge: Roles of Toll-Like Receptor 4 and IL-23 in IL-17 Expression in Response to *Klebsiella pneumoniae* Infection. *J. Immunol.*, **170**: 4432 - 4436
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V. (1988): The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal–ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, **52**: 269 - 279
- Heinz, F. X., Collett, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M. and Theil, H.-J. (2000): Family *Flaviviridae*. pp. 859 - 878 in: van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. and Wickner, R. B. (Eds.): *Virus taxonomy. Seventh Report of West Nile virus in the vertebrate world 653 the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, California

- Hodzic, E., Fish, D., Maretzki, C. M., De Silva, A. M., Feng, S., and Barthold, S. W. (1998): Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *J. Clin. Microbiol.*, **36**: 3574 - 3578
- Holbrook, A. A. (1969). Biology of equine piroplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **155**: 453 - 454
- Holzinger, D., Jorns, C., Stertz, S., Boisson-Dupuis, S., Thimme, R., Weidmann, M., Casanova, J.-L., Haller, O. and Kochs, G. (2007): Induction of MxA Gene Expression by Influenza A Virus Requires Type I or Type III Interferon Signaling. *J. Virol.*, **81**: 7776 - 7785
- Horin, P., Smola, J., Matiasovic, J., Vyskocil, M., Lukeszova, L., Tomanova, K., Kralik, P., Glasnak, V., Schroffelova, D., Knoll, A., Sedlinska, M. and Jahn, P. (2004): Polymorphisms in equine immune response genes and their associations with infections. *Mamm. Genome*, **15**: 843 - 850
- Horin P., Osickova J., Necesankova M., Matiasovic J., Musilova P., Kubickova S., Hubertova D., Vyskocil M. and Rubes J. (2008): Single nucleotide polymorphisms of interleukin-1 beta related genes and their associations with infection in the horse. *Dev. Biol. (Basel)*, **132**: 347 - 351
- Hubalek, Z., Halouzka, J. (1999): West Nile fever – a re-emerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, **5**: 643 - 650
- Infante-Duarte, C., Horton, H. F., Byrne, M. C. and Kamradt, T. (2000): Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.*, **165**: 6107 - 6115
- Jacobsen, M., Schweer, D., Ziegler, A., Gaber, R., Schock, S., Schwinzer, R., Wonigeit, K., Lindert, R., Kantarci, B., Schaefer-Klein, O., Schipper, H. I., Oertel, W. H., Heidenreich, F., Weishenker, B. G., Sommer, N. and Hemmer, B. (2000): A point mutation in PTRPC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat. Genet.*, **26**: 495 - 499
- Jiang, Z., Zamanian-Daryoush, M., Nie, H., Silva, A. M., Bryan R. G. Williams, B. R. G. and Li, X. (2003): Poly(dI.dC)-induced Toll-like Receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkB and MAP kinase is through an Interleukin-1 Receptor associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J. Biol. Chem.*, **278**: 16713 - 16719
- Justesen, J., Hartmann, R., Kjeldgaard, N. O. (2000): Gene structure and function of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase family. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **57**: 1593 - 1612
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. and Akira, S. (2005): IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* **6**(10): 981 - 988
- Kemper, C., Chan, A.C., Green, J.M., Brett, K.A., Murphy, K.M. and Atkinson, J.P. (2003): Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature*, **421**: 388 - 392.

- Kiderlen, A. F., Kaufmann, S. H. and Lohmann-Matthes, M. L. (1984): Protection of mice against the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* by recombinant immune interferon. *Eur. J. Immunol.*, **14** : 964 - 967
- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., Bunning, M. (2003): Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**: 311 - 322
- Kondo, M., Weissman, I. L. and Akashi, K. (1997): Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, **91**: 661 - 672
- Kralik, P., Matiasovic, J. and Horin, P. (2006): Genetic evidence for the existence of interleukin-23 and for variation in the interleukin-12 and interleukin-12 receptor genes in the horse. *Comp. Biochem. Physiol.*, **1**: 179 - 186
- Lanciotti, R. S., Ebel, G. D., Deubel, V., Kerst, A.J., Murri, S., Meyer, R., Bowen, M., McKinney, N., Morrill, W. E., Crabtree, M. B., Kramer, L. D., Roehrig, J. T. (2002) . Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, **298**: 96 - 105
- Landsteiner, K. and Weiner, A. S. (1940): An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, **43**: 223
- Langrish, C. L., McKenzie, B. S., Wilson, N. J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A. and Cua, D. J. (2004): IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.*, **202**: 96 - 105
- Lenardo, M. J. and Baltimore D. (1989): NF- κ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, **58**: 227 - 229
- Lepidi, H., Bunnell, J. E., Martin, M. E., Madigan, J. E., Stuen, S. and Dumler, J. S. (2000): Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **62**: 29 - 37.
- Leroy, G., Callède, L., Verrier, E., Mériaux, J-C., Ricard, A., Danchin-Burge, C. and Rognon, X. (2009): Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by microsatellite polymorphism. *Genetics Selection Evolution*, **41**: 5 - 16
- Liu, Z. J., Li, P., Kocabas, A., Ju, Z., Karsi, A., Cao, D. and Patterson, A. (2001): Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**: 317 - 324
- Luis, C., Bastos-Silveira, C., Gus Cothran, E. and Do Mar Oom, M. (2006): Iberian origins of New World horse breeds. *J. Hered.*, **97**: 107 - 113
- Malmgren, H., Gustavsson, J., Tuvemo, T. and Dahl, N. (1996): Rapid detection of a mutation hot-spot in the human androgen receptor. *Clin. Genet.*, **50**: 202 - 205

- Matiasovic, J., Kubickova, S., Musilova, P., Rubes, J. and Horin, P. (2002): Characterization of the NRAMP1 (SLC11A1) gene in the horse (*Equus caballus* L.). *Eur. J. Immunogenet.*, **29**: 423 - 429
- Murgue, B., Murri, S., Zientara, S., Durand, B., Durand, J. P., Zeller, H. (2001): West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**: 692 - 696
- Murray, H. W., Rubin, B. Y. and Rothermel, C. D. (1983): Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes : evidence that interferon gamma is the activating lymphokine. *J. Clin. Invest.*, **72**: 1506 - 1510
- Nei, M. (1972): Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, **106**: 283 - 292
- Nei, M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 3321 - 3323
- Nei, M. (1987): *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA., pp.180
- Olaleye, O. D., Omilabu, S.A., Ilomechina, E. N., Fagbami, A. H. (1990): A survey for haemagglutination-inhibiting antibody to West Nile virus in human and animal sera in Nigeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **13**: 35 - 39
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F. and Kastelein, R. A. (2000): Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, **13**: 715 - 725
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A. M., McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D. M., Kastelein, R. A., de Waal Malefyt, R. and Moore, K. W. (2002): A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rb1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.*, **168**: 5699 - 5708
- Pariset, L., Cappuccio, I., Joost, S., D'Andrea, M., Marletta, D., Ajmone Marsan, P. and Valentini, A. (2006): Characterization of single nucleotide polymorphisms in sheep and their variation as evidence of selection. *Anim. Genet.*, **37**: 290 - 292
- Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. I., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J.D. and Davison, B.L. (1994): Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin-7 receptor deficient mice. *J. Exp. Med.*, **180**: 1955 - 1960
- Pieragostini, E., Rizzi, R., Bramante, G., Rosati, A., Perrotta, G. and Caroli, A. (2005): Genetic study of Murgese horse from genealogical data and microsatellites. *J. Anim. Sci.*, **4**: 197 - 202

- Plant, J., and Glynn, A. A. (1976): Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Infect. Dis.*, **133**: 72 - 78
- Plante, Y., Vega-Pla, J. L., Lucas, Z., Colling, D., De March, B. and Buchanan, F. (2007): Genetic diversity in a feral horse population from Sable Island, Canada. *J. Hered.*, **98**: 594 - 602
- Poon, A. and Schurr, E. (2004): The NRAMP genes and human susceptibility to common diseases. pp. 29 - 43 in: Cellier, M. and Gros, P. (Eds.): *The Nramp Family*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY
- Prugnotte, F., Manica, A., Charpentier, M., Guegan, J.F., Guernier, V. and Balloux, F. (2005): Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr. Biol.*, **15**: 1022 - 1027
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D.H., Kastelein, R., Moore, K.W. and Banchereau, J. (1992): Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**: 1890 - 1893.
- Simonsen, K. I., Churchill, G. A. and Aquadro, C. F. (1995): Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics*, **141**: 413 - 428
- Steinman, A., Banet-Noach, C., Tal, S., Levi, O., Simanov, L., Perk, S., Malkinson, M., Shpigel, N. (2003): West Nile virus infection in crocodiles. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**: 887 - 889
- Svansson, V. (2004): Viral infections in horses in Iceland. pp. 30–31 in: *Proceedings of the International Symposium on Diseases of the Icelandic Horse*, International Veterinary Information Service, Ithaca, USA
- Tajima, F. (1989): Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**: 585 - 595
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003): Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, **21**: 335 - 376
- Takeda, K. and Akira, S. (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *Internat. Immunol.*, **17**: 1 - 14
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 6463 - 6471
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2002): Genetic approaches to the study of Toll- like receptor function. *Microbes and infection*, **4**: 887 - 895
- Tber, A. A. (1996): West Nile fever in horses in Morocco. *Bull. Office Int. Epizoot.*, **11**: 867 - 869
- Thompson, J. N. (1994): *The coevolutionary process*. Chicago: University of Chicago Press, pp. 228

- Thude, H., Hundrieser, J., Wonigeit, K. and Schwinzer, R. (1995): A point mutation in the human CD45 gene associated with defective splicing of exon A. *Eur. J. Immunol.*, **25**: 2101 - 2106
- Trowsdale, J. and Parham, P. (2004): Defense strategies and immunity- related genes. *Eur. J. Immunol.*, **34**: 7 - 17
- Wang, X., Rikihisa, Y., Lai, T-H., Kumagai, Y., Zhi, N. and Reed, S. M. (2004): Rapid Sequential Changeover of Expressed *p44* Genes during the Acute Phase of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Horses. *Infection and Immunity*, **72**: 6852 - 6859
- Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllenstein, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R. and Prager, E. M (1985): Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* **26**: 375 - 400
- Wright, S. (1965): The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, **19**: 395 - 420
- Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, I.D., Ding, A., Troso, T. and Nathan, C. (1992): Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science (Wash. DC)*, **256**: 225 - 228
- Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z. and Shu, H. B. (2005): VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol. Cell*, **19**(6): 727 - 740
- Zhang, D.-X. and Hewitt, G. M. (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.*, **11**(6): 247 - 251

9. PŘÍLOHY

PŘÍLOHA 1: Srovnání sekvence genu TLR3 s referenční sekvencí v genové bance

```
>  ref|NC_009170.2|NC_009170 Equus caballus chromosome 27, reference assembly
(based on EquCab2),
whole genome shotgun sequence
Length=39960074

Score = 1092 bits (591), Expect = 0.0
Identities = 597/600 (99%), Gaps = 0/600 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1          AGAAGGGGGATTGGGTACAGAATTGTGTCTAAACTTTCAAGGGCTGTACAGACTGTTGCG
|
Sbjct 24189415    AGAAGGGGGATTGGGTACAGAATTGTGTCTAAACTTTCAAGGGCTGTACAGACTGTTGCG

Query 61         TTTTGGTTATTAATCTTTTGTCTCCCACTTTCAGTTTCTCCAGGGTGTTCAGGCA
|
Sbjct 24189355    TTTTGGTTATTAATCTTTTGTCTCCCACTTTCAGTTTCTCCAGGGTGTTCAGGCA

Query 121        ATTGAAAATTATTTGGCCTCTCTCTGAACAGTGTCCAAGCTGGGCCCCGGTCTCACAGAG
|
Sbjct 24189295    ATTGAAAATTATTTGGCCTCTCTCTGAACAGTGTCCAAGCTGGGCCCCAGTCTCACAGAG

Query 181        AAACCTTGTCTGGAATTATCAAACACCAGCATCCAGAATCTATCTTTGAGTAACACACAG
|
Sbjct 24189235    AAACCTTGTCTGGAATTATCAAACACCAGCATCCAGAATCTATCTTTGAGTAACACACAG

Query 241        CTGTACAGAACGAGCAATACTAACTTTCTTTGGGCTAAAGCAGACAAATCTCACCATGCTC
|
Sbjct 24189175    CTGTACAGAACGAGCAATACTAACTTTCTTTGGGCTAAAGCAGACAAATCTCACCATGCTC

Query 301        GATCTTTCCACAACAACCTTAAAGTGTGATTGGTAATGATTCCCTTTGCTTGGCTTCCCAT
|
Sbjct 24189115    GATCTTTCCACAACAACCTTAAAGTGTGATTGGTAATGATTCCCTTTGCTTGGCTTCCCAT

Query 361        CTGGAATATTTCTTCTGGAGTATAATAATATAGAGCATTGTATGTTCACTCCTTTTAT
|
Sbjct 24189055    CTGGAATATTTCTTCTGGAGTATAATAATATAGAGCATTGTATGTTCACTCCTTTTAT

Query 421        GGGCTTTTCAATGTGAGATACCTGAATTTGAGACGATCTTTTACTAAGCAGAGCATTCT
|
Sbjct 24188995    GGGCTTTTCAATGTGAGATACCTGAATTTGAGACGATCTTTTACTAAGCAGAGCATTCT

Query 481        CTGCTTCGCTTCCCAAGATTGATGATTTTCTTTCAGTGGCTAAAATGTTTGAGATAT
|
Sbjct 24188935    CTGCTTCGCTTCCCAAGATTGATGATTTTCTTTCAGTGGCTAAAATGTTTGAGATAT

Query 541        CTTAACATGGAAGATAATAATTTCCAGGCATAAAAAGCAATATGTTTACAGGATTGGTA
|
Sbjct 24188875    CTTAACATGGAAGATAATAATTTCCAGGCATAAAAAGCAATATGTTTACAGGATTGGTA
```

Červeně jsou označená polymorfní místa identifikovaná v této práci.

PŘÍLOHA 2: Frekvence alel mikrosatelitů plemene Camargue

Tučně jsou psané názvy mikrosatelitů; f = frekvence

ATH4											
alela	144	146	148	150	152	154	156	158	160		
f	0,240	0,070	0,370	0,040	0,020	0,010	0,040	0,200	0,010		

ATH5											
alela	127	129	131	133	135	137	139	143			
f	0,060	0,160	0,150	0,170	0,090	0,180	0,150	0,040			

HMS1											
alela	174	176	178	180	182	184	190				
f	0,070	0,300	0,080	0,020	0,490	0,030	0,010				

HMS2											
alela	216	218	222	224	226	230	232	238			
f	0,080	0,170	0,150	0,340	0,090	0,010	0,090	0,070			

HMS3											
alela	149	157	159	161	163	165	167				
f	0,112	0,225	0,045	0,101	0,326	0,079	0,112				

HMS6											
alela	157	159	161	163	165	167					
f	0,030	0,170	0,150	0,030	0,100	0,520					

HMS7											
alela	170	172	174	176	178	180					
f	0,050	0,110	0,170	0,150	0,270	0,250					

HTG4											
alela	126	128	130	132	134	136	138				
f	0,140	0,180	0,520	0,050	0,020	0,060	0,030				

HTG6											
alela	79	83	85	91	95						
f	0,160	0,050	0,210	0,050	0,530						

HTG7											
alela	117	121	123	125							
f	0,290	0,040	0,10	0,570							

HTG10											
alela	86	90	92	94	96	98	100	102	104		
f	0,122	0,033	0,067	0,279	0,044	0,356	0,011	0,033	0,056		

VHL20											
alela	86	90	92	94	96	98	100	102	104		
f	0,190	0,010	0,090	0,180	0,210	0,070	0,040	0,010	0,200		

ASB2											
alela	234	236	238	240	242	244	246	248	250	252	254
f	0,060	0,050	0,310	0,010	0,130	0,220	0,030	0,040	0,060	0,010	0,080

ASB17												
alela	95	97	99	101	105	107	109	111	113	115	117	119
f	0,060	0,030	0,130	0,150	0,040	0,040	0,030	0,170	0,030	0,050	0,040	0,230

ASB23

alela	182	186	188	190	192	204	206	210
f	0,011	0,053	0,063	0,147	0,211	0,011	0,094	0,410

CA425

alela	229	231	235	237	239	241
f	0,040	0,220	0,160	0,070	0,330	0,180

LEX3

alela	140	144	146	152	154	156	158	160	162
f	0,060	0,220	0,040	0,080	0,370	0,040	0,110	0,060	0,020

TKY333

alela	87	89	93	97	101	103	105	107
f	0,060	0,090	0,290	0,010	0,010	0,120	0,320	0,100

HMS5

alela	100	102	106
f	0,540	0,360	0,100

HTG3

alela	114	116	118	120	122	124	126
f	0,020	0,430	0,060	0,120	0,110	0,250	0,010

EB2E8

alela	123	125	127	129	131	137
f	0,318	0,182	0,420	0,046	0,011	0,023

UM32

alela	143	145	147	149	151	153
f	0,140	0,100	0,060	0,180	0,330	0,190

TKY301

alela	147	149	151	153	155	157	165
f	0,060	0,020	0,180	0,290	0,230	0,110	0,110

UM11

alela	159	161	163	165	167	169	171	173	175	179
f	0,010	0,060	0,390	0,010	0,180	0,070	0,030	0,070	0,150	0,030

TKY337

alela	166	172	174	176	178	180
f	0,040	0,230	0,340	0,040	0,120	0,230

TKY321

alela	181	183	187	189	191	193	195	197	199	201	203
f	0,170	0,070	0,020	0,050	0,240	0,010	0,290	0,010	0,030	0,030	0,080

TKY374

alela	201	203	205	207	209	211	213	215
f	0,030	0,030	0,180	0,050	0,100	0,510	0,080	0,020

TKY294

alela	214	216	220	222	224	226
f	0,020	0,020	0,190	0,350	0,220	0,200

TKY297

alela	222	224	228	230	232	234	236	240	242
f	0,070	0,020	0,130	0,360	0,120	0,090	0,130	0,010	0,070

TKY394

alela	227	239	241	243	245	247	249	251	253	255	263
f	0,160	0,140	0,010	0,330	0,060	0,100	0,140	0,030	0,010	0,010	0,010

PŘÍLOHA 3: Analýza mikrosatelitů plemene Camargue programem Arlequin3.1

=====
 Sample : Camargue
 =====

=====
 Standard diversity indices : (Camargue)
 =====

Reference: *Nei, M., 1987.*

Reference: *Garza, J.C., and Williamson, E.G. 2001.*

No. of gene copies : 100

No. of loci : 30

No. of usable loci : 30 loci with less than 23.80 % missing data

No. of polymorphic loci : 30

 Označení lokusů:

1 = AHT4	7 = HMS7	13 = ASB2	19 = HMS5	25 = TKY337
2 = AHT5	8 = HTG4	14 = ASB17	20 = HTG3	26 = TKY321
3 = HMS1	9 = HTG6	15 = ASB23	21 = EB2E8	27 = TKY374
4 = HMS2	10 = HTG7	16 = CA425	22 = UM32	28 = TKY294
5 = HMS3	11 = HTG10	17 = LEX3	23 = TKY301	29 = TKY297
6 = HMS6	12 = VHL20	18 = TKY333	24 = UM11	30 = TKY394

Results are only shown for polymorphic loci

Locus#	Num. gene copies	Num. alleles	Obs. Het.	Exp. Het	Allelic range	G-W stat.
1	100	9	0.76000	0.76444	16	0.52941
2	100	8	0.84000	0.86343	16	0.47059
3	100	7	0.74000	0.66384	16	0.41176
4	100	8	0.82000	0.81354	20	0.38095
5	89	7	0.94872	0.80873	18	0.36842
6	100	6	0.66000	0.67313	10	0.54545
7	100	6	0.76000	0.80667	10	0.54545
8	100	7	0.70000	0.67697	12	0.53846
9	100	5	0.62000	0.65091	16	0.29412
10	100	4	0.64000	0.58525	8	0.44444
11	90	9	0.82500	0.77828	18	0.47368
12	100	9	0.70000	0.84101	18	0.47368
13	100	11	0.86000	0.82808	20	0.52381
14	100	12	0.82000	0.87394	24	0.48000
15	95	8	0.80000	0.75745	28	0.27586
16	100	6	0.74000	0.78606	12	0.46154
17	100	9	0.10000	0.79333	22	0.39130
18	100	8	0.82000	0.78505	20	0.38095
19	100	3	0.52000	0.57455	6	0.42857
20	100	7	0.72000	0.72929	12	0.53846
21	88	6	0.27273	0.69410	14	0.40000
22	100	6	0.56000	0.79737	10	0.54545
23	100	7	0.78000	0.81051	16	0.41176
24	100	10	0.74000	0.78545	20	0.47619
25	100	6	0.68000	0.76869	14	0.40000
26	100	11	0.86000	0.82141	22	0.47826
27	100	8	0.64000	0.69333	14	0.53333
28	100	6	0.66000	0.75980	12	0.46154
29	100	9	0.80000	0.81192	20	0.42857
30	100	11	0.82000	0.81960	36	0.29730
Mean	98.733	7.633	0.70688	0.76054	16.667	0.44631
s.d.	3.376	2.089	0.16882	0.07528	6.074	0.07570

=====
Molecular diversity indices : (Camargue)
=====

Reference: *Tajima, F., 1983.*
Tajima, F. 1993.
Nei, M., 1987.
Zouros, E., 1979.
Ewens, W.J. 1972.

Sample size : 100.00000
No. of haplotypes : 100

Allowed level of missing data : 23.80000 %
Number of usable loci : 30

Distance method : No. of different alleles
Average gene diversity over loci : 0.742236 +/- 0.365170

(Standard deviations are for both the sampling and the stochastic processes)

=====
Hardy-Weinberg equilibrium : (Camargue)
=====

Reference: *Guo, S. and Thompson, E. 1992.*
Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
Forecasted chain length :1000000
Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	50	0.76000	0.76444	0.99608	0.00006	1001000
2	50	0.84000	0.86343	0.12092	0.00038	1001000
3	50	0.74000	0.66384	0.96765	0.00016	1001000
4	50	0.82000	0.81354	0.58735	0.00051	1001000
5	39	0.94872	0.82984	0.40369	0.00045	1001000
6	50	0.66000	0.67313	0.47485	0.00044	1001000
7	50	0.76000	0.80667	0.66562	0.00045	1001000
8	50	0.70000	0.67697	0.96681	0.00018	1001000
9	50	0.62000	0.65091	0.54867	0.00042	1001000
10	50	0.64000	0.58525	0.96261	0.00018	1001000
11	40	0.82500	0.79462	0.16342	0.00031	1001000
12	50	0.70000	0.84101	0.34351	0.00028	1001000
13	50	0.86000	0.82808	0.70671	0.00052	1001000
14	50	0.82000	0.87394	0.74916	0.00034	1001000
15	45	0.80000	0.74831	0.85000	0.00033	1001000
16	50	0.74000	0.78606	0.48033	0.00059	1001000
17	50	0.10000	0.79333	0.00000	0.00000	1001000
18	50	0.82000	0.78505	0.90864	0.00028	1001000
19	50	0.52000	0.57455	0.29969	0.00049	1001000
20	50	0.72000	0.72929	0.42069	0.00051	1001000
21	44	0.27273	0.69410	0.00000	0.00000	1001000
22	50	0.56000	0.79737	0.00017	0.00001	1001000
23	50	0.78000	0.81051	0.82634	0.00034	1001000
24	50	0.74000	0.78545	0.35035	0.00040	1001000
25	50	0.68000	0.76869	0.25557	0.00049	1001000
26	50	0.86000	0.82141	0.04523	0.00022	1001000
27	50	0.64000	0.69333	0.15963	0.00029	1001000
28	50	0.66000	0.75980	0.33939	0.00041	1001000
29	50	0.80000	0.81192	0.35817	0.00039	1001000
30	50	0.82000	0.81960	0.39099	0.00038	1001000

PŘÍLOHA 4: Frekvence alel mikrosatelitů plemene Murgese

Tučně jsou psané názvy mikrosatelitů; f = frekvence

ATH4

alela	144	146	148	150	156	158
f	0,420	0,050	0,200	0,020	0,100	0,210

ATH5

alela	129	131	133	135	137	139
f	0,144	0,196	0,031	0,340	0,247	0,041

HMS1

alela	176	180	182	184	190
f	0,410	0,010	0,370	0,190	0,020

HMS2

alela	216	218	222	224	230	238
f	0,250	0,180	0,300	0,150	0,020	0,100

HMS3

alela	149	157	159	161	163	165	167
f	0,221	0,070	0,151	0,035	0,267	0,070	0,186

HMS6

alela	157	159	161	163	165	167
f	0,090	0,040	0,460	0,010	0,160	0,240

HMS7

alela	170	172	174	176	178	180
f	0,040	0,420	0,110	0,030	0,350	0,050

HTG4

alela	126	128	130	132	134	136
f	0,220	0,050	0,490	0,050	0,120	0,070

HTG6

alela	79	83	85	95
f	0,030	0,200	0,330	0,440

HTG7

alela	117	121	123	125
f	0,344	0,065	0,204	0,387

HTG10

alela	88	90	92	94	96	98	102	104	106
f	0,010	0,230	0,020	0,080	0,250	0,260	0,060	0,080	0,010

VHL20

alela	86	88	92	94	96	98	100	102	104
f	0,420	0,030	0,010	0,270	0,020	0,210	0,020	0,010	0,010

ASB2

alela	220	234	238	242	244	246	250
f	0,020	0,060	0,180	0,360	0,140	0,150	0,090

ASB17

alela	95	97	101	103	105	109	111	113	117	119	121
f	0,020	0,010	0,040	0,020	0,050	0,340	0,200	0,090	0,030	0,180	0,020

ASB23

alela	186	190	192	206	208	210
f	0,056	0,156	0,356	0,189	0,156	0,089

CA425

alela	225	229	231	237	239	241
f	0,010	0,020	0,162	0,111	0,626	0,071

LEX3

alela	140	150	152	154	156	158	160
f	0,310	0,060	0,170	0,210	0,130	0,030	0,090

TKY333

alela	87	89	93	97	99	103	105	107
f	0,040	0,090	0,150	0,010	0,010	0,110	0,450	0,140

HMS5

alela	100	102	106
f	0,240	0,440	0,320

HTG3

alela	114	116	120	122	124
f	0,159	0,250	0,432	0,034	0,125

EB2E8

alela	123	125	127	131	137
f	0,238	0,048	0,560	0,083	0,071

UM32

alela	143	145	149	151
f	0,194	0,054	0,237	0,516

TKY301

alela	147	151	153	155	157	163
f	0,040	0,333	0,212	0,162	0,091	0,162

UM11

alela	159	161	163	165	167	169	171	175
f	0,010	0,021	0,281	0,063	0,260	0,042	0,063	0,260

TKY337

alela	168	172	174	176	178	180	184
f	0,074	0,211	0,179	0,190	0,105	0,232	0,011

TKY321

alela	181	185	189	191	195	199	201	203
f	0,110	0,010	0,040	0,210	0,330	0,080	0,020	0,200

TKY374

alela	203	205	209	211	213	215
f	0,165	0,363	0,154	0,264	0,044	0,011

TKY294

alela	216	220	222	224	226
f	0,110	0,120	0,240	0,180	0,350

TKY297

alela	222	228	230	234	236	238	242
f	0,140	0,100	0,120	0,210	0,360	0,040	0,030

TKY394

alela	227	239	241	243	245	247	249	253
f	0,031	0,052	0,031	0,427	0,094	0,021	0,260	0,083

PŘÍLOHA 5: Analýza mikrosatelitů plemene Murgese programem Arlequin3.1

=====
 Sample : Murgese
 =====

=====
 Standard diversity indices : (Murgese)
 =====

Reference: *Nei, M., 1987.*

Reference: *Garza, J.C., and Williamson, E.G. 2001.*

No. of gene copies : 100

No. of loci : 30

No. of usable loci : 30 loci with less than 23.80 % missing data

No. of polymorphic loci : 30

 Označení lokusů:

1 = AHT4	7 = HMS7	13 = ASB2	19 = HMS5	25 = TKY337
2 = AHT5	8 = HTG4	14 = ASB17	20 = HTG3	26 = TKY321
3 = HMS1	9 = HTG6	15 = ASB23	21 = EB2E8	27 = TKY374
4 = HMS2	10 = HTG7	16 = CA425	22 = UM32	28 = TKY294
5 = HMS3	11 = HTG10	17 = LEX3	23 = TKY301	29 = TKY297
6 = HMS6	12 = VHL20	18 = TKY333	24 = UM11	30 = TKY394

Results are only shown for polymorphic loci

Locus#	Num. gene copies	Num. alleles	Obs. Het.	Exp. Het	Allelic range	G-W stat.
1	100	6	0.76000	0.73394	14	0.40000
2	97	6	0.70213	0.76912	10	0.54545
3	100	5	0.56000	0.66505	14	0.33333
4	100	6	0.82000	0.79010	20	0.28571
5	86	7	0.97222	0.82079	18	0.36842
6	100	6	0.68000	0.70242	10	0.54545
7	100	6	0.66000	0.69091	10	0.54545
8	100	6	0.72000	0.69414	10	0.54545
9	100	4	0.62000	0.66323	16	0.23529
10	93	4	0.58140	0.69331	8	0.44444
11	100	9	0.84000	0.80808	18	0.47368
12	100	9	0.76000	0.71172	18	0.47368
13	100	7	0.80000	0.79172	30	0.22581
14	100	11	0.78000	0.80566	26	0.40741
15	90	6	1.00000	0.78727	24	0.24000
16	99	6	0.55102	0.56957	16	0.35294
17	100	7	0.60000	0.80949	20	0.33333
18	100	8	0.72000	0.74081	20	0.38095
19	100	3	0.56000	0.65293	6	0.42857
20	88	5	0.75610	0.71708	10	0.45455
21	84	5	0.19048	0.62335	14	0.33333
22	93	4	0.72727	0.64423	8	0.44444
23	99	6	0.71429	0.78973	16	0.35294
24	96	8	0.76596	0.78333	16	0.47059
25	95	7	0.71739	0.82620	16	0.41176
26	100	8	0.74000	0.79434	22	0.34783
27	91	6	0.72727	0.75433	12	0.46154
28	100	5	0.88000	0.76869	10	0.45455
29	100	7	0.82000	0.78768	20	0.33333
30	96	8	0.72340	0.73662	26	0.29630
Mean	96.900	6.367	0.71496	0.73753	15.933	0.39755
s.d.	4.672	1.683	0.14465	0.06502	5.899	0.09095

=====
Molecular diversity indices : (Murgese)
=====

Reference: *Tajima, F., 1983.*
Tajima, F. 1993.
Nei, M., 1987.
Zouros, E., 1979.
Ewens, W.J. 1972.

Sample size : 100.00000
No. of haplotypes : 98

Allowed level of missing data : 23.80000 %
Number of usable loci : 30

Distance method : No. of different alleles
Average gene diversity over loci : 0.694283 +/- 0.342322

(Standard deviations are for both the sampling and the stochastic processes)

=====
Hardy-Weinberg equilibrium : (Murgese)
=====

Reference: *Guo, S. and Thompson, E. 1992.*
Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
Forecasted chain length :1000000
Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	50	0.76000	0.73394	0.39342	0.00050	1001000
2	47	0.70213	0.77076	0.54120	0.00050	1001000
3	50	0.56000	0.66505	0.10139	0.00028	1001000
4	50	0.82000	0.79010	0.97830	0.00015	1001000
5	36	0.97222	0.83842	0.46860	0.00056	1001000
6	50	0.68000	0.70242	0.12356	0.00031	1001000
7	50	0.66000	0.69091	0.91210	0.00030	1001000
8	50	0.72000	0.69414	0.95747	0.00019	1001000
9	50	0.62000	0.66323	0.25601	0.00048	1001000
10	43	0.58140	0.69850	0.27620	0.00045	1001000
11	50	0.84000	0.80808	0.62584	0.00032	1001000
12	50	0.76000	0.71172	0.57282	0.00031	1001000
13	50	0.80000	0.79172	0.56536	0.00052	1001000
14	50	0.78000	0.80566	0.89025	0.00032	1001000
15	40	1.00000	0.79462	0.01724	0.00013	1001000
16	49	0.55102	0.57353	0.54474	0.00059	1001000
17	50	0.60000	0.80949	0.00334	0.00005	1001000
18	50	0.72000	0.74081	0.29220	0.00042	1001000
19	50	0.56000	0.65293	0.25642	0.00044	1001000
20	41	0.75610	0.71063	0.82076	0.00037	1001000
21	42	0.19048	0.62335	0.00000	0.00000	1001000
22	44	0.72727	0.64185	0.20593	0.00045	1001000
23	49	0.71429	0.78855	0.05285	0.00019	1001000
24	47	0.76596	0.78540	0.33518	0.00050	1001000
25	46	0.71739	0.82489	0.04132	0.00019	1001000
26	50	0.74000	0.79434	0.37075	0.00049	1001000
27	44	0.72727	0.75967	0.05641	0.00023	1001000
28	50	0.88000	0.76869	0.07706	0.00029	1001000
29	50	0.82000	0.78768	0.18632	0.00032	1001000
30	47	0.72340	0.73988	0.66165	0.00038	1001000

PŘÍLOHA 6: Frekvence alel mikrosatelitů plemene Islandský pony

Tučně jsou psané názvy mikrosatelitů; f = frekvence

ATH4										
alela	144	146	148	150	154	156	158	160		
f	0,376	0,054	0,040	0,107	0,007	0,195	0,114	0,107		

ATH5										
alela	129	131	133	135	137	139				
f	0,361	0,039	0,097	0,019	0,342	0,142				

HMS1										
alela	176	178	180	182	184					
f	0,331	0,169	0,007	0,451	0,042					

HMS2										
alela	216	218	220	222	224	226	242			
f	0,064	0,507	0,214	0,129	0,064	0,007	0,014			

HMS3										
alela	149	157	161	163	165	167				
f	0,246	0,320	0,066	0,197	0,049	0,123				

HMS6										
alela	157	159	161	163	165	167				
f	0,219	0,062	0,041	0,103	0,096	0,480				

HMS7										
alela	170	172	174	178	180	184				
f	0,007	0,101	0,561	0,007	0,297	0,027				

HTG4										
alela	126	128	130	132	134	136				
f	0,013	0,026	0,457	0,157	0,242	0,105				

HTG6										
alela	79	83	85	93	95					
f	0,122	0,013	0,032	0,083	0,750					

HTG7										
alela	117	121	123	125						
f	0,738	0,107	0,054	0,101						

HTG10										
alela	86	88	90	92	94	98	100	102	104	
f	0,155	0,021	0,268	0,014	0,042	0,113	0,035	0,042	0,310	

VHL20										
alela	88	92	94	96	98	100	102	104		
f	0,244	0,019	0,276	0,071	0,013	0,019	0,167	0,192		

ASB2										
alela	220	228	234	236	238	242	244	246	250	252
f	0,086	0,121	0,093	0,157	0,100	0,021	0,179	0,100	0,050	0,093

ASB17												
alela	91	95	99	107	109	111	113	115	117	119	121	123
f	0,013	0,288	0,007	0,131	0,072	0,366	0,046	0,007	0,013	0,033	0,007	0,020

ASB23

alela	186	188	190	192	206	210
f	0,146	0,212	0,190	0,044	0,153	0,255

CA425

alela	225	231	235	237	239	241	243
f	0,106	0,176	0,092	0,366	0,099	0,148	0,014

LEX3

alela	140	144	146	150	152	154	156	158	160
f	0,035	0,110	0,090	0,041	0,283	0,172	0,131	0,103	0,035

TKY333

alela	91	95	97	99	101	103	105	107	109	111
f	0,312	0,125	0,150	0,019	0,019	0,013	0,188	0,138	0,025	0,013

HMS5

alela	102	104	108
f	0,400	0,275	0,325

HTG3

alela	115	117	119	121	123	125
f	0,063	0,600	0,050	0,100	0,088	0,100

EB2E8

alela	124	126	128
f	0,071	0,019	0,910

UM32

alela	144	145	147	149	151	153	154
f	0,019	0,194	0,094	0,269	0,007	0,363	0,056

TKY301

alela	145	147	151	157	159	161	165
f	0,007	0,277	0,115	0,020	0,081	0,007	0,493

UM11

alela	161	163	165	167	169	170	172	174	175	179
f	0,119	0,194	0,063	0,213	0,038	0,063	0,038	0,069	0,007	0,200

TKY337

alela	170	174	176	178	180	182	186
f	0,100	0,300	0,175	0,213	0,150	0,044	0,019

TKY321

alela	183	186	192	196	200	204	206
f	0,056	0,025	0,038	0,231	0,038	0,594	0,019

TKY374

alela	202	204	206	208	210	212	214	218
f	0,125	0,013	0,275	0,013	0,044	0,381	0,044	0,106

TKY294

alela	216	222	224	228	230
f	0,038	0,013	0,344	0,456	0,150

TKY297

alela	223	225	229	231	233	237	239	245
f	0,188	0,007	0,025	0,300	0,094	0,325	0,031	0,031

TKy394

alela	227	239	243	245	247	249	251
f	0,025	0,138	0,463	0,025	0,200	0,025	0,125

PŘÍLOHA 7: Analýza mikrosatelitů plemene Islandský pony programem Arlequin3.1

=====
 Sample : Icelandic
 =====

=====
 Standard diversity indices : (Icelandic)
 =====

Reference: *Nei, M., 1987.*

Reference: *Garza, J.C., and Williamson, E.G. 2001.*

No. of gene copies : 160

No. of loci : 30

No. of usable loci : 30 loci with less than 23.80 % missing data

No. of polymorphic loci : 30

 Označení lokusů:

1 = AHT4	7 = HMS7	13 = ASB2	19 = HMS5	25 = TKY337
2 = AHT5	8 = HTG4	14 = ASB17	20 = HTG3	26 = TKY321
3 = HMS1	9 = HTG6	15 = ASB23	21 = EB2E8	27 = TKY374
4 = HMS2	10 = HTG7	16 = CA425	22 = UM32	28 = TKY294
5 = HMS3	11 = HTG10	17 = LEX3	23 = TKY301	29 = TKY297
6 = HMS6	12 = VHL20	18 = TKY333	24 = UM11	30 = TKY394

Results are only shown for polymorphic loci

Locus#	Num. gene copies	Num. alleles	Obs. Het.	Exp. Het	Allelic range	G-W stat.
1	149	8	0.75342	0.78551	16	0.47059
2	155	6	0.66234	0.72585	10	0.54545
3	142	5	0.58571	0.66157	8	0.55556
4	140	7	0.71014	0.67667	26	0.25926
5	122	6	0.85417	0.78323	18	0.31579
6	146	6	0.71233	0.70165	10	0.54545
7	148	6	0.63514	0.59000	14	0.40000
8	153	6	0.71053	0.70038	10	0.54545
9	156	5	0.42308	0.41720	16	0.29412
10	149	4	0.41667	0.43334	8	0.44444
11	142	9	0.85938	0.79582	18	0.47368
12	156	8	0.82051	0.79917	16	0.47059
13	140	10	0.85714	0.88746	32	0.30303
14	153	12	0.80263	0.76204	32	0.36364
15	137	6	0.89062	0.81312	24	0.24000
16	142	7	0.76056	0.78913	18	0.36842
17	145	9	0.26389	0.84397	20	0.42857
18	160	10	0.83750	0.81360	20	0.47619
19	160	3	0.68750	0.66289	6	0.42857
20	160	6	0.63750	0.60975	10	0.54545
21	156	3	0.17949	0.16716	4	0.60000
22	160	7	0.73750	0.75118	10	0.63636
23	148	7	0.56757	0.66418	20	0.33333
24	160	10	0.81250	0.85314	18	0.52632
25	160	7	0.86250	0.80448	16	0.41176
26	160	7	0.62500	0.59072	23	0.29167
27	160	8	0.75000	0.75267	16	0.47059
28	160	5	0.65000	0.65369	14	0.33333
29	160	8	0.70000	0.76258	22	0.34783
30	160	7	0.72500	0.71415	24	0.28000
Mean	151.300	6.933	0.68301	0.69888	16.633	0.42352
s.d.	9.303	2.032	0.16956	0.14664	6.921	0.10757

=====
Molecular diversity indices : (Icelandic)
=====

Reference: *Tajima, F., 1983.*
Tajima, F. 1993.
Nei, M., 1987.
Zouros, E., 1979.
Ewens, W.J. 1972.

Sample size : 160.00000
No. of haplotypes : 160

Allowed level of missing data : 23.80000 %
Number of usable loci : 30

Distance method : No. of different alleles
Average gene diversity over loci : 0.624067 +/- 0.307680

(Standard deviations are for both the sampling and the stochastic processes)

=====
Hardy-Weinberg equilibrium : (Icelandic)
=====

Reference: *Guo, S. and Thompson, E. 1992.*
Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
Forecasted chain length :1000000
Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	73	0.75342	0.79188	0.40627	0.00045	1001000
2	77	0.66234	0.72693	0.24550	0.00040	1001000
3	70	0.58571	0.66115	0.09649	0.00030	1001000
4	69	0.71014	0.67640	0.39123	0.00042	1001000
5	48	0.85417	0.75175	0.74634	0.00038	1001000
6	73	0.71233	0.70165	0.21925	0.00035	1001000
7	74	0.63514	0.59000	0.61824	0.00043	1001000
8	76	0.71053	0.69772	0.92888	0.00025	1001000
9	78	0.42308	0.41720	0.88070	0.00032	1001000
10	72	0.41667	0.43629	0.02810	0.00015	1001000
11	64	0.85938	0.79318	0.58803	0.00041	1001000
12	78	0.82051	0.79917	0.64394	0.00054	1001000
13	70	0.85714	0.88746	0.77984	0.00037	1001000
14	76	0.80263	0.76054	0.20776	0.00026	1001000
15	64	0.89062	0.81016	0.03518	0.00018	1001000
16	71	0.76056	0.78913	0.10134	0.00028	1001000
17	72	0.26389	0.84567	0.00000	0.00000	1001000
18	80	0.83750	0.81360	0.94871	0.00022	1001000
19	80	0.68750	0.66289	0.26856	0.00045	1001000
20	80	0.63750	0.60975	0.66810	0.00044	1001000
21	78	0.17949	0.16716	1.00000	0.00000	1001000
22	80	0.73750	0.75118	0.07582	0.00020	1001000
23	74	0.56757	0.66418	0.33185	0.00042	1001000
24	80	0.81250	0.85314	0.96382	0.00019	1001000
25	80	0.86250	0.80448	0.80221	0.00044	1001000
26	80	0.62500	0.59072	0.46444	0.00040	1001000
27	80	0.75000	0.75267	0.09431	0.00024	1001000
28	80	0.65000	0.65369	0.25611	0.00040	1001000
29	80	0.70000	0.76258	0.04294	0.00020	1001000
30	80	0.72500	0.71415	0.53303	0.00053	1001000

PŘÍLOHA 8: Genetické vzdálenosti populací na základě analýzy mikrosatelitů
programem Arlequin3.1

Number of usable loci for distance computation : 23
 Allowed level of missing data : 0.05

List of usable loci :

```
-----
      1   2   3       7   8   9   10  12  14  17  18  19  20
22 23  24  25  26  27  28  29  30
```

List of loci with too much missing data :

```
-----
      4   5   11   13   15   16   21
```

 Označení lokusů:

1 = AHT4	7 = HMS7	13 = ASB2	19 = HMS5	25 = TKY337
2 = AHT5	8 = HTG4	14 = ASB17	20 = HTG3	26 = TKY321
3 = HMS1	9 = HTG6	15 = ASB23	21 = EB2E8	27 = TKY374
4 = HMS2	10 = HTG7	16 = CA425	22 = UM32	28 = TKY294
5 = HMS3	11 = HTG10	17 = LEX3	23 = TKY301	29 = TKY297
6 = HMS6	12 = VHL20	18 = TKY333	24 = UM11	30 = TKY394

=====
 Comparisons of pairs of population samples
 =====

Population pairwise Fst values:

```
-----
  Compute pairwise differences
  No. of permutations for significance = 100
  No. of permutations for Mantel test = 1000
```

```
Distance matrix:
  Compute distance matrix
  Molecular distance : No. of different alleles (FST)
  Gamma a value      = 0
```

List of labels for population samples used below:

```
-----
Label   Population name
-----
  1:    Camargue
  2:    Murgese
  3:    Icelandic
```

 Population pairwise FSTs

Distance method: No. of different alleles (FST)

	1	2	3
1	0.00000		
2	0.05030	0.00000	
3	0.14865	0.16682	0.00000

 FST P values

Number of permutations : 110

	1	2	3
1	*		
2	0.00000+-0.0000	*	
3	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	*

 Matrix of significant Fst P values
 Significance Level=0.0500

Number of permutations : 110

	1	2	3
1		+	+
2	+		+
3	+	+	

 Population average pairwise differences

Above diagonal : Average number of pairwise differences between populations (PiXY)
 Diagonal elements : Average number of pairwise differences within population (PiX)
 Below diagonal : Corrected average pairwise difference (PiXY-(PiX+PiY)/2)

Distance method: No. of different alleles (FST)

	1	2	3
1	17.34990	17.66260	18.98919
2	0.88846	16.19838	18.73556
3	2.77961	3.10174	15.06926

 PXY P value

	1	2
2	0.00000	
3	0.00000	0.00000

 Corrected PXY P value

	1	2
2	0.00000	
3	0.00000	0.00000

PŘÍLOHA 9: Analýza SNPs plemene Camargue programem Arlequin3.1

```
=====
Sample :          Camargue
=====
```

```
=====
== Standard diversity indices : (Camargue)
=====
```

Reference: *Nei, M., 1987.*

```
No. of gene copies      : 100
No. of loci            : 21
No. of usable loci     : 21 loci with less than 6.00 % missing data
No. of polymorphic sites : 20
```

Označení lokusů:

```
-----
1 = IL7R          6 = IL23p19a    10 = TLR3a      14 = Nramp1a    18 = NFkB2
2 = IL10         7 = IL17A       11 = iNOS       15 = Nramp1b    19 = OAS1e2
3 = IL12p35      8 = IL17RAa    12 = IfnGa      16 = VISA       20 = OAS1e4
4 = IL12p40      9 = TLR2        13 = IfnGb      17 = NFkB1b     21 = MXA
5 = IL12Rb2
```

Results are only shown for polymorphic loci

```
-----
Locus#      Num.      Num.      Obs.      Exp.
            gene     alleles   Het.      Het
            copies
-----
   1         100         2  0.08000  0.07758
   2         100         2  0.26000  0.33515
   3         100         2  0.48000  0.42424
   4          98         2  0.48980  0.49989
   5         100         2  0.10000  0.09596
   6         100         2  0.28000  0.32323
   7          98         2  0.12245  0.18515
   8          98         2  0.20408  0.18515
   9         100         2  0.14000  0.13152
  10         100         2  0.54000  0.44667
  12          96         2  0.54167  0.48333
  13          96         2  0.14583  0.17171
  14          98         2  0.53061  0.49989
  15          98         2  0.57143  0.44435
  16         100         2  0.48000  0.48485
  17         100         2  0.10000  0.13152
  18         100         2  0.22000  0.19778
  19         100         2  0.42000  0.39818
  20         100         2  0.46000  0.49515
  21         100         2  0.50000  0.50323
-----
Mean      98.857      1.952  0.31742  0.31022
s.d.      1.698      0.213  0.18698  0.16694
-----
```

=====
Molecular diversity indices : (Camargue)
=====

Reference: *Tajima, F., 1983.*
Tajima, F. 1993.
Nei, M., 1987.
Zouros, E., 1979.
Ewens, W.J. 1972.

Sample size : 100.00000
No. of haplotypes : 95

Allowed level of missing data : 6.00000 %
Number of observed indels : 0
Number of polymorphic sites : 20
Number of usable nucleotide sites : 21

Distance method : Pairwise difference
Average gene diversity over loci : 0.304319 +/- 0.161028

(Standard deviations are for both sampling and stochastic processes)

=====
Hardy-Weinberg equilibrium : (Camargue)
=====

Reference: *Guo, S. and Thompson, E. 1992.*
Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
Forecasted chain length :1000000
Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	50	0.08000	0.07758	1.00000	0.00000	1001000
2	50	0.26000	0.33515	0.18786	0.00041	1001000
3	50	0.48000	0.42424	0.50073	0.00046	1001000
4	49	0.48980	0.49989	1.00000	0.00000	1001000
5	50	0.10000	0.09596	1.00000	0.00000	1001000
6	50	0.28000	0.32323	0.37917	0.00048	1001000
7	49	0.12245	0.18515	0.06175	0.00023	1001000
8	49	0.20408	0.18515	1.00000	0.00000	1001000
9	50	0.14000	0.13152	1.00000	0.00000	1001000
10	50	0.54000	0.44667	0.20079	0.00041	1001000
11	This locus is monomorphic: no test done.					
12	48	0.54167	0.48333	0.54483	0.00048	1001000
13	48	0.14583	0.17171	0.33808	0.00048	1001000
14	49	0.53061	0.49989	0.77361	0.00043	1001000
15	49	0.57143	0.44435	0.05401	0.00023	1001000
16	50	0.48000	0.48485	1.00000	0.00000	1001000
17	50	0.10000	0.13152	0.20101	0.00042	1001000
18	50	0.22000	0.19778	1.00000	0.00000	1001000
19	50	0.42000	0.39818	1.00000	0.00000	1001000
20	50	0.46000	0.49515	0.77160	0.00042	1001000
21	50	0.50000	0.50323	1.00000	0.00000	1001000

PŘÍLOHA 10: Analýza SNPs plemene Murgese programem Arlequin3.1

```
=====
Sample :          Murgese
=====
```

```
=====
Standard diversity indices : (Murgese)
=====
```

Reference: *Nei, M., 1987.*

```
No. of gene copies      : 100
No. of loci            : 21
No. of usable loci     : 21 loci with less than 6.00 % missing data
No. of polymorphic sites : 20
```

Označení lokusů:

```
-----
1 = IL7R          6 = IL23p19a    10 = TLR3a       14 = Nramp1a     18 = NFkB2
2 = IL10          7 = IL17A       11 = iNOS        15 = Nramp1b     19 = OAS1e2
3 = IL12p35      8 = IL17RAa     12 = IfnGa       16 = VISA        20 = OAS1e4
4 = IL12p40      9 = TLR2        13 = IfnGb       17 = NFkB1b     21 = MXA
5 = IL12Rb2
```

Results are only shown for polymorphic loci

```
-----
          Num.
          gene
Locus#   copies   Num.   Obs.   Exp.
          alleles  Het.   Het
-----
   1     100       2  0.02000  0.02000
   2      98       2  0.59184  0.48412
   3     100       2  0.50000  0.49515
   4     100       2  0.54000  0.48061
   5     100       2  0.12000  0.11394
   7     100       2  0.22000  0.22848
   8     100       2  0.28000  0.46545
   9     100       2  0.42000  0.37879
  10     100       2  0.34000  0.33515
  11     100       2  0.20000  0.18182
  12      94       2  0.12766  0.19218
  13     100       2  0.42000  0.48869
  14     100       2  0.44000  0.47596
  15     100       2  0.36000  0.40727
  16     100       2  0.44000  0.50424
  17     100       2  0.18000  0.22848
  18     100       2  0.04000  0.03960
  19     100       2  0.38000  0.39818
  20     100       2  0.48000  0.48485
  21     100       2  0.48000  0.43960
-----
Mean    99.619    1.952  0.31331  0.32584
s.d.    1.327     0.213  0.17630  0.17115
-----
```

=====
Molecular diversity indices : (Murgese)
=====

Reference: *Tajima, F., 1983.*
Tajima, F. 1993.
Nei, M., 1987.
Zouros, E., 1979.
Ewens, W.J. 1972.

Sample size : 100.00000
No. of haplotypes : 98

Allowed level of missing data : 6.00000 %
Number of observed indels : 0
Number of polymorphic sites : 20
Number of usable nucleotide sites : 21

Distance method : Pairwise difference
Average gene diversity over loci : 0.323848 +/- 0.170377

(Standard deviations are for both sampling and stochastic processes)

=====
Hardy-Weinberg equilibrium : (Murgese)
=====

Reference: *Guo, S. and Thompson, E. 1992.*
Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
Forecasted chain length :1000000
Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	50	0.02000	0.02000	1.00000	0.00000	1001000
2	49	0.59184	0.48412	0.14041	0.00036	1001000
3	50	0.50000	0.49515	1.00000	0.00000	1001000
4	50	0.54000	0.48061	0.55055	0.00047	1001000
5	50	0.12000	0.11394	1.00000	0.00000	1001000
6	This locus is monomorphic: no test done.					
7	50	0.22000	0.22848	1.00000	0.00000	1001000
8	50	0.28000	0.46545	0.00625	0.00008	1001000
9	50	0.42000	0.37879	0.70452	0.00045	1001000
10	50	0.34000	0.33515	1.00000	0.00000	1001000
11	50	0.20000	0.18182	1.00000	0.00000	1001000
12	47	0.12766	0.19218	0.06601	0.00025	1001000
13	50	0.42000	0.48869	0.38422	0.00048	1001000
14	50	0.44000	0.47596	0.76311	0.00043	1001000
15	50	0.36000	0.40727	0.48482	0.00049	1001000
16	50	0.44000	0.50424	0.40550	0.00049	1001000
17	50	0.18000	0.22848	0.17114	0.00037	1001000
18	50	0.04000	0.03960	1.00000	0.00000	1001000
19	50	0.38000	0.39818	0.73044	0.00045	1001000
20	50	0.48000	0.48485	1.00000	0.00000	1001000
21	50	0.48000	0.43960	0.74414	0.00043	1001000

PŘÍLOHA 11: Analýza SNPs plemene Islandský pony programem Arlequin3.1

```
=====
Sample :          Icelandic
=====
```

```
=====
== Standard diversity indices : (Icelandic)
=====
```

Reference: *Nei, M., 1987.*

```
No. of gene copies      : 182
No. of loci            : 21
No. of usable loci     : 21 loci with less than 6.00 % missing data
No. of polymorphic sites : 19
```

Označení lokusů:

```
1 = IL7R           6 = IL23p19a      10 = TLR3a         14 = Nramp1a      18 = NFkB2
2 = IL10           7 = IL17A         11 = iNOS          15 = Nramp1b     19 = OAS1e2
3 = IL12p35        8 = IL17RAa       12 = IfnGa         16 = VISA         20 = OAS1e4
4 = IL12p40        9 = TLR2          13 = IfnGb         17 = NFkB1b      21 = MXA
5 = IL12Rb2
```

Results are only shown for polymorphic loci

Locus#	Num. gene copies	Num. alleles	Obs. Het.	Exp. Het
2	178	2	0.46067	0.41116
3	180	2	0.11111	0.10552
4	180	2	0.42222	0.42235
6	182	2	0.19780	0.17922
7	180	2	0.07778	0.09553
8	180	2	0.22222	0.43923
9	182	2	0.15385	0.14280
10	180	2	0.36667	0.37709
11	180	2	0.03333	0.03296
12	180	2	0.41111	0.46400
13	182	2	0.19780	0.17922
14	182	2	0.59341	0.49250
15	182	2	0.49451	0.49669
16	180	2	0.31111	0.35978
17	182	2	0.01099	0.01099
18	182	2	0.07692	0.09453
19	182	2	0.42857	0.48722
20	182	2	0.29670	0.32572
21	182	2	0.42857	0.40562
Mean	180.952	1.905	0.25216	0.26296
s.d.	1.174	0.294	0.18052	0.18094

=====
Molecular diversity indices : (Icelandic)
=====

Reference: *Tajima, F., 1983.*
Tajima, F. 1993.
Nei, M., 1987.
Zouros, E., 1979.
Ewens, W.J. 1972.

Sample size : 182.00000
No. of haplotypes : 156

Allowed level of missing data : 6.00000 %
Number of observed indels : 0
Number of polymorphic sites : 19
Number of usable nucleotide sites : 21

Distance method : Pairwise difference
Average gene diversity over loci : 0.259709 +/- 0.139009

(Standard deviations are for both sampling and stochastic processes)

=====
Hardy-Weinberg equilibrium : (Icelandic)
=====

Reference: *Guo, S. and Thompson, E. 1992.*
Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
Forecasted chain length :1000000
Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	This locus is monomorphic: no test done.					
2	89	0.46067	0.41116	0.30417	0.00043	1001000
3	90	0.11111	0.10552	1.00000	0.00000	1001000
4	90	0.42222	0.42235	1.00000	0.00000	1001000
5	This locus is monomorphic: no test done.					
6	91	0.19780	0.17922	0.59310	0.00048	1001000
7	90	0.07778	0.09553	0.18958	0.00038	1001000
8	90	0.22222	0.43923	0.00001	0.00000	1001000
9	91	0.15385	0.14280	1.00000	0.00000	1001000
10	90	0.36667	0.37709	0.78300	0.00041	1001000
11	90	0.03333	0.03296	1.00000	0.00000	1001000
12	90	0.41111	0.46400	0.36009	0.00047	1001000
13	91	0.19780	0.17922	0.59270	0.00048	1001000
14	91	0.59341	0.49250	0.05581	0.00023	1001000
15	91	0.49451	0.49669	1.00000	0.00000	1001000
16	90	0.31111	0.35978	0.23710	0.00043	1001000
17	91	0.01099	0.01099	1.00000	0.00000	1001000
18	91	0.07692	0.09453	0.18729	0.00039	1001000
19	91	0.42857	0.48722	0.28176	0.00045	1001000
20	91	0.29670	0.32572	0.51322	0.00052	1001000
21	91	0.42857	0.40562	0.79431	0.00040	1001000

PŘÍLOHA 12: Genetické vzdálenosti populací na základě analýzy SNPs programem

Arlequin3.1

Number of usable loci for distance computation : 21
Allowed level of missing data : 0.06

List of usable loci :

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
15 16 17 18 19 20 21

List of loci with too much missing data :

NONE

Označení lokusů:

1 = IL7R 6 = IL23p19a 10 = TLR3a 14 = Nramp1a 18 = NFkB2
2 = IL10 7 = IL17A 11 = iNOS 15 = Nramp1b 19 = OAS1e2
3 = IL12p35 8 = IL17RAa 12 = IfnGa 16 = VISA 20 = OAS1e4
4 = IL12p40 9 = TLR2 13 = IfnGb 17 = NFkB1b 21 = MXA
5 = IL12Rb2

=====
Comparisons of pairs of population samples
=====

Population pairwise Fst values:

 Compute pairwise differences
 No. of permutations for significance = 100
 No. of permutations for Mantel test = 1000

 Distance matrix:

 Compute distance matrix
 Molecular distance : Pairwise difference
 Gamma a value = 0

List of labels for population samples used below:

Label Population name

1: Camargue
2: Murgese
3: Icelandic

Population pairwise FSTs

Distance method: Pairwise difference

	1	2	3
1	0.00000		
2	0.08800	0.00000	
3	0.07492	0.12562	0.00000

 FST P values

Number of permutations : 110

	1	2	3
1	*		
2	0.00000+-0.0000	*	
3	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	*

 Matrix of significant Fst P values
 Significance Level=0.0500

Number of permutations : 110

	1	2	3
1		+	+
2	+		+
3	+	+	

 Population average pairwise differences

Above diagonal : Average number of pairwise differences between populations (PiXY)
 Diagonal elements : Average number of pairwise differences within population (PiX)
 Below diagonal : Corrected average pairwise difference (PiXY-(PiX+PiY)/2)

Distance method: Pairwise difference

	1	2	3
1	6.39071	7.23220	6.38868
2	0.63644	6.80081	6.97626
3	0.46638	0.84892	5.45389

 PXY P value

	1	2
2	0.00000	
3	0.00000	0.00000

 Corrected PXY P value

	1	2
2	0.00000	
3	0.00000	0.00000