

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

BIOLOGIE
Imunologie



Bc. Zuzana Bainová

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Polymorfismus heterodimerů TLR2/TLR1 a TLR2/TLR6
u inbredních linií myši domácí odvozených z přirozených
populací**

*Polymorphism of TLR2/TLR1 and TLR2/TLR6 heterodimers
in wild-derived house mouse inbred strains*

Školitel: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.
Konzultant: prom. biol. Jaroslav Piálek, CSc.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 8. 2013

Podpis

1 Abstrakt

Na rozdíl od klasických laboratorních inbredních linií myši domácí, které vykazují nepřírozenou genetickou variabilitu, linie odvozené z jedinců odchycených ve volné přírodě představují vhodný model pro evolučně imunologický výzkum. Toll-like receptory (TLRs) patří mezi první složky imunity, které přicházejí do kontaktu s patogeny. Ačkoliv TLRs detekují konzervativní molekuly patogenů, ukazuje se, že jsou poměrně variabilní a tato variabilita má vztah k různým chorobám. Ve své práci jsem popsala variabilitu *Tlr1*, *2* a *6* u 24 inbredních linií pocházejících ze dvou poddruhů myši domácí (*Mus m. musculus* a *M. m. domesticus*). Tyto TLRs vykazují mezi liniemi různou míru polymorfismu. V *Tlr1* jsem našla polymorfismus rovnoměrně rozložený v rámci celé exodomény. *Tlr6* je poměrně konzervativní (nižší počet záměn lokalizovaných daleko od vazebného místa, málo změn ve fyzikálně-chemických vlastnostech aminokyselin). U *Tlr2* se naopak ve vazebném místě a kolem něj nachází několik nekonzervativních substitucí, přičemž oba poddruhy se v těchto místech vzájemně liší. Alely *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* jsou, až na 2 výjimky (TLR1 PWD, TLR2 STAIL), jasně fylogeneticky odděleny. Linie i poddruhy se prokazatelně liší v produkci IL-1 β , IL-12 a NO po stimulaci makrofágů ligandy TLR1, 2 a 6. Tento trend je však patrně výsledkem efektu určitých linií (např. BULS u IL-1 β). Výsledky mé práce naznačují nezávislou koevoluci TLR2 s patogeny u těchto poddruhů myši.

2 Abstract

Contrary to the classical mouse inbred strains with unnatural genetic variability, wild-derived strains offer a more suitable model for evolutionary immunology. Toll-like receptors (TLRs) belong to initial detectors of invading pathogens. Although TLRs recognise conserved structures they were shown to be polymorphic. This polymorphism is associated with various diseases. In my thesis, I describe variability of *Tlr1*, 2 and 6 in 24 inbred strains derived from two subspecies of house mouse (*Mus m. musculus* and *M. m. domesticus*). These *Tlrs* exhibit different levels in variability among the strains. In *Tlr1* the polymorphic sites are spread along the whole exodomain. *Tlr6* is quite conserved (a lower amount of substitutions located far from the binding region and with minor modifications in the amino acid residue properties). *Tlr2*, on the contrary, contains some substitutions with substantial alternations of residue properties that are located within or nearby the binding region and the subspecies differ at these sites. All alleles of *M. m. domesticus* and *M. m. musculus*, except for *Tlr1* PWD, *Tlr2* STAIL, are phylogenetically separated. The strains and the subspecies vary in the production of IL-1 β , IL-12 and NO after stimulation by TLR1, 2 and 6 ligands. This trend is, however, presumably influenced by the effect of particular lines (e.g. BULS in the case of IL-1 β). The results of my thesis imply independent co-evolution of TLR2 with pathogens in these subspecies.

3 Obsah

1	Abstrakt	2
2	Abstract.....	3
3	Obsah.....	4
4	Úvod	5
5	Literární přehled	6
5.1	Toll-like receptory (TLRs).....	6
5.1.1	Toll-like receptory 1, 2 a 6.....	6
5.1.2	Struktura TLR1, TLR2 a TLR6	7
5.1.3	Variabilita TLR1, TLR2 a TLR6	10
5.2	Hybridní zóna myši domácí.....	12
6	Cíle	14
7	Materiál a metody.....	15
7.1	Pokusná zvířata	15
7.2	Popis genetické variability linií	16
7.2.1	Molekulárně-genetické analýzy.....	16
7.2.2	Predikce základních strukturních vlastností proteinu.....	19
7.2.3	Konstrukce fylogenetických stromů.....	19
7.2.4	Analýza rekombinace a selekce.....	20
7.3	Funkční analýza	21
7.3.1	Pokusná zvířata.....	21
7.3.2	Stimulace makrofágů ligandy specifickými pro jednotlivé TLRs.....	22
7.3.3	Měření produkce oxidu dusnatého (NO).....	22
7.3.4	Měření produkce cytokinů IL1- β a IL-12p40.....	23
7.3.5	Statistické analýzy	24
8	Výsledky.....	27
8.1	Variabilita v Tlr1, Tlr2 a Tlr6.....	27
8.1.1	Alelická variabilita v <i>Tlr1</i>	27
8.1.2	Variabilita v aminokyselinové sekvenci TLR1	30
8.1.3	Alelická variabilita v <i>Tlr2</i>	34
8.1.4	Variabilita v aminokyselinové sekvenci TLR2.....	37
8.1.5	Alelická variabilita v <i>Tlr6</i>	41
8.1.6	Variabilita v aminokyselinové sekvenci TLR6.....	43
8.1.7	Analýza selekce a rekombinace.....	44
8.2	Funkční analýza	45
9	Diskuze	49
	Závěr.....	54
10	Poděkování	55
11	Seznam zkratk.....	56
12	Seznam aminokyselin.....	57
13	Seznam literatury.....	58
14	Přílohy	66

4 Úvod

Imunitní systém obratlovců má dvě hlavní části, evolučně původnější imunitu vrozenou a imunitu získanou (adaptivní), přičemž obě tyto části jsou velmi důležité a vzájemně funkčně propojené (Iwasaki and Medzhitov, 2010). Vrozená imunita tvoří první linii obrany organismu proti nejrůznějším cizorodým mikrobiálním infekcím. Detekční aparát vrozené imunity je založen především na rozpoznávání evolučně známých konzervativních mikrobiálních struktur (MAMPs, Microbe-associated molecular patterns; Iwasaki and Medzhitov, 2004). Schopnost správné a rychlé detekce potenciálních patogenů je přitom pro organismus naprosto zásadní. Za přímé rozpoznání MAMPs jsou zodpovědné tzv. Pattern-recognition receptory (PRRs), jejichž hlavní úlohou je v případě nebezpečí aktivovat fagocytické antigen-prezentující buňky a další složky imunity. Mezi nejdůležitější PRRs uplatňující se v procesu detekce patogenů patří heterodimery Toll-like receptoru 2 a TLR1 (TLR2/TLR1) a TLR2/TLR6, které rozpoznávají širokou škálu různých ligandů od bakteriálních acylovaných lipopeptidů až po zymosan kvasinek. Tento poměrně komplexní systém nám může posloužit jako vhodný modelový systém pro studium koevoluce hostitele a jeho patogenů. Pro podobný evolučně imunologický výzkum jsou vhodným nástrojem inbrední linie, které byly odvozeny z některé z volně žijících populací myši domácí, jelikož nám dávají unikátní příležitost zachytit alespoň část genetické variability, která se u myši vyskytuje v přirozených podmínkách (Campino et al., 2002). Tyto linie byly odvozeny od dvou poddruhů myši domácí, které spolu navíc sekundárně interagují v poměrně úzké hybridní zóně. To nám dává příležitost lépe pochopit speciaci, její vliv na koevoluci mezi hostiteli a patogeny a význam polymorfismu PRRs v tomto procesu. Pro všechny tyto výše zmíněné důvody jsem se ve své diplomové práci rozhodla studovat genetický polymorfismus TLR1, TLR2 a TLR6 u inbredních linií myši domácí odvozených z přirozených evropských populací tohoto druhu. Důraz jsem při tom kladla především na funkčně potenciálně významné substituce, které by mohly podléhat selekci a ovlivňovat koevoluci myši s jejich patogeny.

5 Literární přehled

5.1 Toll-like receptory (TLRs)

Toll-like receptory (TLRs) patří mezi transmembránové receptory vrozené imunity (tzv. Pattern-recognition receptory; PRRs; Janeway and Medzhitov, 2002). První lidský TLR byl objeven v roce 1997 jako sekvenční homolog s Toll receptorem octomilky (*Drosophila melanogaster*; Medzhitov et al., 1997), který kromě své role v embryonálním vývoji (Anderson et al., 1985) slouží v obraně proti některým bakteriálním a houbovým infekcím (Lemaitre et al., 1996). TLRs jsou poměrně evolučně (Leulier and Lemaitre, 2008), podobný protein byl objeven i u jednobuněčných organismů (Chen et al., 2007). U lidí bylo popsáno deset (TLR1 - TLR10, Chuang and Ulevitch, 2001) a u myši dvanáct funkčních TLRs (TLR1 - TLR9 a TLR11 - TLR13; Mishra et al., 2008). Svou lokalizací v buňkách a potažmo i rozpoznávanými ligandy se savčí TLRs dělí na dvě skupiny - TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 a lidský TLR10 jsou lokalizovány v cytoplazmatické membráně a svými vazebnými doménami jsou orientovány do extracelulárního prostoru, kde váží především vnější bakteriální struktury jako peptidoglykany, lipoproteiny (Takeuchi et al., 1999), lipopolysacharidy (Poltorak et al., 1998) nebo flagelin (Hayashi et al., 2001). Oproti tomu TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 a myši TLR11 - TLR13 (Pifer et al., 2011) se nacházejí intacelulárně v membránách endosomů a svými vazebnými doménami jsou nasměrovány dovnitř těchto váček, kde rozpoznávají především virové i bakteriální nukleové kyseliny (Hemmi et al., 2000; Alexopoulou et al., 2001; Lund et al., 2004; Hidmark et al., 2012) a některé patogenní proteiny (Zhang et al., 2004; Yarovinsky et al., 2005; Koblansky et al., 2013). Kromě ligandů mikrobiálního původu souhrnně označovaných jako „Microbe-associated molecular patterns“ (MAMPs), rozpoznávají TLRs také endogenní struktury uvolněné v důsledku stresu nebo zranění (Bianchi, 2007).

5.1.1 Toll-like receptory 1, 2 a 6

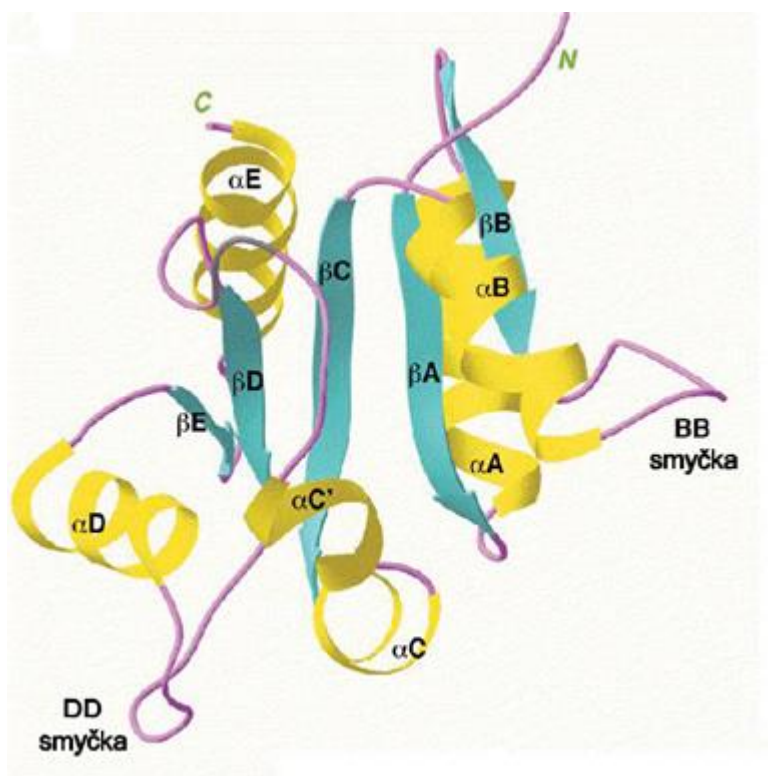
TLR1, TLR2 a TLR6 patří společně do jedné rodiny v rámci myších TLRs (Roach et al., 2005). U lidí k nim náleží ještě TLR10, který se ale u myši vyskytuje pouze ve formě nefunkčního pseudogenu, proto se jím nebudu dále zabývat. Oddělení TLR2 od TLR1 a TLR6 proběhlo ještě před oddělením kostnatých ryb (Roach et al., 2005). TLR1 a TLR6 jsou si sekvenčně velmi podobné, leží za sebou v tandemu na jednom chromozomu (u myši chromozom 5, u lidí chromozom 4) a vznikly genovou duplikací (Huang et al., 2011).

Spolu s TLR2 tvoří při vazbě ligandů heterodimery (TLR2/1 a TLR2/6), čímž se rozšiřuje spektrum rozpoznávaných struktur (Ozinsky et al., 2000). Obecně, heterodimer TLR2 spolu s TLR1 váže triacylované (Takeuchi et al., 2002) a spolu s TLR6 diacylované proteiny (Takeuchi et al., 2001). Po navázání ligandu a heterodimerizaci TLRs je signál přenesen intracelulární signální doménou TLR2 na adaptorové proteiny MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) a TIRAP (také známý jako MyD88-adaptor-like, Mal; Yamamoto et al., 2002). Signální kaskáda vede dále přes kinázy asociované s IL-1R (IL-1R-associated kinases; IRAKs), transforming growth factor- β (TGF- β)-aktivovanou kinázu (TAK1), proteiny vázající TAK1 (TAK1-binding proteins; TAB1 a TAB2) a tumour-necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor 6 (TRAF6) k transkripčnímu faktoru NF- κ B (Akira and Takeda, 2004). Aktivovaný NF- κ B je translokován do jádra, kde zahajuje transkripci prozánětlivých cytokinů, jako např. IL-1 β , IL-6, IL-12. Aktivace TAK1 vede také k aktivaci MAP kináz včetně JUN N-koncové kinázy (JUN N-terminal kinase; JNK; Akira and Takeda, 2004).

5.1.2 Struktura TLR1, TLR2 a TLR6

Jako všechny TLRs, jsou i TLR1, TLR2 a TLR6 transmembránové proteiny I. typu. Na svém N-konci mají extracelulární doménu charakteristickou strukturálními motivy bohatými na leucin (leucine-rich repeats; LRRs), následuje singulární transmembránová doména a na C-konci TLRs se nachází intracelulární signální doména homologní k obdobné části receptoru pro interleukin 1 (IL-1R), která se proto nazývá Toll/IL-1R (TIR) doména (Bowie and O'Neill, 2000). TIR doménu obsahují také adaptorové proteiny MyD88 a TIRAP (Dunne, 2003) a slouží k jejich vzájemné interakci. Ve své funkci a struktuře je poměrně konzervovaná a to nejen u živočichů (Rock et al., 1998), ale i v rostlinných R proteinech (Chan et al., 2010). Prostorově je to smotaná globulární struktura s hydrofóbním jádrem a s C a N-koncem vzdáleným 14 Å (viz obr. 5.1). Obsahuje pět β -listů (označovaných β A - β E) prostřídáných s pěti α -helixy (α A - α E; Rock et al., 1998). Smyčky mezi nimi jsou označovány podle sousedních struktur (např. AB mezi α A a β B, BB mezi β B a α B atd.). TIR doména v jednotlivých proteinech navazuje tři druhy kontaktů: receptor - receptor, adaptor - adaptor a receptor - adaptor (Xu et al., 2000). Pro vazbu TLR2 na adaptor je především důležitá BB smyčka s konzervovaným motivem $RDx\Phi_1\Phi_2G$ (kde x zastupuje jakoukoliv aminokyselinu a Φ aminokyselinu s hydrofobickým postranním řetězcem). BB smyčka je poměrně flexibilní a vyčnívá ven ze

sbalené struktury (Xu et al., 2000).

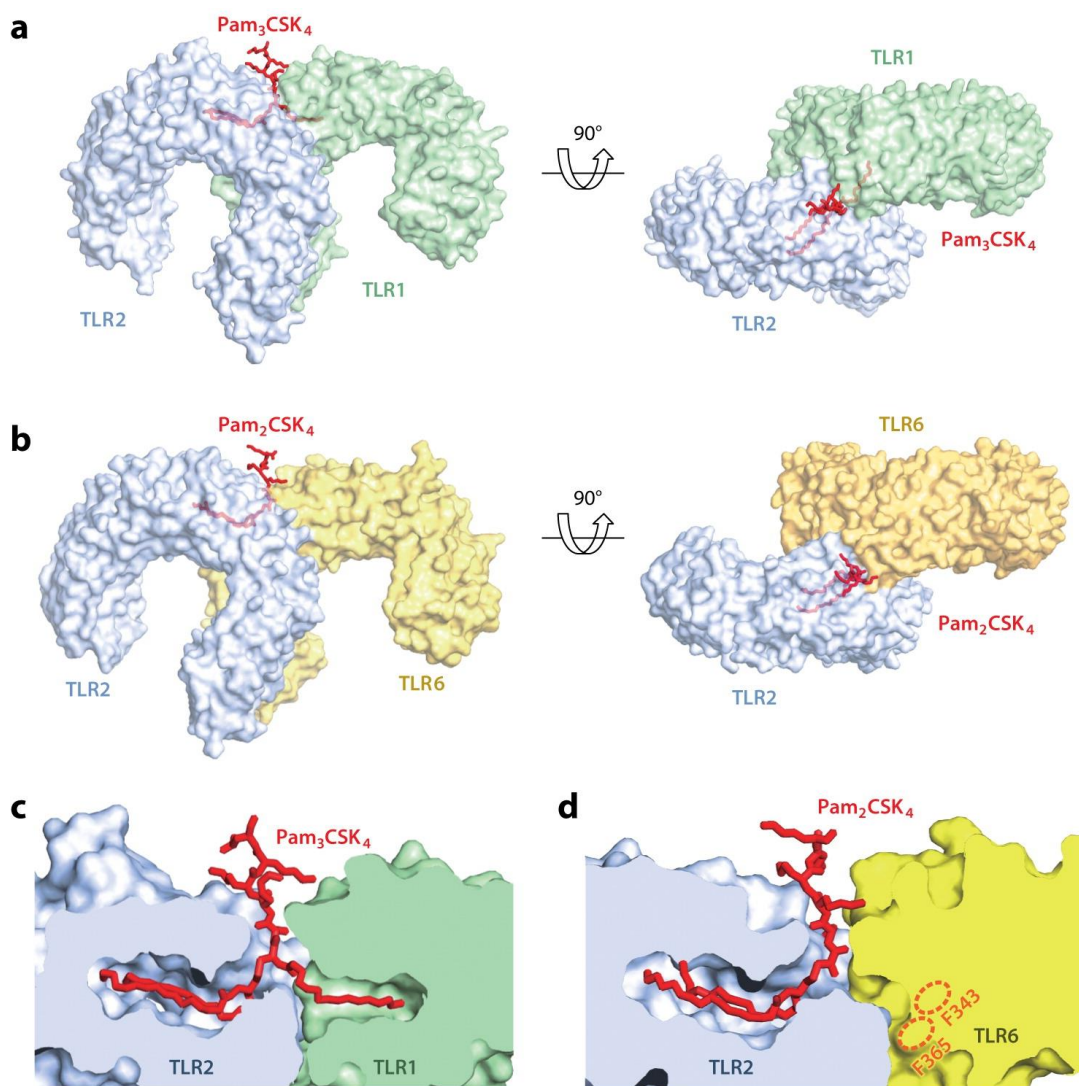


Obrázek 5.1: Schématická kresba struktury TIR domény lidského TLR2. β -listy modře, α -helixy žlutě a smyčky fialově. Upraveno podle Tao et al. (2002)

Pomocí mutačních studií byla v TIR doméně lidského TLR2 odhalena jednotlivá důležitá místa, která se podílí na vazbě na adaptor a následném přenosu signálu. Qiu et al. (2013) takto zjistili, že stačí změna v jednom z míst 663L v α A helixu nebo 688N v α B helixu lidského TLR2 a dojde k selhání odpovědi na ligandy TLR1/2 a TLR2/6. Dále ukázali, že BB smyčka je pravděpodobně odpovědná za rozdíly v přenosu signálu v odpovědi na TLR2/1 a TLR2/6, protože TLR2 s mutací na místě P681 v BB smyčce si zachoval odpovídavost na antagonistu TLR2/6, ale na ligand TLR2/1 nereagoval (Qiu et al., 2013). Na heterodimerizaci TLR2 a TLR1 se podílí DD smyčka TLR2 (klíčové aminokyseliny R748, F749, R752 a R753) a BB smyčka TLR1 (Gautam et al., 2006) a také α E helix TLR2 (Jiang et al., 2006).

Vazebná část TLR1, TLR2 a TLR6 ležící v extracelulárním prostoru je tvořena dvaceti LRRs zahrnujícími jedenáct aminokyselin dlouhý konzervativní motiv s obecnou strukturou LxxLxLxxN/CxL (kde x je jakákoliv aminokyselina, L je leucin, isoleucin, valin nebo methionin a N aspartam, threonin nebo serin) a variabilní část dlouhou 10 - 20

aminokyselin (Kobe and Kajava, 2001). Z krystalických struktur extracelulárních domén lidských TLR1 a TLR2 (Jin et al., 2007) a myších TLR2 a TLR6 (Kang et al., 2009) je vidět, že tyto domény zaujímají konformaci ve tvaru podkovy s konkávním povrchem tvořeným paralelními β listy. Vazebné místo se nachází mezi 9. až 12. LRRs (Omueti, 2005). TLR1, TLR2 a TLR6 rozpoznávají lipoproteiny ukotvené do bakteriální membrány pomocí lipidů. U gram-pozitivních bakterií a bakterií rodu *Mycoplasma* jsou to zpravidla dva lipidové řetězce navázané přes glycerol na síru z konzervovaného N-koncového cysteinu. Lipoproteiny gram-negativních bakterií obsahují ještě jeden lipidový řetězec napojený amidovou vazbou na N-konec peptidu. Právě díky těmto hydrofóbním lipidům jsou bakterie rozpoznávány TLR1, 2 a 6 (Jin et al., 2007; Kang et al., 2009). V TLR2 je vazebné místo tvořeno hydrofóbní kapsou, do které se první acyly schovají a peptidový řetězec a případně třetí lipid čnějí ven (Jin et al., 2007). TLR1 obsahuje v podobném místě hydrofóbní žlábek, kam se naváže třetí lipidový řetězec gram-negativních bakterií (Jin et al., 2007). Oproti tomu u TLR6 je tento hydrofóbní žlábek blokován dvěma fenylalaniny (Kang et al., 2009). Navázání ligandu TLRs vzájemně propojí a vzniklý heterodimer je dále stabilizován hydrofóbními a iontovými interakcemi a vodíkovými můstky mezi jednotlivými aminokyselinami TLRs v oblasti mezi 11. a 14. LRRs (obr. 5.2; Jin et al., 2007; Kang et al., 2009).



Obrázek 5.2: Vazba syntetického triacylpeptidu Pam₃CSK₄ na TLR2/1 (a) a diacylpeptidu Pam₂CSK₄ na TLR2/6 (b) a detailní průřez vazebným místem (c, d). TLR1 zeleně, TLR2 modře, TLR6 žlutě. Převzato z Kang and Lee (2011).

5.1.3 Variabilita TLR1, TLR2 a TLR6

Kromě výše zmíněných bakteriálních lipopeptidů, rozpoznávají TLR1, TLR2 a TLR6 také další struktury z mnoha různých patogenů, např. peptidoglykany a kyselinu lipoteichoovou (LTA) z gram-pozitivních bakterií (*Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*; Schroder, 2003; Schwandner et al., 1999), lipoarabinomannan z mykobakterií (Underhill et al., 1999), zymosan kvasinek (Dillon et al., 2006), či glykosyl-fosfatidylinositol prvoků (Krishnegowda et al., 2005). TLR1, TLR2 a TLR6 se tak podílí na primární detekci mnoha nejrůznějších patogenů a hrají v imunitní obraně organismu významnou roli. Polymorfismus v genech, které tyto receptory kódují, tak může ovlivnit fungování imunitního systému (Garantziotis et al., 2008; Casanova et al., 2011).

Nejčastějším druhem genetické variability v kódujících oblastech těchto genů jsou substituce jednoho nukleotidu (single nucleotide polymorphisms; SNPs), které se vyskytují v určité části populace a ne jen u jednotlivce. Obecně se udává, že za SNP je považována taková záměna jejichž frekvence je v populaci vyšší než 1 % (Mooney, 2005).

Povrchové TLRs (a mezi nimi i TLR1, TLR2 a TLR6) jsou obecně variabilnější než intracelulární tzv. „virové“ TLRs (TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9), které jsou pod silnou purifikující selekcí pravděpodobně proto, že rozpoznávají patogenní nukleové kyseliny, tedy struktury příliš podobné vlastním molekulám (Barreiro et al., 2009). TLRs a spolu s nimi i jiné PRRs jsou ve svých funkcích poměrně redundantní, jsou tak tolerovány i alely kódující nefunkční proteiny. Za určitých okolností pak taková alela může představovat selekční výhodu (Barreiro et al., 2009). Například jednobodová substituce v lidském *TLR1* znamenající záměnu isoleucinu za serin na pozici 602 se častěji vyskytuje u Evropanů, než u Afričanů a Asiatů (Johnson et al., 2007; Barreiro et al., 2009). U TLR1 s tímto SNP dochází ke změně aminokyselinového řetězce na poslední pozici transmembránové domény a receptor s polárním serinem místo hydrofóbního isoleucinu se hůře začleňuje do cytoplazmatické membrány (Johnson et al., 2007). Aktivace NF- κ B po stimulaci buněk s touto zmutovanou alelou TLR1 je snížena až na úroveň samotného TLR2 (Ben-Ali et al., 2011). Předpokládá se, že díky utlumené signalizaci dochází k menší účinnosti fagocytózy bakterie *Mycobacterium leprae*, původce lepry, která se tím hůře dostává do místa svého působení – do makrofágů (Johnson et al., 2007). Nositelé této alely jsou proto odolnější k reverzní reakci lepry (Misch et al., 2008, Wong SH 2010).

V lidském TLR2 je nejčastěji studovaným SNP R753Q v TIR doméně, který má také devastující účinek na signalizaci (Ben-Ali 2011; Xiong et al., 2012). Mnoho studií prokázalo jeho asociaci s nejrůznějšími chorobami, např. tuberkulózou (Ogus 2004), s dětskou akutní revmatickou horečkou (Berdeli 2005), se septickým šokem vyvolaným gram-pozitivní bakteriální infekcí (Lorenz 2000) a s ochranným efektem pozdní fáze lymfské boreliózy (Schroder et al., 2005), s infekcemi močového ústrojí (Tabel et al., 2007), boreliózou (Schröder et al., 2005), tuberkulózou (Texereau et al., 2005) a vracejícími se bakteriálními infekcemi (*recurrent bacterial infections*; Kutukculer et al., 2007). Jiné SNPs v TLR1, TLR6 a TLR10 mají protektivní charakter u astmatu (Kormann et al., 2008). Sun et al. (2006) prokázali, že onemocnění rakovinou prostaty souvisí s interakcí polymorfismu v genovém klasru TLR1-6-10 s polymorfismem genu pro IRAK4. Polymorfismus TLRs byl také studován například u ovcí (Swiderek et al., 2006), skotu

(Opsal et al., 2006), prasat (Shinkai et al., 2006, Morozumi & Uenishi, 2009), koní (Vychodilova-Krenkova et al., 2005) a koz (Zhou et al., 2008). Byla objevena souvislost s SNP v TIR doméně TLR2 a paratuberkulózou u skotu (Koets et al., 2010).

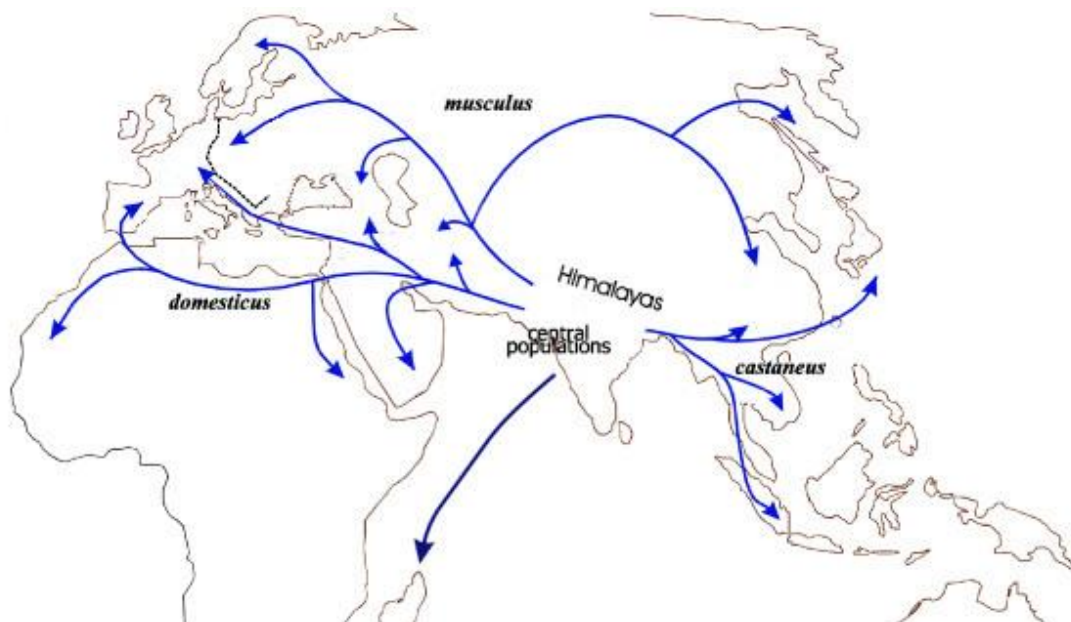
Epidemiologické srovnávací studie vztahu polymorfismu v TLRs k nejrůznějším nemocem mají svá úskalí. Například záměna R677W u TLR2 se jevila jako rizikový faktor pro tuberkulózu u tuniské (Ben-Ali, 2004) či pro lepru u korejské populace (Kang & Chae, 2001). Jiné studie z dalších lidských populací ale tyto asociace nepotvrdily (Ryu et al., 2006). Malhotra et al., (2005) navíc dokázali, že tento domnělý polymorfismus je PCR artefakt vycházející z pseudogenu paralogního k TLR2 vzniklý duplikací ještě před diverzifikací ptáků a savců (Huang et al., 2011).

5.2 Hybridní zóna myši domácí

Myš domácí (*M. musculus*) je jeden z mnoha druhů rodu *Mus* spadajícího do početného řádu hlodavců (*Rodentia*, Suzuki and Aplin, 2012). Volně žijící myši jsou kosmopolitně rozšířené a asociované s člověkem. Kvůli své masivní expanzi tak často způsobují velké škody v zemědělství a patří též k významným přenašečům nemocí (World Health Organization, www.who.int). Volně žijící myš domácí pochází z oblasti Indie, během posledních půl milionu let však prodělala radiaci a dělí se nyní do tří poddruhů (*M. m. domesticus*, *M. m. musculus* a *M. m. castaneus*; Bonhomme et al., 2007). Poddruh *M. m. castaneus* se vyskytuje především v jihovýchodní Asii (obr. 5.3). Mnohem zajímavější je situace u ostatních dvou poddruhů, které z Asie nezávisle migrovaly do Evropy. Přičemž *M. m. domesticus* volil cestu jižní přes Severní Afriku a Blízký Východ, kdežto *M. m. musculus* přišel severní cestou přes Rusko (obr. 5.3). Ve Střední Evropě se tyto dva poddruhy opět potkaly a na místě jejich sekundárního kontaktu vznikla poměrně úzká (cca 20 km), ale dlouhá (cca 2500 km) hybridní zóna, tj. oblast, kterou oba poddruhy sdílejí, kde se setkávají a množí (shrnuto v Bímová et al. 2011). Hybridi, tj. potomci vzniklí křížením těchto dvou poddruhů, vykazují menší fitness (zdatnost) než každý z rodičovských poddruhů. Tito hybridy jsou tak pod působením selekce a dochází tak k postupné speciaci, tj. vzniku dvou nových druhů z původního druhu mateřského (Baird and Macholán, 2012). Menší životaschopnost hybridů by mohla být způsobena i silným selekčním tlakem ze strany parazitů (shrnuto v Moulia & Joly, 2009; Bellocq et al. 2012). Pokud je každý poddruh vystaven rozdílnému selekčnímu tlaku ze strany parazitů, je také každý poddruh na tyto „své“ parazity i adaptován. Tyto adaptace by se mohly odrazit právě

i v rozdílné variabilitě imunitních genů a v nesení odlišných alel (v mém případě TLRs) mezi poddruhy.

Myš domácí představuje nejpoužívanější savčí modelový druh a patří k jednomu z geneticky nejprozkoumanějších živočichů vůbec. Celý genom myši byl osekvenován už v roce 2002 (Chinwalla et al., 2002) a právě myš tak byla prvním savcem, jehož genom mohl být porovnán s genomem lidským (osekvenován a publikován 2001; Lander et al., 2001; Venter, 2001). Laboratorní forma myši je hojně využívána jako modelový druh jak pro biologický výzkum, tak pro studie medicínské. Genetické a funkční studie dále usnadňuje fakt, že myš relativně dobře snáší inbredizaci, výzkumy je tak možno provádět na geneticky uniformních inbredních liniích (Strong, 1942). První z těchto linií (pojmenovaná DBA) vznikla na počátku 20. století zásluhou C. C. Littlea v Harvardu (Little & Tyzzer, 1916). Z počátku byly linie často kříženy s japonskými okrasnými myšmi, hybridy mezi poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* (Takada et al., 2013). Do původního genotypu *M. m. domesticus* se tak arteficiálně dostala příměs obou ostatních poddruhů. Počet zakladatelů klasických linií byl navíc omezený, takže dnes je jejich variabilita limitovaná (Yang et al. 2011). Pro evolučně-imunologický výzkum se proto lépe hodí inbrední linie odvozené z jedinců z volně žijících populací (Guénet and Bonhomme, 2003).



Obrázek 5.3: Historie migrace poddruhů myši domácí. Upraveno podle Bonhomme et al., 2007.

6 Cíle

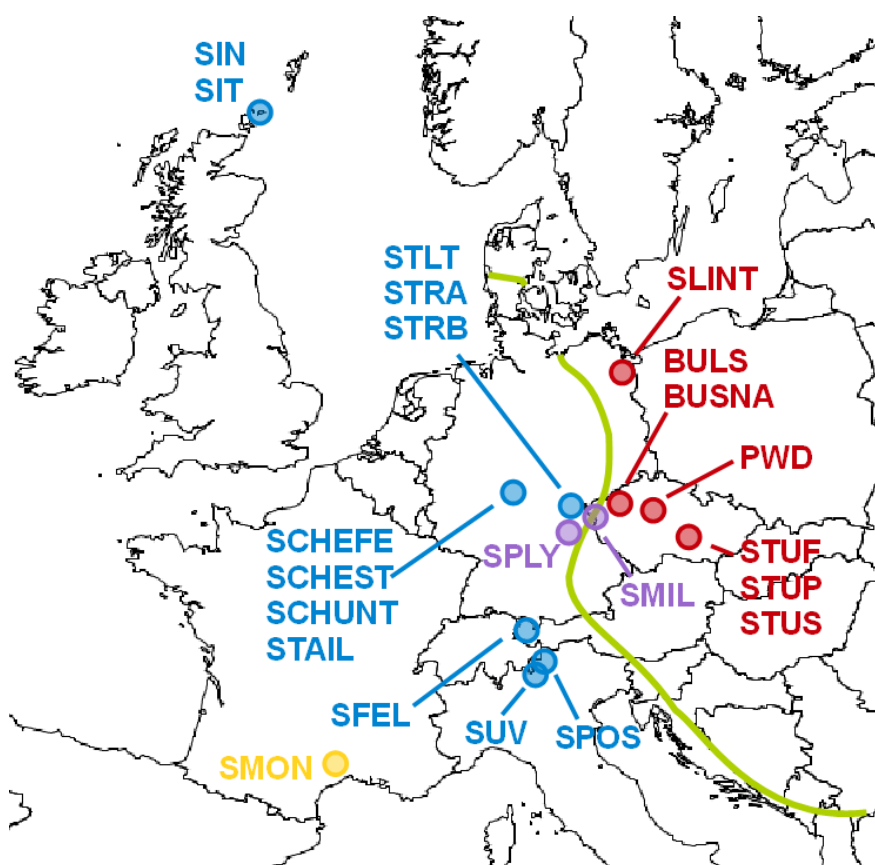
- Popsat variabilitu *Tlr1*, *Tlr2* a *Tlr6* u 24 inbredních linií myši domácí (3 klasické laboratorní, 7 odvozených z přirozené populace *M. m. musculus*, 12 odvozených z přirozené populace *M. m. domesticus*, 2 odvozené z hybridních populací)
- Odhadnout sílu možné selekce na tyto geny
- Porovnat data o genetické variabilitě v těchto genech a data o imunologické reaktivitě vybraných inbredních linií na modelové ligandy těchto receptorů

7 Materiál a metody

7.1 Pokusná zvířata

K popisu genetické variability vybraných *Tlrs* byly použity inbrední linie myši domácí, a to jednak klasické laboratorní (AJ, C3ha, C57BL6) i z přírody odvozené linie, které pocházejí z populací *Mus musculus domesticus* (linie SFEL, SCHEFE, SCHEST, SCHUNT, SIN, SIT, SPOS, STAIL, STLT, STRA, STRB, SUV), z populací *Mus musculus musculus*: (linie BULS, BUSNA, PWD, SLINT, STUF, STUP a STUS) i z hybridních populací těchto dvou poddruhů (linie SMIL a SPLY). Pro srovnání byly tyto geny osekvenovány i u inbrední linie odvozené z populace myši středozevní (*Mus spretus*; linie SMON). Geografický původ těchto linií je znázorněn na obrázku 7.1. Všechny vzorky byly poskytnuty prom. biol. Jaroslavem Piálkem, Csc. z Oddělení populační biologie, Ústavu biologie obratlovců, Akademie věd ČR, v. v. i..

Myši byly usmrceny cervikální dislokací. Následně jim byla sterilními nástroji odebrána slezina a uskladněna v RNAlatteru v -80°C pro další genetické analýzy.



Obrázek 7.1: Geografický původ analyzovaných inbredních linií myši domácí.

7.2 Popis genetické variability linií

7.2.1 Molekulárně-genetické analýzy

Z odebraných vzorků slezin byla vyizolována DNA pomocí komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (kat. číslo 69506, Qiagen, Hilden, Německo). Pár amplifikačních primerů pokrývajících celou translatovanou oblast byl navržen pro každý *Tlr* v programu Primer3 (Rozen and Skatetsky 2000) na základě referenčních sekvencí stažených z databáze NCBI GeneBank (*Tlr1* - Gene ID: 21897, NM_030682.1, GI:13507602; *Tlr2* - Gene ID: 24088, NM_011905.3, GI:158749637, *Tlr6* Gene ID: 21899, NM_011604.3, GI:157057100; sekvence a pozice primerů jsou uvedeny v tab. 7.1). Pro amplifikaci *Tlr2* bylo nutné navrhnout ještě alternativní pár primerů, protože pomocí původního páru se nepodařilo naamplifikovat *Tlr2* u linií myši pocházejících z poddruhu *M. m. musculus*. K amplifikaci CDS byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR) s použitím Taq polymerázy (Thermo Scientific™ Fermentas Taq DNA Polymerase, kat. č. EP0402, Waltham, MA, USA). Reakční směs obsahovala MgCl₂ v koncentraci 1,5 mM, koncentrace dNTPs 0,2 mM, koncentrace jednotlivých primerů 0,3 μM. Taq polymerázy bylo přidáno 1 U a DNA obvykle 2 μl na reakci. PCR amplifikace probíhala v termocycleru za následujících podmínek: iniciální denaturace při 94°C po dobu 2 minut, poté v každém cyklu denaturace při 92°C po dobu 30 sekund, nasedání primerů 1 minutu při specifické teplotě optimalizované podle teploty tání daného páru primerů (tab. 7.2), amplifikace Taq polymerázou při 72°C po specifický čas podle délky sekvence (tab. 7.2), 35 cyklů, po posledním z nich prodloužená syntéza na 10 minut. Úspěšnost PCR byla ověřena horizontální elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu (100 V, 30 min.). Poté byla DNA přečištěna ExoSAP-IT PCR Clean-up Kitem (*GE healthcare Life sciences*). Sekvence probíhala Sangerovou metodou. K sekvenaci byly použity jednak amplifikační forward primery, jednak byly v Primer3 navrženy vždy 4 další sekvenační forward primery rozmístěné přibližně po 500 bp po celé délce naamplifikované sekvence (jejich pozice a sekvence je uvedena v tabulce 7.3, poloha v genu viz obr. 7.2). Vzhledem k problémům se sekvenováním 5' konce *Tlr2* u některých linií (BULS, PWD a SLINT) byl navržen reverzní primer Rs (tab. 7.3). Amplifikace probíhala s využitím komerčně dostupného kitu BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*). Poté byla reakční směs přečištěna kitem BigDyeXT Terminator Kit (*Applied Biosystems*). Vzorky byly osekvenovány na kapilárovém sekvenátoru ABI 3130 Genetic Analyzer (*Applied*

Biosystems).

K převodu chromatogramů ze sekvenátoru na sekvence byl použit algoritmus KB Basecaller v1.2 implementovaný do programu SeqScape v2.5 (*Applied Biosystems*). V tomto programu bylo také spojeno 5 částí sekvence pocházející ze sekvenačních reakcí s jednotlivými sekvenačními primery náležející k jedné linii myši a byla provedena manuální kontrola kvality sekvencí. Alignment sekvencí byl exportován do souborů ve formátu fasta. Následně byly nukleotidové sekvence ořezány, uspořádány, přejmenovány a translatovány do aminokyselinové sekvence v programu BioEdit v7.1.3.0 (Tom Hall, *Ibis Biosciences, Carlsbad, California, USA*). Do haplotypů byly sekvence jednotlivých inbredních linií rozděleny v programu FaBox v1.40 (Villesen, 2007).

Tabulka 7.1: Primery použité na amplifikaci translatované oblasti myších Tlr1, Tlr2 a Tlr6. Pozice primerů počítána od začátku kódující oblasti.

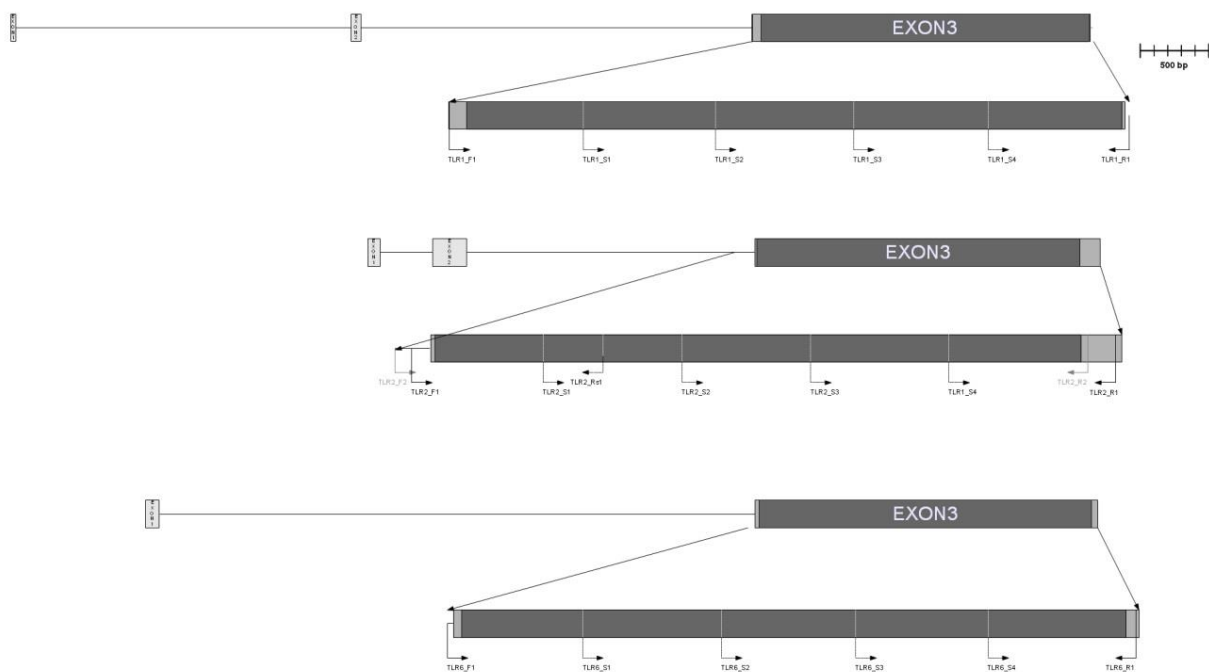
GEN	Název primeru	Sekvence primeru	Orientace primeru	Pozice (bp)
Tlr1	TLR1_F1	CCTATACCCATGTGGCAATGCTC	Forward	-64
	TLR1_R1	GCAGCAACATCATTGAGGTGGATATTC	Reverse	2388
Tlr2	TLR2_F1	ATAAGCGTGATAATAATGATATGTCC	Forward	-80
	TLR2_R1	AACAGTATTCAAGACAAAACCCATAGTT	Reverse	2357
	TLR2_F2	TGCCTGTAACCTTATTCCTTGATGAGG	Forward	-145
	TLR2_R2	AGGAAGTCAGGAACTGGGTGGAGA	Reverse	2453
Tlr6	TLR6_F1	TTAAAGTCTGTCTTATTTCTAGAGCTTGGA	Forward	-53
	TLR6_R1	GCCCAGGTTGACAGTTTATTAAGTTA	Reverse	2433

Tabulka 7.2: Podmínky PCR specifické pro jednotlivé páry amplifikačních primerů.

Gen	Pár primerů	Délka amplifikované sekvence (bp)	Teplota nasedání primerů (°C)	Čas elongace (min:s)
Tlr1	TLR1_F1 - TLR1_R1	2479	62	2:30
Tlr2	TLR2_F1 - TLR2_R1	2461	58,3	2:30
	TLR2_F2 - TLR2_R2	2626	62	2:40
Tlr6	TLR6_F1 - TLR6_R1	2512	60	2:40

Tabulka 7.3: Primery použité na sekvenaci translatované oblasti myších Tlr1, Tlr2 a Tlr6. Pozice primerů počítána od začátku kódující oblasti.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Orientace primeru	Pozice (bp)
Tlr1	TLR1_S1	CCAACTACAGTTCCTGGGGTTGAGC	Forward	425
	TLR1_S2	AAGGCTTTGTCGATACATCAAGTTGTCA	Forward	906
	TLR1_S3	CAGGCTTTGCAGGAACTCAATGTAGC	Forward	1410
	TLR1_S4	TCCAGAGAAACCTCCAGTTCCATGC	Forward	1900
Tlr2	TLR2-S1	TGGGAAATCCTTACCAGACACTGGGG	Forward	394
	TLR2-S2	ACGTAGTGAGCGAGCTGGGTAAAGT	Forward	901
	TLR2-S3	AGACGCTGGAGGTGTTGGATGT	Forward	1369
	TLR2-S4	TCCAGGCCAAGAGGAAGCCCAA	Forward	1873
	TLR2_Rs1	GAGTCAGGTGATGGATGTCG	Reverse	593
Tlr6	TLR6-S1	GCCTGTGTGTAAGGAATTTGGCAACC	Forward	440
	TLR6-S2	AGTCACTGATGATAGAGCACGTCAA	Forward	946
	TLR6-S3	TGTCACCCACCTGCAGGCTTT	Forward	1436
	TLR6-S4	GGCACATCCCCTTAGAGGAACTCCAG	Forward	1918



Obrázek 7.2: Pozice sekvenačních primerů v jednotlivých genech.

7.2.2 Predikce základních strukturních vlastností proteinu

Signální peptidy byly predikovány z aminokyselinových sekvencí na serveru SignalP v4.0 (Petersen et al., 2011) a ostatní domény nástrojem SMART v7 (Simple Modular Architecture Research Tool; Letunic et al., 2011). LRRs byly identifikovány pomocí aplikace LRRfinder (Offord et al., 2010), přičemž bylo ponecháno defaultní nastavení s 95% horní a 80% dolní hranicí. Proteinové sekvence ořezané těsně před transmembránovou doménou predikovanou ve SMARTu (Tlr1 za 582., Tlr2 za 587. a Tlr6 za 595. aminokyselinou).

7.2.3 Konstrukce fylogenetických stromů

Všechny fylogenetické stromy byly z alignmentu nukleotidových sekvencí zkonstruovány metodou nejvyšší věrohodnosti (maximum likelihood; ML) v programu MEGA v5.2 (Tamura et al., 2011). Pro konstrukci stromu byl použit evoluční model s nejnižší hodnotou BIC (Bayesian Information Criterion). Pro alignment nukleotidových sekvencí *Tlr1* a *Tlr6* byl tímto modelem Tamurův tří parametrický model a pro *Tlr2*

Kimurův dvou parametrový model. Věrohodnost jednotlivých větví byla ověřena Bootstrap analýzou s 2000 opakováními. Jako *outgroup* byly posloužity *Tlr1*, 2 a 6 z linie SMON. Fylogenetické stromy byly dále graficky upraveny v programech LibreOffice Draw v4.0.1.2 a GIMP.

7.2.4 Analýza rekombinace a selekce

Alignment všech kódujících sekvencí pro jednotlivé TLRs byl analyzován na serveru Datamonkey.org (Delport et al., 2010a). Nejprve bylo pomocí funkce CMS (Codon Model Selection; Delport et al., 2010b) otestováno, který model evoluce nukleotidů nejlépe sedí na daná data. U *Tlr1* a *Tlr2* vyšel HKY85 model (Hasegawa et al., 1985) pro *Tlr6* model označený 010011, tyto modely jsem používala na všechny následující analýzy na serveru Datamonkey. V dalším kroku byla pomocí nástrojů SBP (Single Breakpoint Recombination) a GARD (Genetic Algorithms for Recombination Detection; Kosakovsky-Pond et al., 2006) odhalena případná přítomnost rekombinačních zlomů v jednotlivých alignmentech. Pro otestování selekce byla použita metoda iFEL (internal fixed effects likelihood; Kosakovsky Pond et al., 2006) při použití stromů s rekombinačním zlomem (pro *Tlr1* a *Tlr6*) a stromu sestrojeného metodou neighbor-joining (*Tlr2*).

7.3 Funkční analýza

7.3.1 Pokusná zvířata

Reaktivita na ligandy vybraných TLRs byla otestována na souboru 59 samic osmi linií pocházejících z přirozených populací (linie SCHEFE, SCHUNT, STRA a STRB z poddruhu *M. m. domesticus* a linie BULS, BUSNA, STUF a STUS z poddruhu *M. m. musculus*; viz tab. 7.4).

Tabulka 7.4: Počty myši od jednotlivých linií použitých ve funkční studii, jejich věk a rozdělení do jednotlivých várek.

Várka	<i>M. m. domesticus</i>			<i>M. m. musculus</i>		
	Linie	Počet	Věk (dnů)	Linie	Počet	Věk (dnů)
1	SCHUNT	3	62, 62, 92	BULS	4	45, 74, 81, 95
	STRA	3	54, 59, 82	BUSNA	4	67, 83, 83, 95
	STRB	2	45, 45	STUF	3	46, 54, 54
	CELKEM			STUS	2	84, 84
	v 1. várcce	8			13	21
2	SCHUNT	5	41, 45, 48, 48, 66	BULS	2	52, 62
	STRA	3	65, 66, 66	BUSNA	1	74
	STRB	4	29, 29, 52, 73	STUF	2	53, 74
	CELKEM			STUS	4	40, 40, 57, 57
	ve 2. várcce	12			9	21
3	SCHEFE	5	61, 70, 71, 75, 76	BULS	2	65, 88
	STRA	1	72	BUSNA	3	78, 82, 91
	STRB	2	63, 93	STUF	3	92, 107, 107
	CELKEM			STUS	1	72
	ve 3. várcce	8			9	17
	<u>CELKEM</u>	28			31	59

Postupně ve třech várkách byly myši usmrceny cervikální dislokací a byla jim opakovaně vypláchnuta břišní dutina injekční stříkačkou s přibližně 6 - 8 ml studeného média skládajícím se z RPMI1640 (Sigma), 5 % CRA, antibiotik (penicilin a streptomycin), merkaptoetanolu a HEPES. Vypláchnuté makrofágy v médiu byly drženy na ledu v 15 ml Falconových zkumavkách, které byly posléze stočeny při zrychlení 250 g po dobu 8 minut. Supernatant byl slit, buňky z pelety byly resuspendovány v 1 ml média (RPMI1640, 10 % CRA, antibiotika, merkaptoetanolu a HEPES) a spočítány v Bürkerově komůrce. Médium bylo naředěno na koncentraci $1,5 \times 10^6$ buněk na ml.

7.3.2 Stimulace makrofágů ligandy specifickými pro jednotlivé TLRs

300 μ l buněčné suspenze bylo napipetováno do 48 jamkových destiček (Costar Corning, Tewksbury, USA), které byly poté dvě hodiny kultivovány při 37°C a 5 % CO₂ v CO₂ inkubátoru (Sanyo, San Diego, USA). Poté bylo do každé jamky s naadherovanými buňkami přidáno 300 μ l roztoku ligandu TLR (seznam ligandů, jejich specifita a použitá koncentrace uvedena v tab. 7.5) spolu s IFN- γ (10 ng/ml), což (jak bylo předem otestováno) rovnoměrně zvýší reakce na ligand a tím se zlepší měřitelnost signálu, ale neovlivní rozdíly mezi jednotlivými vzorky (viz kap. 7.3.5). Pracovní koncentrace jednotlivých ligandů byla předem ověřena stimulací peritoneálních buněk laboratorních myši linie C57BL6 různými koncentracemi jednotlivých ligandů. Pro negativní kontrolu bylo do jedné jamky s buňkami od každé myši přidáno čisté médium jen s IFN- γ . Jako pozitivní kontrola sloužila jamka s makrofágy, ke kterým byl přidán LPS (lipopolysacharid, 5 μ g/ml) a IFN- γ . Po 48 hodinách v CO₂ inkubátoru (viz výše) byl odebrán bezbuněčný supernatant, který posloužil k dalším analýzám.

7.3.3 Měření produkce oxidu dusnatého (NO)

Koncentrace oxidu dusnatého (respektive dusitanů vzniklých reakcí NO s kyslíkem) ve výše uvedených vzorcích (viz tab. 7.5) byla měřena spekrofotometricky pomocí Griessovy reakce. Ke 100 μ l vzorku bylo na 96 jamkové destičce přidáno 100 μ l roztoku vzniklého smícháním Griessova činidla A (1% sulfanilamid Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, kat. č. S9251 v 3% kyselině trihydrogenfosforečné) a Griessova činidla B (0,3% N-(1-naftyl)ethylendiamin dihydrochlorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, kat. č. N9125 v 3% kyselině trihydrogenfosforečné) v poměru 1:1. Jako standard bylo použito 100 μ l roztoku dusitanu sodného (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, kat. č. S3421) v

koncentraci 6,9 µg/ml rozředěného v 5% RPMI. Intenzita vzniklé růžové barvy byla změřena na spektrofotometru (Elisa Reader, MR 700, Dynatech Laboratories Inc, Chantilly, USA) při vlnové délce 550 nm.

Tabulka 7.5: Ligandy TLR1, 2 a 6 použité ve studii

Ligand	Původ	Receptor	Koncentrace (ng/ml)
Pam ₂ CGDPKHPKSF (FSL - 1)	syntetický diacylovaný lipopeptid podle N-konce lipoproteinu z <i>Mycoplasma salivarium</i>	TLR2/6	10
Pam ₂ CSK ₄	syntetický diacylovaný lipopeptid podle N-konce lipoproteinu G+ bakterií	TLR2/6	10
Pam ₃ CSK ₄	syntetický triacylovaný lipopeptid podle N-konce lipoproteinu G+ bakterií	TLR2/1	100
Kyselina lipoteichoová (LTA - SA)	G+ bakterie <i>Staphylococcus aureus</i>	TLR2	1000
Lipomanan (LM - MS)	lipoglycan z <i>Mycobacterium smegmatis</i>	TLR2	20
Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR2/6	1000

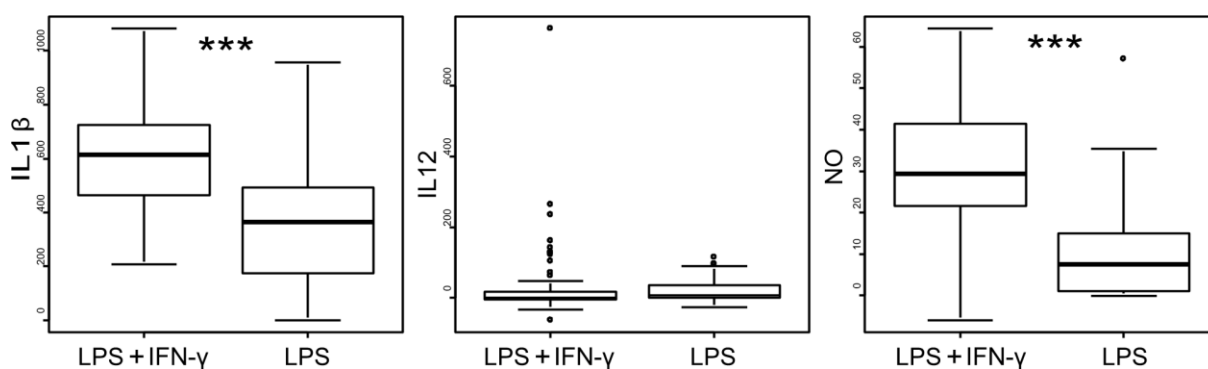
7.3.4 Měření produkce cytokinů IL1-β a IL-12p40

Obsah interleukinu (IL) 1β a IL-12 (resp. jeho podjednotky p40) ve vzorcích byl změřen kvantitativní sendvičovou metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Do mikrodestiček bylo nejprve přidáno 100 µl roztoku primární protilátky proti IL-1β respektive IL-12p40 (obě v koncentraci 4 µg/ml PBS; R&D Systems Inc. Minneapolis, USA, kat. číslo: MLB00C resp. MP400). Mikrodestičky byly inkubovány přes noc při laboratorní teplotě. Poté byly třikrát promyty roztokem Tween-20 v PBS (0,5 ml Tween-20, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, kat. č. P1754 na 1 l PBS) a zablokovány hodinovou inkubací s 200 µl 1% hovězího sérového albuminu (bovine serum albumin; BSA) v PBS při laboratorní teplotě. Následně byly destičky znovu třikrát promyty roztokem Tween-20 a PBS (viz výše). Do jamek bylo přidáno 100 µl vzorku nebo standardu. Po 2 hodinách při laboratorní teplotě byly destičky opět třikrát promyty (viz výše) a bylo přidáno 100 µl biotinizované sekundární protilátky (anti IL-1β v koncentraci 1µg/ml, anti IL-12p40 v

koncentraci 400 ng/ml). Destičky byly nechány při laboratorní teplotě 2 hodiny odstát a poté byly třikrát promyty (viz výše). Následovalo přidání 100 μ l roztoku křenové peroxidázy s navázaným strepavidinem v Tris. Po 20 minutové inkubaci ve tmě byly destičky znovu třikrát promyty a bylo přidáno 100 μ l substrátu A smíchaného se substrátem B v poměru 1:1. Vzorky byly nechány v temnu až do vyvynutí barevné reakce (10 minut až 1 hodina), poté bylo přidáno 50 μ l dvounormální kyseliny sírové, čímž se reakce zastavila. Intenzita barvy byla změřena na spektrofotometru (Elisa Reader, MR 700, Dynatech Laboratories Inc, Chantilly, Virginia, USA) při vlnové délce 450 nm.

7.3.5 Statistické analýzy

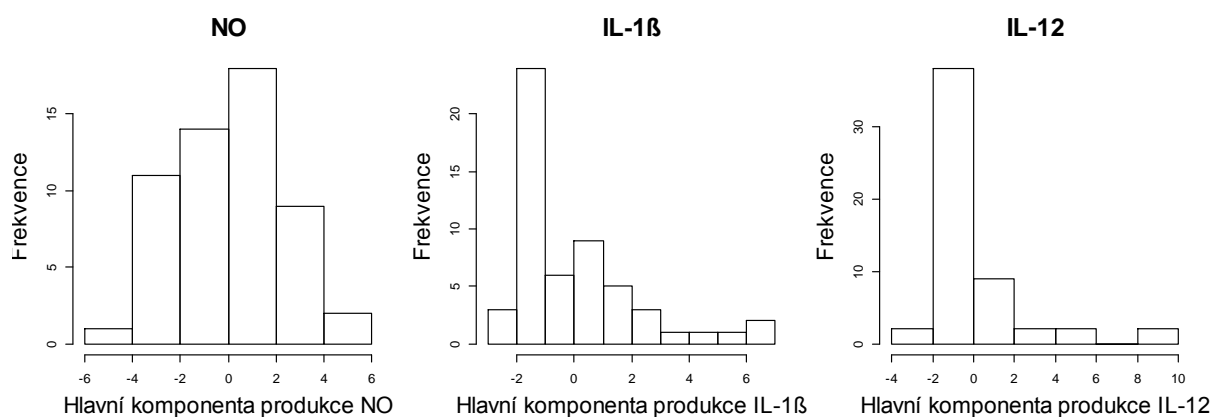
Data byla analyzována v statistickém programu R verze 3.0.1 (R Foundation for Statistical Computing 2013, Vídeň, Rakousko). Vliv IFN- γ byl zjištěn korelačním testem mezi produkcí daných ILs a NO po stimulaci samotným LPS a jejich produkcí po stimulaci LPS spolu s IFN- γ . Ve všech třech případech vyšla statisticky významná korelace ($r = 0,6292$, $t = 5,8942$, $df = 53$, $p \ll 0,001$ pro NO; $r = 0,3346$, $t = 2,5849$, $df = 53$, $p = 0,01253$ pro IL-1 β a $r = 0,3932$, $t = 3,1136$, $df = 53$, $p = 0,002978$ pro IL-12). Ke zjištění rozdílů v měření byl použit párový t-test, který byl signifikantní pro IL-1 β ($p \ll 0,001$) a pro NO ($p \ll 0,001$) a nesignifikantní pro IL-12 ($p = 0,2315$). Pro vizualizaci těchto rozdílů byly sestrojeny krabicové diagramy (obr. 7.6), ze kterých je vidět, že přidání IFN- γ zvyšuje produkci IL-1 β a NO a s produkcí IL-12 nehýbe, což je dáno pravděpodobně tím, že je nízká, v několika případech dokonce nulová.



Obrázek 7.6: Krabicové diagramy produkce IL-1 β , IL-12 a NO v závislosti na přidání LPS s IFN- γ nebo samotného LPS (***) označeny $p < 0,001$)

Od jednotlivých naměřených hodnot produkce ILs a NO po stimulaci ligandy TLRs jsme odečetli hodnoty blanku (v tomto případě produkce jednotlivých interleukinů a NO po přidání samotného IFN- γ). Protože míry reakce na jednotlivé ligandy TLR1, TLR2 a TLR6 vzájemně korelují, byla pomocí analýzy hlavních komponent (Principal Component Analysis; PCA) sestrojena pro každý cytokin a NO jedna souhrnná proměnná (označovaná zde jako PC1), která v případě IL-1 β obsahuje 80,42 %, v případě IL-12 82,65 % a v případě NO 91,44 % variability. Hodnoty PC1 byly vynásobeny -1, aby zachovávaly stejný trend jako produkce cytokinů a NO.

Shapiro-Wilkovým testem bylo ověřeno, že hodnoty produkce NO po stimulaci jednotlivými ligandy mají normální rozdělení (histogram viz obr. 7.7). Oproti tomu produkce IL-1 β a IL-12 jsou výrazně vyšikmené vpravo a obsahují hodnoty pod detekčním limitem testu. V případě IL-12 je to 43,6 až 60,0 % nulových hodnot pro jednotlivé ligandy a v případě IL-1 β po stimulaci lipomananem 27,3 % nul a zymosanem 60,0 % nul (u ostatních ligandů se jedná o 4 - 5 nul na všech 59 měření).



Obrázek 7.7: Histogramy hlavních komponent produkce NO, IL-1 β a IL-12 vypočítaných pomocí PCA z produkce NO, IL-1 β a IL-12 po stimulaci jednotlivými ligandy TLR1, 2 a 6.

Vliv na produkci IL-1 β , IL-12 a NO po stimulaci ligandy byl testován zobecněnými lineárními modely (Generalised Linear Models; GLMs) zahrnujícími tři vysvětlující proměnné (linie, várka, věk) a jejich tři dvojné a jednu trojnou interakci. Postupným vylučováním jednotlivých proměnných a jejich interakcí na základě F-kritéria, tak aby každý zjednodušený model vysvětloval alespoň stejné množství variability jako předchozí složitější, byl nalezen minimální adekvátní model (MAM). Rozdělení residuí MAM bylo otestováno Shapiro-Wilkovým testem a v případě nesplnění požadavku na normalitu, byla

provedena Box-Coxova transformace vysvětlované proměnné. Ta část variability vysvětlovaná příslušností jedince k linii byla získána jako reziduály z MAM ochuzeného o vysvětlující proměnnou „linie“ a její případné interakce, pokud je MAM obsahoval. Tyto reziduály byly použity k párovému srovnání reaktivity jednotlivých linií pomocí Tukeyho HSD (honestly significant difference) testu a k sestavení krabicových diagramů porovnávajících jednotlivé linie. Vliv druhu byl otestován jednak hierarchickým ANOVA testem z výše zmíněných reziduálů po odfiltrování efektu linie, jednak Wilcoxonovým neparametrickým testem.

8 Výsledky

8.1 Variabilita v Tlr1, Tlr2 a Tlr6

Osekvenovala jsem kódující oblasti (coding DNA sequence; CDS) genů pro Toll-like receptory 1, 2 a 6 u 7 inbredních linií poddruhu *M. m. musculus* (BULS, BUSNA, PWD, SLINT, STUF, STUP a STUS), 12 linií poddruhu *M. m. domesticus* (SFEL, SCHEFE, SCHEST, SCHUNT, SIN, SIT, SPOS, STAIL, STLT, STRA, STRB, SUV), 2 linií pocházejících z hybridních populací (SMIL a SPLY) a 3 klasických laboratorních linií (AJ, C3ha, a C57BL6) a pro srovnání, jako outgroup, jedné linie pocházející z populace jiného druhu myši – myši středozevní (SMON). Celkem bylo v CDS *Tlr1*, dlouhé 2388 bp, popsáno 55 SNPs, z čehož 25 je nesynonymních (nsSNPs), v CDS *Tlr2*, dlouhé 2355 bp, 48 SNPs, z toho 22 nsSNPs, a v CDS *Tlr6*, dlouhé 2421 bp, 44 SNPs, z toho 20 nsSNPs (tab. 8.1). Téměř polovina těchto záměn náleží do sekvence linie SMON (seznam unikátních SNPs pro linii SMON viz tab. P1 - P3 v příloze).

Tabulka 8.1: Počet všech, synonymních (s) a nesynonymních (ns) SNPs v Tlr1, Tlr2 a Tlr6 u všech inbredních linií dohromady (CELKEM), pouze u inbredních linií myši domácí a počet SNPs specifických pro linii SMON myši středozevní

GEN	CELKEM			Všechny linie <i>Mus musculus</i>			Linie SMON <i>(Mus spretus)</i>		
	SNPs	s	ns	SNPs	s	ns	SNPs	s	ns
<i>Tlr1</i>	55	30	25	32	18	14	23	11	12
<i>Tlr2</i>	48	26	22	25	11	14	23	15	8
<i>Tlr6</i>	44	24	20	22	14	8	22	9	13

8.1.1 Alelická variabilita v Tlr1

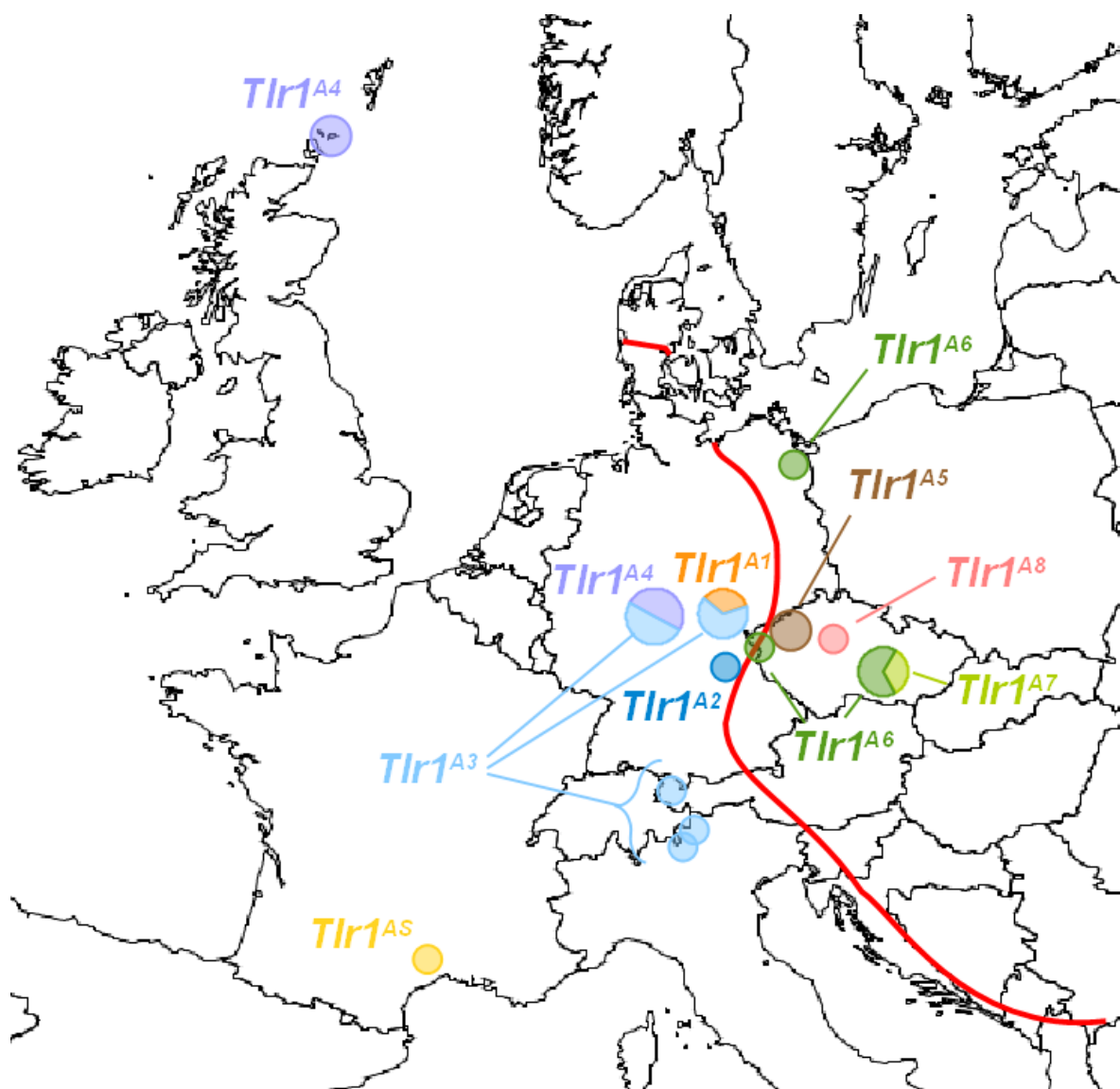
V CDS *Tlr1* bylo u 24 linií *M. musculus* nalezeno celkem 32 jednobodových záměn (jejich seznam viz tab. P4 v příloze). Bylo detekováno celkem 8 alel *Tlr1* (označených *Tlr1^{A1}* až *Tlr1^{A8}*). Dva páry alel (*Tlr1^{A2}* + *Tlr1^{A3}* a *Tlr1^{A6}* + *Tlr1^{A7}*) se vzájemně odlišují pouze synonymními substitucemi a po translaci vznikne stejná varianta proteinu. Jednotlivých proteinových variant TLR1 bylo tedy v liniích myši domácí popsáno šest (označila jsem je písmeny A - F). Žádná z alel se nevyskytuje zároveň u linie *M. m.*

domesticus a linie *M. m. musculus* (viz tab. 8.2). Linie SPLY odvozená z hybridní populace má alelu *Tlr1* zastoupenou u linií *M. m. domesticus*, zatímco linie SMIL, také pocházející z hybridní zóny má alelu *Tlr1* shodnou s liniemi *M. m. musculus*. Všechny klasické laboratorní linie použité v této studii (AJ, C57BL6 a C3ha) nesou alely zastoupené u linií pocházejících z poddruhu *M. m. domesticus*.

Tabulka 8.2: Linie nesoucí jednotlivé alely *Tlr1* a varianty *TLR1*; (příslušnost linií do skupin vyznačena písmenem v horním indexu [^S = linie *M. spretus*, ^L = klasická laboratorní linie, ^D = *M. m. domesticus*, ^M = *M. m. musculus*, ^H = linie z hybridní populace])

Varianta	Alela	Linie
proteinové sekvence		
TLR1 ^A	<i>Tlr1</i> ^{A1}	AJ ^L , C57BL6 ^L , STRB ^D
TLR1 ^B	<i>Tlr1</i> ^{A2}	C3ha ^L , SPLY ^H ,
	<i>Tlr1</i> ^{A3}	SFEL ^D , SCHEFE ^D , SCHEST ^D , SPOS ^D , STLT ^D , STRA ^D , SUV ^D
TLR1 ^C	<i>Tlr1</i> ^{A4}	SCHUNT ^D , SIN ^D , SIT ^D , STAIL ^D
TLR1 ^D	<i>Tlr1</i> ^{A5}	BULS ^M , BUSNA ^M
TLR1 ^E	<i>Tlr1</i> ^{A6}	SLINT ^M , SMIL ^H , STUF ^M , STUS ^M
	<i>Tlr1</i> ^{A7}	STUP ^M
TLR1 ^F	<i>Tlr1</i> ^{A8}	PWD ^M
TLR1 ^S	<i>Tlr1</i> ^{A5}	SMON ^S

Nejpočetněji je mezi liniemi zastoupena alela *Tlr1*^{A3}, kterou nese 7 linií. Tuto alelu mají linie pocházející z 5 různých lokalit z obou stran Alp (obr. 8.1). U linií *M. m. musculus* je u největšího počtu linií zastoupena alela *Tlr1*^{A6}, která je přítomna jak u linie pocházející přímo ze středu hybridní zóny, tak i u linií pocházejících z místa vzdáleného od hybridní zóny přes 200 km (obr. 8.1). Alela *Tlr1*^{A4} se vyskytuje jednak u linií pocházejících ze středního Německa a zároveň u linií z Orknejí na severu Skotska (obr. 8.1).

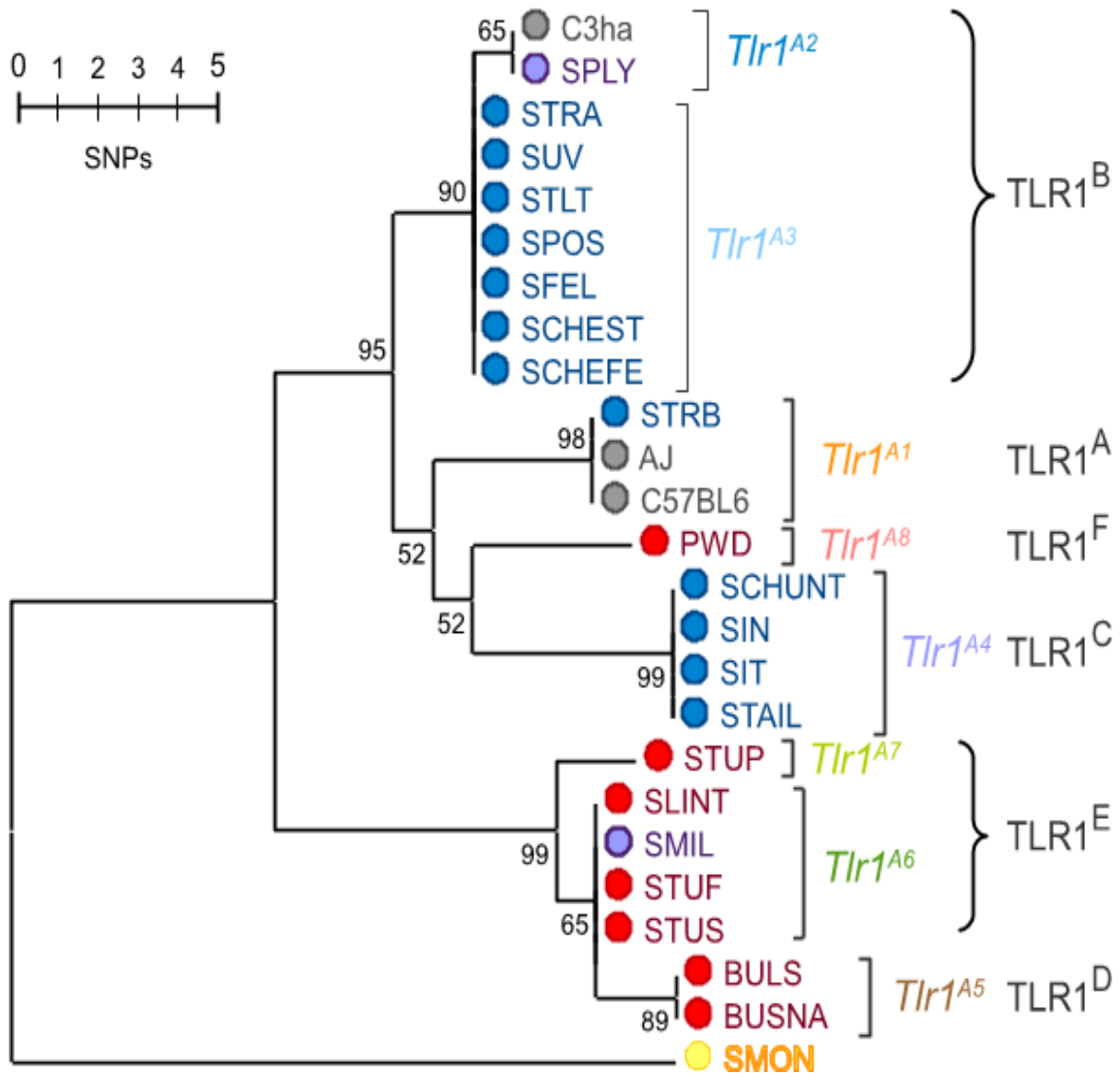


Obrázek 8.1: Geografické rozložení jednotlivých alel *Tlr1* podle původu linií

(Velikost kruhu proporčně odpovídá počtu linií, které z dané lokality pocházejí; alely se stejnou variantou proteinové sekvence znázorněny odstíny jedné barvy; přibližná poloha hybridní zóny vyznačena červenou linií, upraveno podle Macholán et al., 2012)

Ve fylogenezi *Tlr1* u daných linií (obr. 8.2) je možno jasně rozlišit dvě větve s podporou bootstrapu (BT) 95 a 99 %. Do první náleží alely *Tlr1*^{A1} až *Tlr1*^{A4} a alela *Tlr1*^{A8} a do druhé patří alely *Tlr1*^{A5} až *Tlr1*^{A7}. Rozdělení jednotlivých linií do větví téměř odpovídá jejich poddruhové příslušnosti. Všechny linie poddruhu *M. m. domesticus* náleží do první skupiny a většina linií poddruhu *M. m. musculus* do druhé skupiny. Jedinou výjimku tvoří alela *Tlr1*^{A8} linie PWD poddruhu *M. m. musculus*, která spadá do první skupiny. Alely v první větvi se vzájemně liší průměrně o 7,60 SNPs, alely druhé průměrně o 3,33 SNPs a

vzájemně se obě větve odlišují v průměru o 16,60 SNPs. Alela linie SMON (*Tlr1^{AS}*) se od jednotlivých alel myši domácí liší o 28 až 33 SNPs, přičemž leží blíže k větvi alel *M. m. domesticus*.



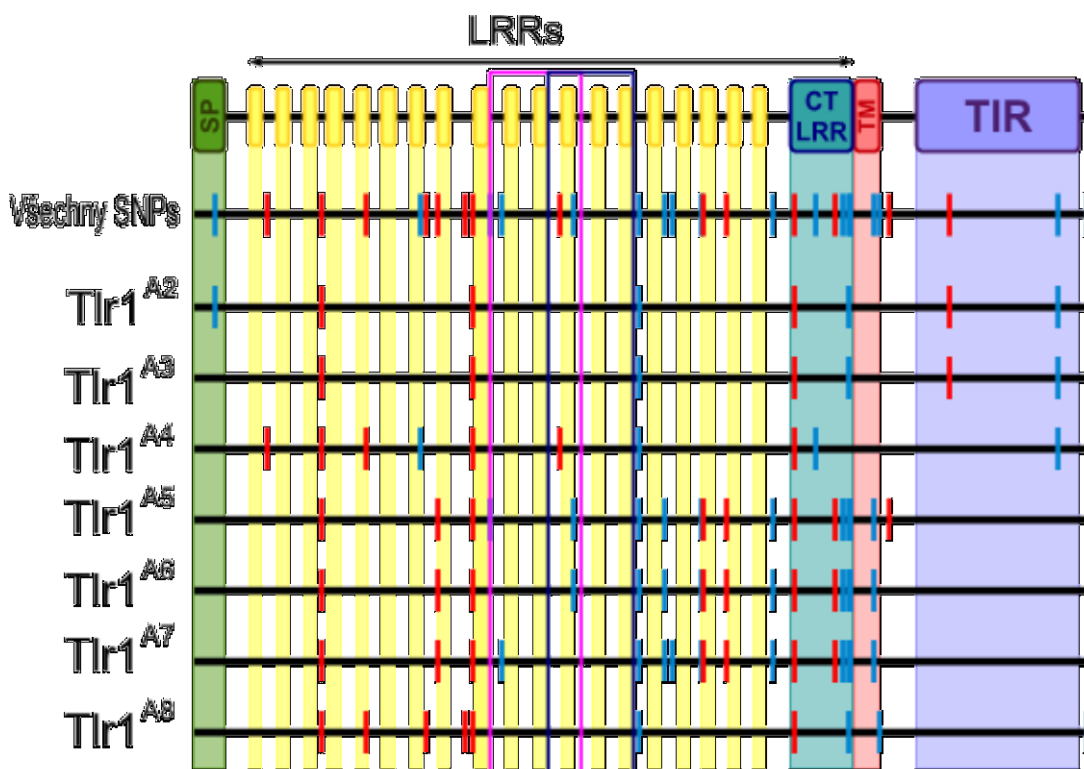
Obrázek 8.2: Fylogenetický strom *Tlr1* 24 inbredních linií myši domácí a jedné linie myši střeozemní s vyznačenými alelami a variantami proteinové sekvence

(konstruovaný metodou maximum likelihood s 2000 bootstrapy; modrými puntíky označeny linie *M. m. domesticus*, červenými *M. m. musculus*, fialovými inie z hybridní populace, šedými klasické laboratorní linie a žlutým linie myši střeozemní)

8.1.2 Variabilita v aminokyselinové sekvenci TLR1

Ze všech 32 SNPs v *Tlr1* jich 18 nemění (synonymní SNP, sSNP) a 14 mění (nsSNP) aminokyselinovou sekvenci. Průměrně tak vychází 7,55 sSNP a 5,87 nsSNPs na 1000 bp. Rozložení zvláště nesynonymních substitucí v rámci CDS není rovnoměrné (obr

8.3). V oblasti kódující extracelulární část TLR1 leží 13 sSNPs (tj. 7,81 sSNP/1000 bp) a 12 nsSNPs (7,21 nsSNPs/1000 bp), oproti tomu ve zbytku sekvence kódující transmembránovou a intracelulární část TLR1 se nachází 4 sSNPs (6,26 sSNPs/1000 bp) a 2 nsSNPs (3,13 nsSNPs/1000 bp). Ani v samotné extracelulární části nejsou nsSNPs rozloženy rovnoměrně. V oblasti vazby ligandu a dimerizačního partnera TLR2 (Jin et al., 2005) leží pouze jediný nsSNP (obr. 8.2) V této oblasti je tak průměrná hustota nsSNPs 2,6/1000 bp. Ovšem další 4 nsSNPs se nacházejí do vzdálenosti 60 aminokyselin před tímto vazebným místem (tab. 8.3).



Obrázek 8.3: SNPs v TLR1 a jejich výskyt v jednotlivých alelách

(modře značeny synonymní, červeně nesynonymní SNPs ; SP = signální peptid; TM = transmembránová doména; LRRs = leucine-rich repeats; TIR = signální TIR doména; růžový obdélník = oblast vazby ligandu, modrý obdélník = oblast dimerizace, Jin et al., 2007)

Ani změna v aminokyselinové sekvenci nemusí mít vliv na funkci proteinu, protože řada proteinogenních aminokyselin má postranní řetězce s podobnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi (velikost, polarita a náboj). Poměrně konzervativní ve všech těchto vlastnostech jsou v TLR1 tři substituce (T65N, V450I a R566K; tab. 8.3). U ostatních záměn se největší rozdíly projevují v objemu postranních řetězců (minimálně 1,3-

násobný rozdíl je u 10 záměn). Ke změně polární skupiny na nepolární dochází jen u tří substitucí a změna náboje nastává v pěti případech. Žádná substituce nevede ke změně ve všech třech sledovaných vlastnostech naráz, dokonce ani v jednom případě není nahrazena aminokyselina s hydrofóbním postranním řetězcem aminokyselinou s nabitým postranním řetězcem nebo naopak. Jediná substituce ležící ve vazebné oblasti (S324N; viz výše) je ve svých vlastnostech také poměrně konzervativní, protože jak serin, tak asparagin mají oba polární nenabité postranní řetězce, které se liší pouze ve velikosti (1,34 x). Na pozici 247 (tedy ve vzdálenosti 14 AK před vazebnou oblastí) došlo k záměně leucinu za prolin, což sice nepřináší změnu v náboji či hydrofobii, ale prolin by svou cyklickou konformací mohl ovlivnit strukturu proteinu v daném místě. Nedaleko vazebného místa (-22 AK) leží substituce A239T, tedy záměna malého hydrofóbního alaninu za 1,31 krát větší polární threonin. Další substituce T216M ústí také ve změnu velikosti a především polarity postranního řetězce se nachází už dál od vazebného místa (-45 AK). Nejzásadnější změny vlastností aminokyselin představují náhrada hydrofóbního leucinu za 1,91 x menší polární serin a kladně nabitého argininu za 1,74 x menší nenabité threonin. První z nich leží v N-koncové části TLR1 skoro 150 aminokyselin od vazebného místa a druhá v intraceluární části před TIR doménou.

Tabulka 8.3: Záměny v TLR1, jejich lokalizace ve struktuře a změna fyzikálních a chemických vlastností postranních řetězců aminokyselin (Hvězdičkou označena záměna ležící ve vazebné doméně; velikost vyjádřena podílem objemu většího postranního řetězce ku menšímu a směr této změny slovně; Zamyatnin 1984)

SNP	Lokalizace	Změna vlastností AK		
		Velikost 2. AK	Polarita	Náboj
T65N	LRR1 variabilní	1,02 x větší	obě polární	obě nenabitě
L112S	LRR3 variabilní	1,91 x menší	hydrofóbní → polární	obě nenabitě
R153Q	LRR5 konzervativní	1,39 x menší	obě polární	kladně nabitá → nenabitá
R206H	LRR7 variabilní	1,32 x menší	obě polární	obě kladně nabitě
T216M	LRR8 konzervativní	1,42 x větší	polární → hydrofóbní	obě nenabitě
A239T	LRR8 variabilní	1,31 x větší	hydrofóbní → polární	obě nenabitě
L247P	LRR8 variabilní	1,36 x menší	obě hydrofóbní	obě nenabitě
S324N*	LRR11 variabilní	1,34 x větší	obě polární	obě nenabitě
V450I	LRR17 konzervativní	1,2 x větší	obě hydrofóbní	obě nenabitě
Q471E	LRR17 variabilní	1,1 x menší	obě polární	nenabitá → záporně nabitá
Q530R	CT-LRR	1,39 x větší	obě polární	nenabitá → kladně nabitá
R566K	CT-LRR	1,19 x menší	obě polární	obě kladně nabitě
R614T	IC před TIR	1,74 x menší	obě polární	kladně nabitá → nenabitá
Q668R	βB list v TIR	1,39 x větší	obě polární	nenabitá → kladně nabitá

8.1.3 Alelická variabilita v *Tlr2*

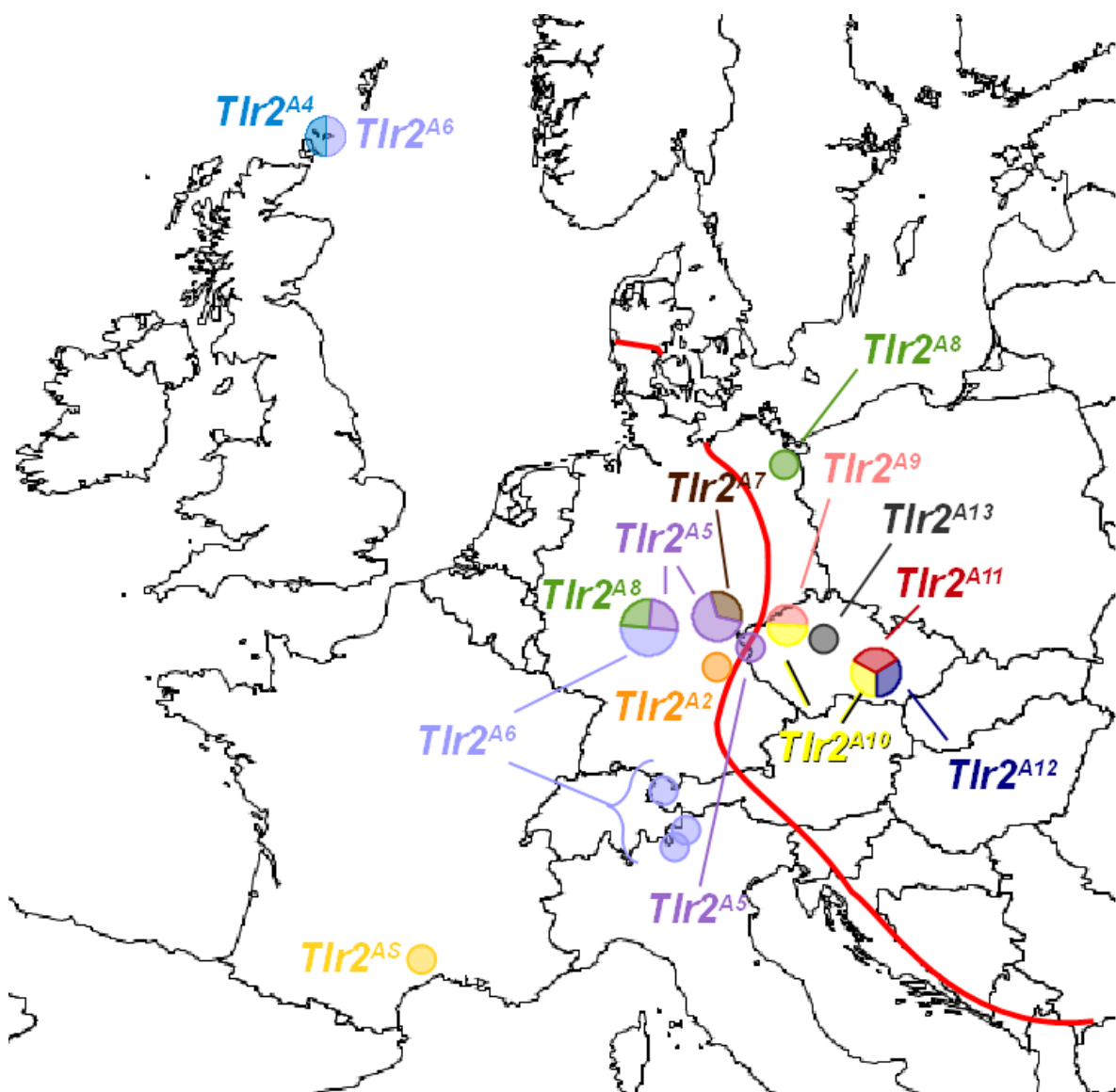
V CDS *Tlr2* bylo u 24 linií *M. musculus* nalezeno celkem 25 SNPs (jejich seznam viz tab. P5 v příloze). Ačkoliv bylo v *Tlr2* detekováno méně záměn než v *Tlr1*, alel bylo naopak nalezeno více - 13 (označených *Tlr2*^{A1} až *Tlr2*^{A13}). Alely *Tlr2*^{A1} + *Tlr2*^{A2}, *Tlr2*^{A3} + *Tlr2*^{A4} a *Tlr2*^{A5} + *Tlr2*^{A6} jsou synonymní, a tak translací 13 alel *Tlr2* vznikne 10 variant proteinu (označeny TLR2^A až TLR2^J). Více než polovina alel (8 ze 13) se vyskytuje pouze u jedné linie (viz tab. 8.4). Nejvyšší frekvenci má alela *Tlr2*^{A6} zastoupená u 25 % linií. Druhá nejpočetněji zastoupená alela *Tlr2*^{A5} má frekvenci 16,7 %. Alely *Tlr2*^{A5} a *Tlr2*^{A6} kódují stejnou variantu proteinu, 41,7 % linií tak exprimuje sekvenčně stejný TLR2.

Tabulka 8.4: Linie nesoucí jednotlivé alely Tlr2 a varianty TLR2; (příslušnost linií do skupin vyznačena písmenem v horním indexu [^S = linie M. spretus, ^L = klasická laboratorní linie, ^D = M. m. domesticus, ^M = M. m. musculus, ^H = linie z hybridní populace])

Varianta	Alela	Linie
proteinové		
sekvence		
TLR2 ^A	<i>Tlr2</i> ^{A1}	C57BL6 ^L
	<i>Tlr2</i> ^{A2}	SPLY ^H
TLR2 ^B	<i>Tlr2</i> ^{A3}	AJL, C3ha ^L
	<i>Tlr2</i> ^{A4}	SIT ^D
TLR2 ^C	<i>Tlr2</i> ^{A5}	SCHEFE ^D , SMIL ^H , STLT ^D , STRA ^D
	<i>Tlr2</i> ^{A6}	SFEL ^D , SCHEST ^D , SCHUNT ^D , SIN ^D , SPOS ^D , SUV ^D
TLR2 ^D	<i>Tlr2</i> ^{A7}	STRB ^D
TLR2 ^E	<i>Tlr2</i> ^{A8}	STAIL ^D , SLINT ^M
TLR2 ^F	<i>Tlr2</i> ^{A9}	BULS ^M
TLR2 ^G	<i>Tlr2</i> ^{A10}	BUSNA ^M , STUF ^M ,
TLR2 ^H	<i>Tlr2</i> ^{A11}	STUS ^M
TLR2 ^I	<i>Tlr2</i> ^{A12}	STUP ^M
TLR2 ^J	<i>Tlr2</i> ^{A13}	PWD ^M
TLR2 ^S	<i>Tlr2</i> ^{A5}	SMON ^S

Rozdělení alel mezi poddruhy není tak jednoznačné jako u *Tlr1*, protože alelu *Tlr2*^{A8} spolu sdílí linie STAIL z poddruhu *M. m. domesticus* a linie SLINT z poddruhu *M. m. musculus* (viz tab. 8.4). Linie SMIL z hybridní populace má alelu *Tlr2* společnou s liniemi *M. m. domesticus* na rozdíl od alely *Tlr1*, kterou sdílí s liniemi *M. m. musculus*. Druhá linie pocházející z hybridní populace (SPLY) má jednu z unikátních alel, jejímž překladem ale vznikne proteinová varianta stejná jako u klasické laboratorní linie C57BL6. Dvě další klasické laboratorní linie (AJ a C3Ha) nesou alelu, která není zastoupena v žádné linii pocházející z volné populace. Variantu proteinu ale sdílí s linií SIT z poddruhu *M. m. domesticus*.

Také v případě *Tlr2*, podobně jako u *Tlr1*, mají linie *M. m. domesticus* ze severní Itálie, z Rakouska a středního Německa stejnou alelu (obr. 8.4). Tuto alelu *Tlr2*^{A6} s nimi sdílí také linie SIN z Orknejí na severu Skotska (obr. 8.4). Téměř každá z linií *M. m. musculus* má unikátní alelu *Tlr2* (i variantu TLR2), kromě linií BULS a STUF, které ale pocházejí každá z jiné populace, a výše zmíněné linie SLINT, která sdílí alelu *Tlr2*^{A8} s linií STAIL (*M. m. domesticus*) ze středního Německa (obr. 8.4). Z fylogenetického stromu (obr. 8.5) je vidět, že tato alela patří mezi alelely poddruhu *M. m. musculus*.

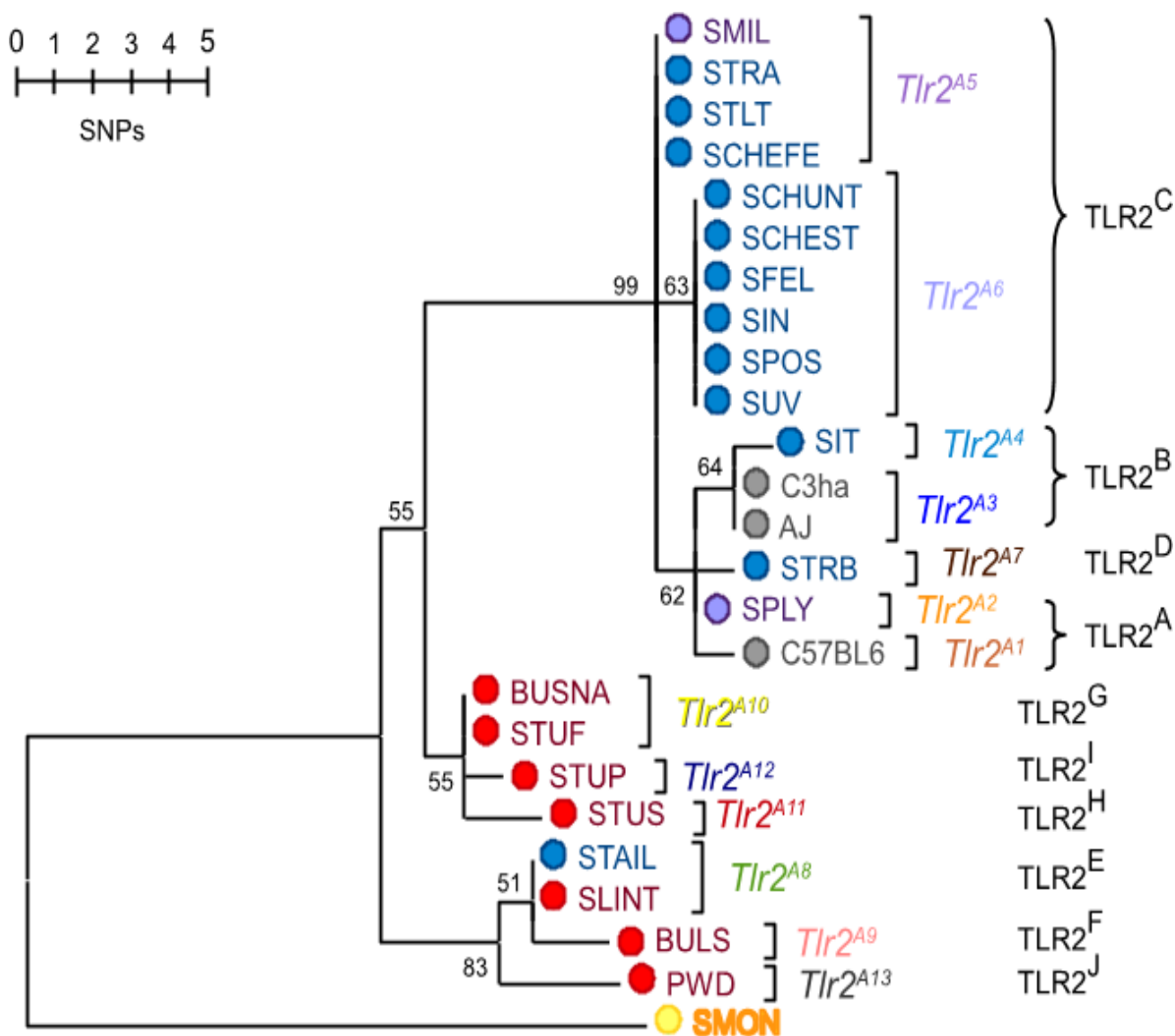


Obrázek 8.4: Geografické rozložení jednotlivých alel *Tlr2* podle původu linií

(Velikost kruhu proporčně odpovídá počtu linií, které z dané lokality pocházejí; alely se stejnou variantou proteinové sekvence znázorněny odstíny jedné barvy; přibližná poloha hybridní zóny vyznačena červenou linií, upraveno podle Macholán et al., 2012)

Podle fylogeneze *Tlr2* (obr. 8.5) to vypadá, že se nejprve oddělila jedna skupina alel $Tlr2^{A8}$, $Tlr2^{A9}$ a $Tlr2^{A13}$ poddruhu *M. m. musculus* (BT = 83 %) a pak teprve druhá skupina alel $Tlr2^{A10}$, $Tlr2^{A11}$ a $Tlr2^{A12}$ *M. m. musculus* od velké skupiny alel nesených liniemi *M. m. domesticus* (BT = 55 %). Do této poslední velké skupiny spadají také alely *Tlr2* klasických laboratorních linií použitých v této práci (AJ, C57BL6 a C3ha) a obou linií pocházející z hybridních populací. První skupina alel *M. m. musculus* ($Tlr2^{A8}$, $Tlr2^{A9}$ a $Tlr2^{A13}$) se vzájemně liší v průměru o 4 SNPs, druhá skupina ($Tlr2^{A10}$, $Tlr2^{A11}$ a $Tlr2^{A12}$) o 2 SNPs a

skupina alel *M. m. domesticus* o 2,10 SNPs. Vzájemně se obě skupiny alel *M. m. musculus* odlišují průměrně o 7,89 SNPs a od skupiny alel *M. m. domesticus* se liší o 13,90 resp. 9,57 SNPs. Alela linie SMON (*Tlr2^{AS}*) se od jednotlivých alel myši domácí liší o 27 až 33 SNPs, přičemž je postavena blíže k *M. m. musculus* než k *M. m. domesticus*.



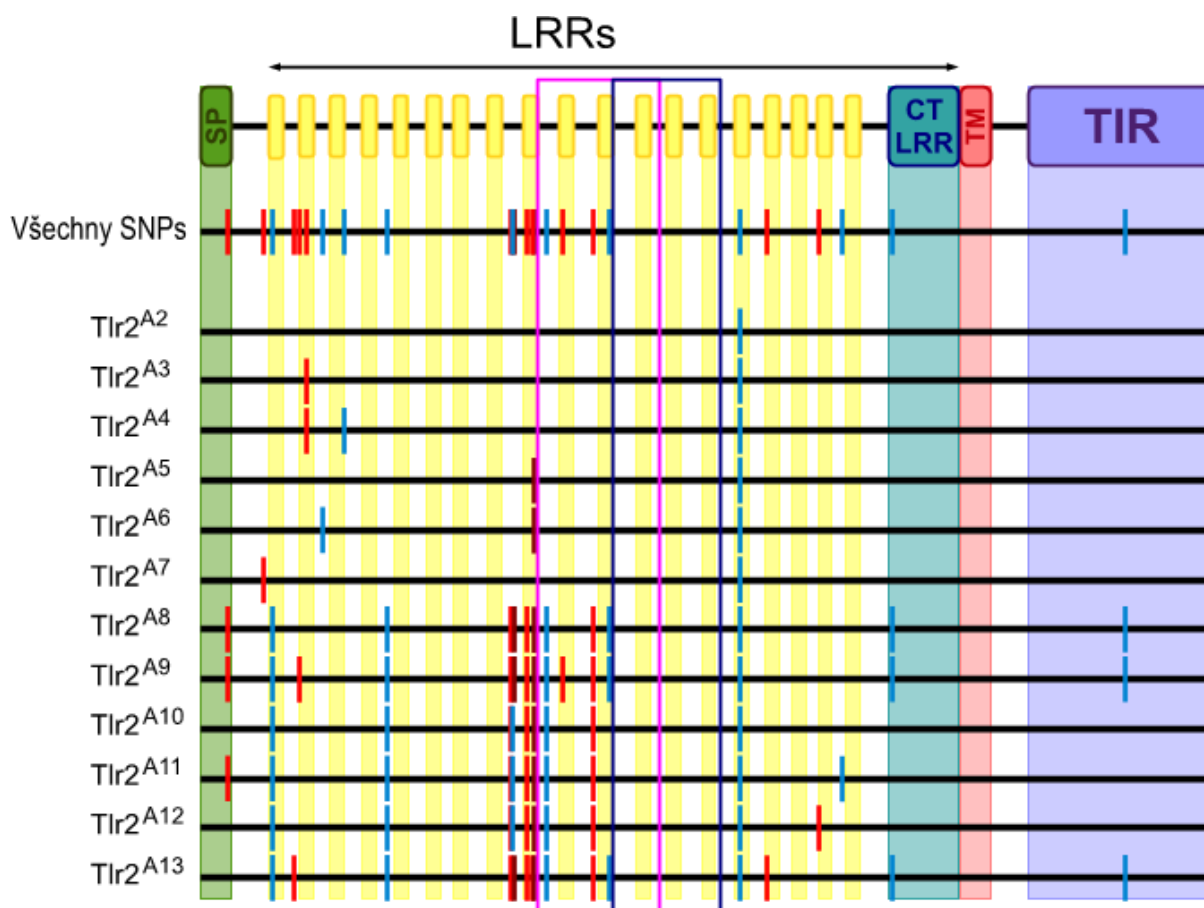
Obrázek 8.5: Fylogenetický strom *Tlr2* u 24 inbredních linií myši domácí a jedné linie myši střeozemní s vyznačenými alelami a variantami proteinové sekvence

(konstruovaný metodou maximum likelihood s 2000 bootstrapy; modrými puntíky označeny linie *M. m. domesticus*, červenými *M. m. musculus*, fialovými linie z hybridní populace, šedými klasické laboratorní linie a žlutým linie myši střeozemní)

8.1.4 Variabilita v aminokyselinové sekvenci TLR2

Ze všech 25 SNPs v *Tlr2* jich je 11 synonymních a 14 nesynonymních. Průměrně tak připadá 4,68 sSNP a 5,95 nsSNPs na 1000 bp. Substituce (především nsSNPs) nejsou v rámci CDS rozloženy rovnoměrně (obr. 8.6). V oblasti kódující extracelulární část TLR2 je

lokalizováno 10 sSNPs (tj. 5,92 sSNP/1000 bp) a všechny nsSNPs (8,29 nsSNPs/1000 bp), oproti tomu ve zbytku sekvenční kódující transmembránovou a intracelulární část TLR2 se nachází pouze 1 sSNPs (1,69 sSNPs/1000 bp). Ani v samotné extracelulární části TLR2 není rozmístění SNPs rovnoměrné (viz obr. 8.6). V prvních 82 AK leží 5 nsSNPs, následuje oblast dlouhá téměř 160 aminokyselin bez žádného nsSNP a poté je v úseku 20 AK těsně před vazebnou oblastí (Kang et al., 2006) lokalizováno 5 nsSNPs. V oblasti vazby ligandu leží dva nsSNPs, zatímco v oblasti dimerizace žádný. Na zbývajících 186 AK extracelulární oblasti připadají 2 nsSNPs. Všechny substituce ve vazebné doméně a těsně před ní je typických pro alely poddruhu *M. m. musculus* (s výjimkou G258S, který se objevuje i v TLR2^C z *M. m. domesticus*).



Obrázek 8.6: SNPs v TLR2 a jejich výskyt v jednotlivých alelách (modře značeny synonymní, červeně a bordově nesynonymní SNPs ; SP = signální peptid; TM = transmembránová doména; LRRs = leucine-rich repeats; TIR = signální TIR doména; růžový obdélník = oblast vazby ligandu, modrý obdélník = oblast dimerizace, Jin et al., 2007, Kang et al., 2006).

Oba nsSNPs ve vazebné oblasti vedou k poměrně velkým změnám vlastností postranního řetězce: v první z těchto záměn je na pozici 280 nahrazen polární nenabitý serin skoro dvakrát větším hydrofóbním leucinem, ve druhé je na pozici 304 také serin substituován 2,29x větším kladně nabitým argininem (tab. 8.5). Z pěti nsSNPs lokalizovaných těsně před vazebnou oblastí, u R257Q se mění velikost a náboj, u G258S a P243S velikost a hydrofobia, u P241A pouze velikost a K252R je poměrně konzervativní. Vůbec největší změnu vlastností představuje R21G lokalizovaná v signálním peptidu, kdy dochází ke změně polárního kladně nabitého argininu za 3,42x menší hydrofóbní glycin. Změna argininu za hydrofóbní aminokyselinu (v tomto případě leucin) nastává také 77 aminokyselin za dimerizační oblastí (R478L). Arginin je substituován také na pozici 73, a to polárním nenabitým glutaminem, tudíž polarita postranního řetězce je zachována a dochází ke změně náboje. Velikost postranního řetězce při zachování ostatních dvou sledovaných vlastností se mění 2,37x při substituci G49V a 1,34x při N77S. Na dvou místech (82 a 438) dochází k záměně isoleucinu za methionon, přičemž oba mají velmi podobné vlastnosti, pokud jde o velikost, polaritu a náboj.

Tabulka 8.5: Záměny v TLR2, jejich lokalizace ve struktuře a změna fyzikálních a chemických vlastností postranních řetězců aminokyselin (Hvězdičkou označeny záměny ležící ve vazebné doméně; velikost vyjádřena podílem objemu většího postranního řetězce k menšímu a směr této změny slovně, (Zamyatnin, 1984)

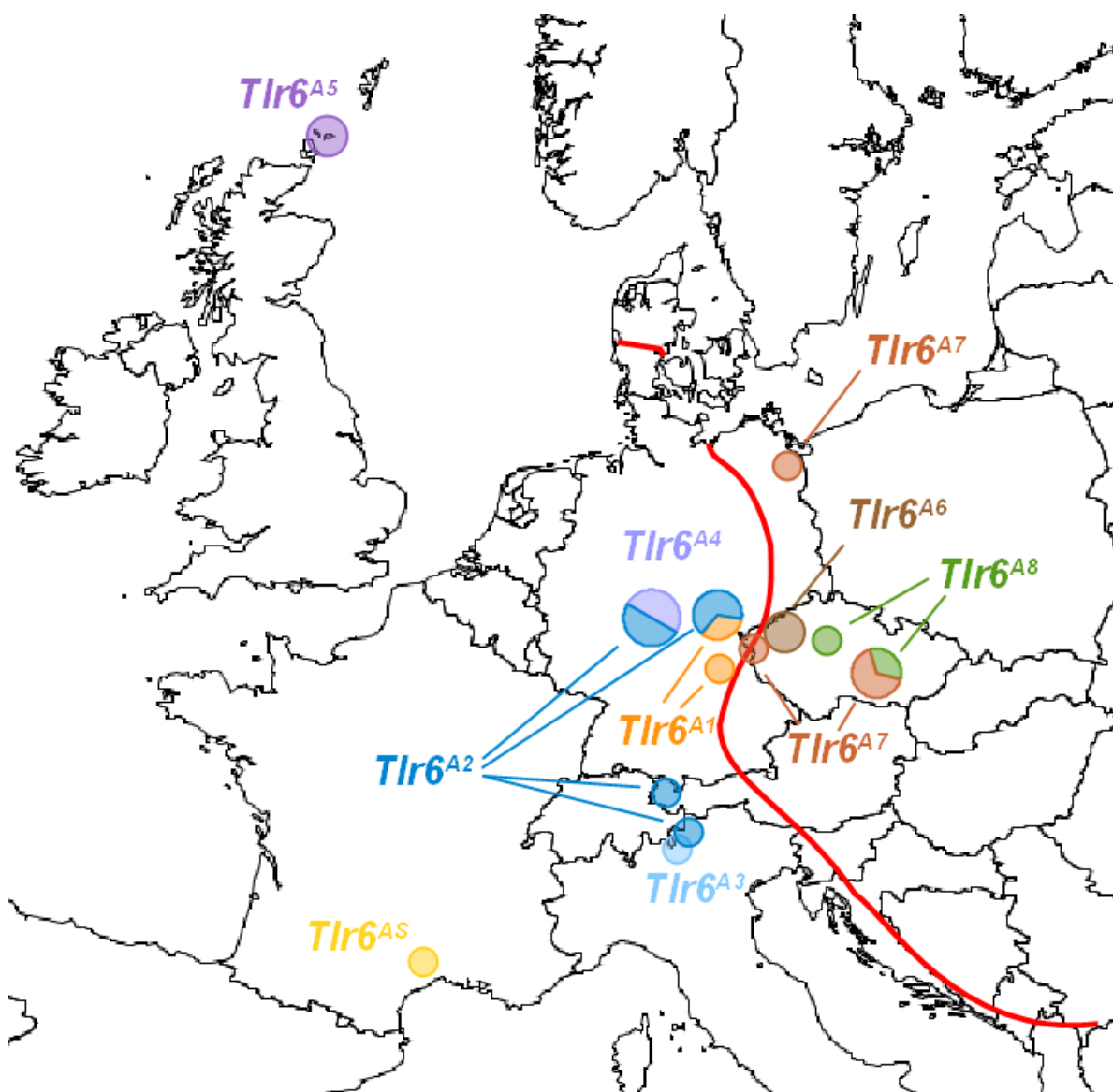
SNP	Lokalizace	Změna vlastností AK		
		Velikost 2. AK	Polarita	Náboj
R21G	SP	3,42 x menší	polární→ hydrofóbní	kladně nabitá → nenabitá
G49V	Před LRR1	2,37 x větší	obě hydrofóbní	obě nenabité
R73Q	LRR1 variabilní	1,39 x menší	obě polární	kladně nabitá → nenabitá
N77S	LRR2 konzervativní	1,34 x menší	obě polární	obě nenabité
M82I	LRR2 konzervativní	1,02 x větší	obě hydrofóbní	obě nenabité
P241A	LRR8 variabilní	1,4 x menší	obě hydrofóbní	obě nenabité
P243S	LRR8 variabilní	1,4 x menší	hydrofóbní → polární	obě nenabité
K252R	LRR9 konzervativní	1,19 x větší	obě polární	obě kladně nabité
R257Q	LRR9 konzervativní	1,39 x menší	obě polární	kladně nabitá → nenabitá
G258S	LRR9 konzervativní	1,49 x větší	hydrofóbní → polární	obě nenabité
S280L*	LRR10 konzervativní	1,91 x větší	polární → hydrofóbní	obě nenabité
S304R*	LRR10 variabilní	2,29 x větší	obě polární	nenabitá → kladně nabitá
M438I	LRR16 konzervativní	1,02 x větší	obě hydrofóbní	obě nenabité
R478L	LRR17 variabilní	1,2 x menší	polární→ hydrofóbní	kladně nabitá → nenabitá

8.1.5 Alelická variabilita v *Tlr6*

V CDS *Tlr6* jsem u linií myši domácí zahrnutých do této studie našla celkem 22 SNPs (jejich seznam viz tab. P6 v příloze) a 8 alel (označených *Tlr6*^{A1} až *Tlr6*^{A8}), které jsou translatovány do pěti sekvenčních variant TLR2 (TLR6^A až TLR6^E). Žádná z alel se nevyskytuje zároveň u linie *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* (viz tab. 8.6). Všechny tři klasické laboratorní linie (AJ, C57BL6 a C3ha) mají alelu *Tlr6*^{A1}, kterou sdílí s linií STRB z poddruhu *M. m. domesticus* a linií SPLY odvozenou z hybridní populace. Druhá linie pocházející z hybridní populace (SMIL) má alelu *Tlr6* nesenou liniemi *M. m. musculus*. Kromě alely *Tlr6*^{A3} jsou všechny alely zastoupeny alespoň u dvou linií. S největší frekvencí, 25 %, se u linií vyskytuje alela *Tlr6*^{A2}, kterou disponují linie pocházejících ze 4 různých lokalit. Na rozdíl od *Tlr1* a *Tlr2*, mají linie SIN a SIT ze severu Skotska unikátní alelu *Tlr6*^{A5}, která je ale odlišena pouze sSNPs od alely *Tlr6*^{A4} linií SCHUNT a STAIL ze středního Německa (obr. 8.7). Pět ze sedmi linií *M. m. musculus* má stejnou variantu proteinu kódovanou u nich dvěma různými alelami. Pouze dvě linie *M. m. musculus* (STUP a PWD) nesou jinou variantu TLR6.

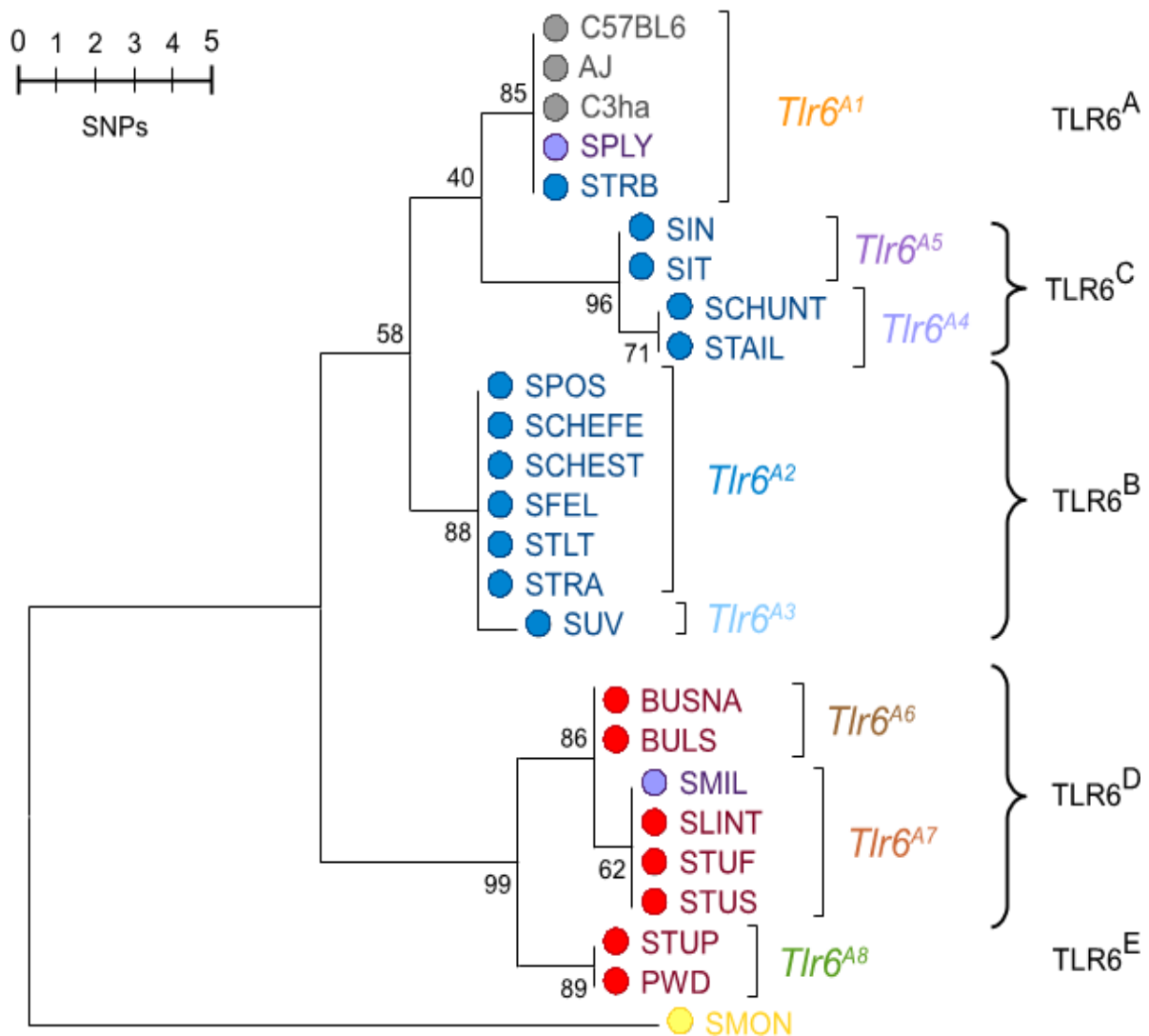
Tabulka 8.6: Linie nesoucí jednotlivé alely *Tlr6* a varianty TLR6; (příslušnost linií do skupin vyznačena písmenem v horním indexu [^S = linie *M. spretus*, ^L = klasická laboratorní linie, ^D = *M. m. domesticus*, ^M = *M. m. musculus*, ^H = linie z hybridní populace])

Varianta	proteínové	Alela	Linie
sekvence			
TLR6 ^A	<i>Tlr6</i> ^{A1}	AJ ^L , C3ha ^L , C57BL6 ^L , SPLY ^H , STRB ^D	
TLR6 ^B	<i>Tlr6</i> ^{A2}	SCHEFE ^D , SCHEST ^D , SFEL ^D , SPOS ^D , STLT ^D , STRA ^D	
	<i>Tlr6</i> ^{A3}	SUV ^D	
TLR6 ^C	<i>Tlr6</i> ^{A4}	SCHUNT ^D , STAIL ^D	
	<i>Tlr6</i> ^{A5}	SIN ^D , SIT ^D	
TLR6 ^D	<i>Tlr6</i> ^{A6}	BULS ^M , BUSNA ^M	
	<i>Tlr6</i> ^{A7}	SMIL ^H , SLINT ^M , STUF ^M , STUS ^M	
TLR6 ^E	<i>Tlr6</i> ^{A8}	PWD ^M , STUP ^M	
TLR6 ^S	<i>Tlr6</i> ^{A5}	SMON ^S	



Obrázek 8.7: Geografické rozložení jednotlivých alel *Tlr6* podle původu linií (Velikost kruhu proporčně odpovídá počtu linií, které z dané lokality pocházejí; alely se stejnou variantou proteinové sekvence znázorněny odstíny jedné barvy; přibližná poloha hybridní zóny vyznačena červenou linií, upraveno podle Macholán et al., 2012)

Alely *Tlr6* jsou na poddruhy rozděleny také ve fylogenetickém stromě (obr. 8.8), který obsahuje jednu skupinu alel *M. m. domesticus* (BT = 58 %) a jednu skupinu alel *M. m. musculus*, (BT = 99 %). Skupina alel *M. m. domesticus* se mezi sebou liší průměrně o 5,2 SNPs, skupina alel *M. m. musculus* o 3,33 SNPs a vzájemně se odlišují v průměru o 13,53 SNPs. Alela *Tlr6^{AS}* linie SMON se od alel myši domácí liší o 27 až 32 SNPs a podobnější je alelám *M. m. domesticus*.



Obrázek 8.8: Fylogenetický strom *Tlr6* u 24 inbredních linií myši domácí a jedné linie myši středozevní s vyznačenými alelami a variantami proteinové sekvence

(konstruovaný metodou maximum likelihood s 2000 bootstrapy; modrými puntíky označeny linie *M. m. domesticus*, červenými *M. m. musculus*, fialovými inie z hybridní populace, šedými klasické laboratorní linie a žlutým linie myši středozevní)

8.1.6 Variabilita v aminokyselinové sekvenci TLR6

Skupina 22 SNPs nalezených v *Tlr6* u daných linií myši domácí zahrnuje 14 sSNPs a 8 nsSNPs. V průměru tak připadá 5,79 sSNPs a 3,31 nsSNPs na 1000 bp sekvence. Jedenáct sSNPs a pět nsSNPs leží v extracelulární části TLR2 (viz tab. 8.7), průměr tam tedy činí 6,59 sSNPs a 3,00 nsSNPs na 1000 bp. Ve zbytku CDS se nachází po 3 sSNPs a nsSNPs (4,74 sSNPs resp. nsSNPs/1000 bp). Z těchto tří intracelulárních nsSNPs leží jeden v TIR doméně, jeden před ní a poslední za ní. Pět extracelulárních nsSNPs je lokalizováno poměrně daleko od vazebné a dimerizační oblasti, tři leží více než 150 AK před ní, zbylé dva skoro 100 AK za ní. Dva SNPs nejbližší k vazebné a dimerizační oblasti (první na

pozici 175, tj. 152 AK před ní a druhý na pozici 499, tj. 98 AK za ní) jsou oba poměrně konzervativní záměny leucinu za fenylalanin. Také dvě záměny před a za TIR doménou (L644V a L798V) nemění vlastnosti postranního řetězce. Na dvou místech (124 a 543) je polární nenabitý glutamin substituován za 1,39 krát menší kladně nabitý arginin. Při záměně C129G dochází pouze ke změně velikosti postranního řetězce při zachování hydrofóbnosti a při záměně A709S v TIR doméně k substituci hydrofóbní za polární nenabitou, ale téměř stejně velkou aminokyselinu.

Tabulka 8.7: Záměny v TLR6, jejich lokalizace ve struktuře a změna fyzikálních a chemických vlastností postranních řetězců aminokyselin (velikost vyjádřena podílem objemu většího postranního řetězce ku menšímu a směr této změny slovně; Zamyatnin 1984)

SNP	Lokalizace	Změna vlastností AK		
		Velikost 2. AK	Polarita	Náboj
Q124R	LRR3 variabilní	1,39 x menší	obě polární	kladně nabitá → nenabitá
C129G	LRR3 variabilní	1,87 x menší	obě hydrofóbní	obě nenabité
L175F	LRR5 variabilní	1,14 x větší	obě hydrofóbní	obě nenabité
L499F	LRR18 variabilní	1,14 x větší	obě hydrofóbní	obě nenabité
Q543R	CT-LRR	1,39 x menší	obě polární	kladně nabitá → nenabitá
L644V	IC před TIR	1,2 x menší	obě hydrofóbní	obě nenabité
A709S	βC list v TIR	1x	hydrofóbní → polární	obě nenabité
L798V	IC za TIR	1,2 x menší	obě hydrofóbní	obě nenabité

8.1.7 Analýza selekce a rekombinace

V CDS *Tlr1* byl na základě nukleotidové sekvence předpovězen zlom na pozici 1800 ($\Delta AICc = 4,23$), který byl potvrzen také KH testem s $p < 0,001$. V CDS *Tlr2* nebyl nalezen žádný rekombinační zlom. V CDS *Tlr6* byl sice nalezen zlom na místě 1572 ($\Delta AICc = 10,28$) pomocí analýzy GARD, ten ale nebyl potvrzen KH testem (pro LKH $p = 0,068$, RKH $p = 0,014$). Analýza jednobodových zlomů (Single breakpoint analysis; SBP) ale tento zlom našla s podporou 99,84%. Testem selekce IFEL nebyla v *Tlr1* a *Tlr2* nalezena žádná místa pod selekcí, oproti tomu v *Tlr6* byl detekován jeden signifikantně negativně selektovaný kodón (128, $p = 0,038$) a další čtyři marginálně nesignifikantní negativně selektované kodóny (373, $p = 0,076$; 676 $p = 0,087$; 723, $p = 0,088$, 749 $p = 0,068$).

8.2 Funkční analýza

Ve funkční studii byla změřena produkce IL-1 β , IL-12 a NO peritoneálními makrofágy po stimulaci vybranými ligandy TLR1, TLR2 a TLR6. Explorativní analýza pomocí krabicových diagramů ukázala, že jednotlivé linie se liší v produkci IL-1 β , IL-12 a NO (viz obr. P7 v příloze). Míry produkce IL-1 β , IL-12 a NO v závislosti na jednotlivé ligandy TLR1, 2 a 6 vzájemně korelují (ve všech případech s $p < 0,05$), mohli jsme proto pro redukci komplexity modelů nahradit produkci IL-1 β , IL-12 a NO pro jednotlivé ligandy jejich první hlavní komponentou z PCA (IL1PC1, IL12PC1 a NOPC1). Produkce NO byla signifikantně závislá na inbrední linii a věku myši a na várce, ve které byla zpracována a na interakcích mezi linií a várkou a věkem a várkou (tab. 8.8). Míra produkce IL-1 β je vysvětlena pomocí modelu zahrnujícího linii, várku, věk a interakce linie s várkou a věkem (tab. 8.9). U IL-12 se ani Box-Coxovou transformací nepodařilo dosáhnout normálního rozdělení reziduálů MAM, byl proto z této analýzy vyloučen. Problém pravděpodobně představuje příliš velký poměr podlimitních měření IL-12 (až 60 % pro některé ligandy), se kterými se daná statistika nedokázala vyrovnat.

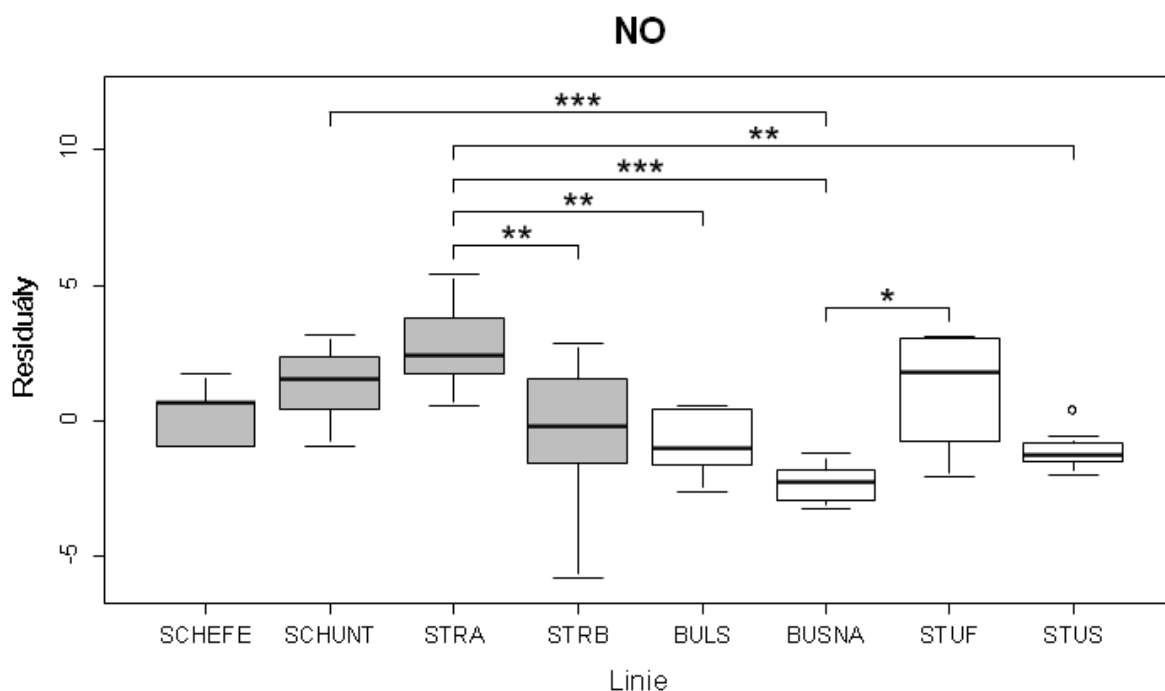
Tabulka 8.8: Minimální adekvátní model (MAM) pro vysvětlení hlavní komponenty produkce NO napříč ligandy (NOPC1); $n = 59$, $df = 27/54$, $F = 10,031$ $p << 0,001$.

Proměnná	Df	F	p
NOPC1			
Linie	17/49	6,33	<< 0,001
Várka	14/46	2,16	0,036
Věk	3/35	6,51	0,002
Linie : várka	12/44	2,46	0,021
Věk : várka	2/34	3,81	0,033

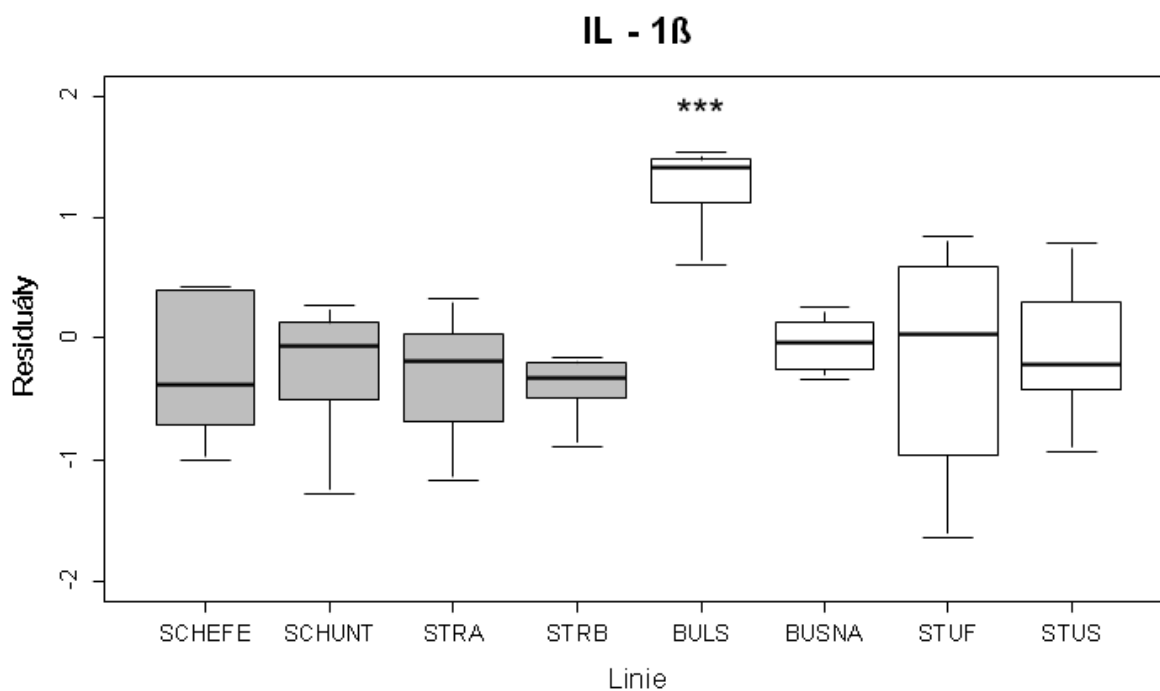
Tabulka 8.9: Minimální adekvátní model pro vysvětlení Box-Cox transformované hlavní komponenty produkce IL-1 β napříč ligandy (bcIL1PC1); $n = 59$, $df = 22/54$, $F = 6,0345$ $p \ll 0,001$.

Proměnná	Df	F	p
bcIL1PC1			
Linie	24/51	6,90	$\ll 0,001$
Várka	12/39	7,15	$\ll 0,001$
Věk	8/35	2,60	0,030
Linie : várka	10/37	3,46	0,005
Linie : věk	7/34	2,94	0,020

Test rozdílů mezi liniemi v produkci NO po stimulaci ligandy TLR1, TLR2 a TLR6 prokázal, že linie STRA^D produkuje signifikantně víc NO než linie BUSNA^M (diff = 5,112; 95% interval spolehlivosti [CI₉₅] = 2,460 - 7,764; $p \ll 0,001$), STUS^M (diff = 3,868; CI₉₅ = 1,129 - 6,607; $p = 0,001$), BULS^M (diff = 3,596; CI₉₅ = 0,944 - 6,249; $p = 0,002$) a STRB^D (diff = 3,210; CI₉₅ = 5,862 - 0,558; $p = 0,008$), linie SCHUNT^D víc než linie BUSNA^M (diff = 3,691; CI₉₅ = 1,128-6,253; $p < 0,001$) a linie STUF^M víc než linie BUSNA^M (diff = 3,462; CI₉₅ = 0,324 - 6,600; $p = 0,021$), viz obr. 8.9. V produkci IL-1 β po stimulaci ligandy TLR1, TLR2 a TLR6 se od všech ostatních linií signifikantně odlišuje linie BULS^M (STRB^D: diff = 1,657; CI₉₅ = 0,843 - 2,472; $p \ll 0,001$; STRA^D: diff = 1,603; CI₉₅ = 0,760 - 2,447; $p \ll 0,001$; SCHEFE^D: diff = 1,525; CI₉₅ = 0,596 - 2,454; $p < 0,001$; SCHUNT^D: diff = 1,506; CI₉₅ = 0,691 - 2,321; $p < 0,001$; STUF^M: diff = 1,450; CI₉₅ = 0,452 - 2,448; $p < 0,001$; STUS^M: diff = 1,356; CI₉₅ = 0,513 - 2,199; $p < 0,001$; BUSNA^M: diff = 1,316; CI₉₅ = 0,501 - 2,130; $p < 0,001$), viz obr. 8.10. V produkci NO po stimulaci ligandem TLR4 (LPS) jsou signifikantní rozdíly mezi liniemi SCHUNT^D – BUSNA^M (diff = 22,99; CI₉₅ = 4,06 – 41,91; $p = 0,008$), STRA^D - BUSNA^M (diff = 27,78; CI₉₅ = 8,19 - 47,37; $p = 0,001$) a marginálně nesignifikantní mezi liniemi STRA^D - STUS^M (diff = 19,09; CI₉₅ = 1,15 – 39,32; $p = 0,078$). V produkci IL-1 β po stimulaci LPS nebyly mezi liniemi objeveny žádné signifikantní ($p < 0,05$), ani marginálně nesignifikantní ($0,05 < p < 0,1$) rozdíly.

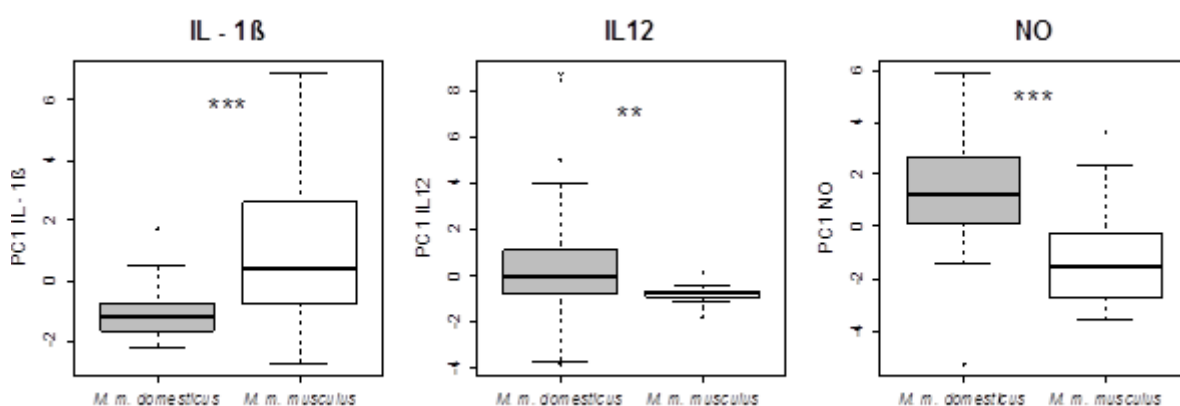


Obrázek 8.9: Krabicový diagram zobrazující rozdíly mezi liniemi v produkci NO po stimulaci ligandy TLR1, 2 a 6 jako závislost reziduí z MAM produkce NO (ochuzeného o vliv linie) na linii. (Šedě označeny linie *M. m. domesticus*, bíle *M. m. musculus*. Signifikance rozdílů značena jako *** pro $p < 0,001$, ** pro $p < 0,01$ a * pro $p < 0,05$)



Obrázek 8.10: Krabicový diagram zobrazující rozdíly mezi liniemi v produkci IL-1 β po stimulaci ligandy TLR1, 2 a 6 jako závislost reziduí z MAM produkce IL-1 β ochuzeného o vliv linie na linii. (Šedě označeny linie *M. m. domesticus*, bíle *M. m. musculus*. Signifikance rozdílů značena jako *** pro $p < 0,001$, ** pro $p < 0,01$ a * pro $p < 0,05$)

Pro ověření, jak se vzájemně liší linie *M. m. domesticus* a *M. m. musculus*, byl proveden Wilcoxonův test vlivu poddruhu na produkci IL-1 β , IL-12 a NO. Bylo zjištěno, že linie *M. m. musculus* po stimulaci ligandy TLR1, 2 a 6 produkuje více IL-1 β ($W = 165$, $p < 0,001$), ale méně IL-12 a NO ($W = 555,5$, $p = 0,003$ pro IL-12 a $W = 632$, $p \ll 0,001$), viz obr. 8.11. K obdobným výsledkům jsme dospěli také otestováním vlivu poddruhu na rezidua z MAM hierarchickou ANOVou po odfiltrování efektu linie (pro IL-1 β : $F = 20,06$; $df = 1$; $p \ll 0,001$, pro NO: $F = 22,12$; $df = 1$; $p \ll 0,001$). Tento test ale nebylo možno provést v případě IL-12, protože ze z výše zmíněných důvodů nebyl nalezen MAM.



Obrázek 8.11: Krabicové diagramy produkce IL-1 β , IL-12 a NO v závislosti na poddruhové příslušnosti testovaných linií. (Šedě označen poddruh *M. m. domesticus*, bíle *M. m. musculus*. Signifikance rozdílů značena jako *** pro $p < 0,001$, ** pro $p < 0,01$ a * pro $p < 0,05$)

9 Diskuze

Cílem mé práce bylo popsat kódující oblasti vybraných TLRs (TLR1, TLR2 a TLR6), stanovit míru genetického polymorfismu a alelickou variabilitu u inbredních linií odvozených z několika geograficky oddělených populací dvou poddruhů myši domácí (*M. m. domesticus* a *M. m. musculus*). V následné funkční analýze jsem hledala v datech pocházejících z experimentů prof. Holáně a jeho skupiny rozdíly mezi těmito liniemi v produkci IL-1 β , IL-12 a NO po stimulaci specifickými ligandy.

U 24 inbredních linií myši domácí bylo u *Tlr1* nalezeno celkem osm alel a šest proteinových variant, u *Tlr2* třináct alel a deset proteinových variant a u *Tlr6* osm alel a pět proteinových variant. Některé linie pocházející z různých míst Evropy spolu sdílí stejné alely. To pravděpodobně znamená, že celkově v evropské populaci nebude velký počet alel a alelická variabilita v liniích, i když limitovaně, odráží přirozený stav. Fylogeneticky jsou alely rozděleny, tak jak by se dalo očekávat podle příslušnosti svých nositelů k poddruhům. Jedinou výjimku tvoří linie *M. m. musculus* PWD, jejíž alela *Tlr1*^{A8} je příbuznější alelám linií *M. m. domesticus* a linie *M. m. domesticus*, STAIL, která nese alelu *M. m. musculus* *Tlr2*^{A8}. V obou případech byl osekvenován ještě jeden nezávislý vzorek pocházející z jiného jedince též linie, aby se vyloučila chyba ve formě záměny vzorku DNA. Jak bylo ukázáno linie PWD obsahuje z 10 % přimíšenou genetickou variabilitu *M. m. domesticus* (Yang et al., 2011). Podle diagnostických SNPs v databázi „Mouse Phylogeny Viewer“ (<http://msub.csbio.unc.edu/>; Wang et al., 2012) jsem však ověřila, že oblast lokusu *Tlr1* linie PWD pochází skutečně z *M. m. musculus*. Začlenění alely *Tlr1*^{A8} linie PWD mezi alely *M. m. domesticus* je tedy poměrně překvapivé. Bližším průzkumem jsem odhalila, že tato alela obsahuje 4 unikátní SNPs a nesdílí s *M. m. musculus* žádný ze SNPs oddělujících oba poddruhy. I vzhledem k tomu, že linie PWD obsahuje alelu *Tlr6*, který je s *Tlr1* ve vazbě, sdílenou s linií STUP poddruhu *M. m. musculus*, se domnívám, že by se mohlo jednat buď o dávnou introgresi nebo o pozůstatek ancestrálního polymorfismu z doby před definitivním oddělením a odlišnou migrací obou poddruhů. Linie STAIL sdílí stejnou alelu *Tlr2*^{A8} s linií SLINT poddruhu *M. m. musculus*. Proto si myslím, že v jejím případě se jedná jednoznačně o introgresi. STAIL je ale teprve mladá inbredizující linie a není dosud zahrnuta v databázi „Mouse Phylogeny Viewer“, takže není možno si ověřit původ jejího *Tlr2* lokusu.

Největší variabilita byla nalezena v CDS *Tlr1* (32 SNPs, z toho 14 nsSNPs, tj.

dN/dS = 0,78), naopak, nejméně byl mezi liniemi variabilní *Tlr6* (22 SNPs, 8 nsSNPs, dN/dS = 0,57). V CDS *Tlr2* bylo detekováno 25 SNPs, z toho 14 nsSNPs (dN/dS = 1,27), *Tlr2* tak je jediný, v jehož sekvenci převládají nsSNPs nad sSNPs. Alely *Tlr1* poddruhu *M. m. domesticus* (včetně alely *Tlr1*^{A8} linie PWD) se od alel poddruhu *M. m. musculus* liší v průměru o 16,6 SNPs, takže jeden SNP připadá na 144 bp. Průměrný rozdíl mezi alelami *Tlr2* *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* je 11,7 SNP. To znamená, že jeden SNP vychází na 201 bp. Alely *Tlr6* obou poddruhů se od sebe liší v průměru o 13,5 SNP, takže SNP se vyskytuje zhruba každých 179 bp. Průměrný rozdíl mezi *M. m. domesticem* a *M. m. musculem* je jeden SNP na 100 - 200 bp (Ideraabdullah, 2004). Moje výsledky jsou tedy konzistentní s tímto odhadem. Bohužel, v současné době neexistují práce popisující variabilitu *Tlr1*, *Tlr2* a *Tlr6* u divokých ani klasických laboratorních inbredních linií myši domácí. Proto je velice obtížné má data srovnat s jinými studiemi. Určité srovnání nabízí práce Smirnova et al. (2000). Její autoři našli u 35 klasických inbredních linií v genu *Tlr4* 22 SNPs, z čehož bylo 13 nesynonymních. Všechny linie, použité v jejich studii, mají *Tlr4* lokus původem z *M. m. domesticus*. Jedinou výjimkou je linie P/J, která má zrovna v místě *Tlr4* genetickou informaci pocházející z *M. m. musculus* (Wang et al., 2012). Tato linie se od ostatních liší v 11 pozicích, takže jeden SNP rozdílný mezi oběma poddruhy připadá na 228 bp. O trochu menší hustota SNPs v sekvenci *Tlr4*, než *Tlr1*, *Tlr2* a *Tlr6* může být náhodně tím, že se mezi zkoumanými *Tlr4* objevil jenom jeden z *M. m. musculus*, nebo obecně rozdíly ve variabilitě mezi *Tlr4* a *Tlr1*, *Tlr2* a *Tlr6*, nebo i tím, že příměs genetické informace jiných poddruhů (*M. m. musculus* a *M. m. castaneus*) v klasických inbredních linií pochází z japonských myší (*M. m. molossinus* je kříženec výše zmíněných poddruhů; Takada et al., 2013). U lidí byla při srovnání tří populací nalezena největší vnitropopulační diverzita v TLR1, naopak TLR2 byl z těchto tří genů vnitropopulačně nejkonzervativnější (Barreiro et al., 2009).

Nalezené SNPs nejsou v sekvencích jednotlivých *Tlrs* rozloženy rovnoměrně mezi extracelulární a signální doménu, podobně jako ve výše citované studii Smirnové et al. (2000). Téměř všechny nesynonimní substituce leží v extracelulární doméně a v signální TIR doméně se nachází pouze jeden nsSNPs u TLR1 a jeden u TLR6, ale žádný nsSNP nebyl zjištěn u TLR2. To naznačuje dvojí selekční tlak na TLRs a to jednak diverzifikující tlak na adaptaci na různé patogeny a zároveň stabilizující tlak na udržení funkčnosti (Roach et al., 2005). Signální TIR domény jsou obecně velmi konzervativní struktury (Sanghavi et al., 2004; O'Neill and Bowie, 2007) pod purifikující selekcí (Nakajima et al., 2008) a záměny

na mnoha místech, ať už přirozeně se vyskytující v lidské populaci (Lorenz et al., 2000; Etokebe et al., 2010; Ben-Ali et al., 2011) nebo navozené uměle v mutačních studiích (Xu et al., 2000; Tao et al., 2002; Gautam et al., 2006; Qiu et al., 2013) vedou ke snížení nebo i zastavení signalizace. Přesný mechanismus signalizace není dosud znám, ale zdá se, že TLR1 a TLR6 se, na rozdíl od TLR2, nepodílejí na vazbě aptorových proteinů (Xu et al., 2000; Qiu et al., 2013). To by mohl být důvod, proč je TIR doména TLR2 mezi liniemi konzervativnější než TIR domény TLR1 a TLR6.

Na vazbě ligandu se u *Tlr1*, *Tlr2* a *Tlr6* podílejí aminokyseliny ležící v 9. až 12. LRR (Omueti, 2005), přičemž dimerizační rozhraní pro tvorbu heterodimerů TLR2/1 a TLR2/6 leží v oblasti 11. až 14. LRR (Jin et al., 2007; Kang et al., 2009). Mým předpokladem bylo, že nesynonymní a nekonzervativní substituce ve vazebné oblasti, která přichází do kontaktu s pathogenními strukturami, budou pravděpodobněji než jiné SNP důsledkem selekce při koevulci hostitel-parazit. V *Tlr1* byl v tomto místě nalezen jeden nsSNP, v *Tlr6* žádný a nejvíce je v daném místě a jeho okolí variabilní *Tlr2* (2 nsSNPs ve vazebném místě a 5 nsSNPs do 20 aminokyselin před vazebným místem). Ve vazebné doméně TLR1 jsem našla záměnu S324N, která ale nevede k příliš zásadní změně vlastností postranních řetězců aminokyselin. Ve vazebné doméně lidského TLR1 se běžně vyskytují tři záměny S248N, H305L a P315L (v myší sekvenci jim odpovídají 251N, 308H, 318P), ale jen jedna z nich (P315L) má vliv na funkci TLR1 (Omueti et al., 2007; Ben-Ali et al., 2011). Jedná se totiž o pozici podílejší se vazbě TLR2 (Jin et al., 2007). Ve vazebné doméně TLR2 jsem identifikovala dva nsSNPs, jeden z nich (S280L) se nachází pouze v jedné linii (BULS), zatímco ve druhé substituci (S304R) se vzájemně odlišují oba poddruhy. Oba SNPs vedou k výraznějším změnám ve velikosti a v prvním případě zároveň hydrofobicity a ve druhém případě zároveň náboje daného rezidua. Z pěti nsSNPs, přítomných před vazebnou doménou, ve třech se odlišují oba poddruhy. Barreiro et al. (2009) ani Ben-Ali et al. (2011) nenalezli ve vybraných vzorcích lidských populací žádné nsSNPs ve vazebné doméně TLR2 ani v jejím okolí. Tato skutečnost podporuje možnost, že na rozdíl od lidí, u myší dochází mezi poddruhy k diverzifikaci spojené s parazity zprostředkovaným přírodním výběrem. Velká mezi-podruhová diverzita v TLR2 právě v místě vazby ligandu by tedy mohla naznačovat adaptaci na lokální patogeny. Ačkoliv je myš nejpoužívanější model v imunologickém výzkumu, o jejích přirozených patogenech ve volně žijících populacích se toho příliš neví, protože většinou slouží pouze jako modelový druh pro zkoumání lidských nemocí (Keebaugh and Schlenke, 2013). V teprve v

nedávné době byly publikovány studie popisující prevalenci mikrosporidií *Enterocytozoon bieneusi* (Sak et al., 2011), bakterií *Helicobacter* (Wasimuddin et al., 2012) a parazitického prvoka *Cryptosporidium tyzzeri* (Kváč et al., 2013) v přirozených populacích myši domácí napříč hybridní zónou. *Helicobacter* a *Cryptosporidium* jsou kromě jiných PRRs rozpoznávány také prostřednictvím TLR2 (Smith et al., 2003; McDonald et al., 2013). Mechanismus rozpoznávání mikrosporidií dosud není znám, účastní se ho ale MyD88 a naopak TLR4 ne (Zhang et al., 2011). Kváč et al. (2013) zjistili, že každý poddruh myši domácí byl nakažen rozdílným subtypem *Cryptosporidia*. Tato skutečnost podporuje představu o lokálně odlišné koadaptaci genotypů hostitele a parazita v obou poddruzích. Naopak mezi mikrosporidiem a *Helicobacter* nebyl rozdíl (Sak et al., 2011; Wasimuddin et al., 2012).

Patogeny na své hostitele neustále vytvářejí selekční tlak (Marques and Carthew, 2007). Znamky pozitivní selekce působící na TLR1, TLR2 a TLR6 byly nalezeny mezi savci (Areal et al., 2011; (Huang et al., 2011), ptáky (Cormican et al., 2009), primáty (Takaki et al., 2012) a plemeny tura (Jann et al., 2008). V TLRs byla nalezena i místa, která vykazují přímý vztah k fenotypu a lokálním podmínkám, jako např. protizánětlivá substituce I602S v TLR1 pozitivně selektovaná v evropské, ale ne v asijské nebo africké populaci (Barreiro et al., 2009). V mé práci z testu vlivu selekce na jednotlivé pozice v *Tlr1*, *Tlr2* a *Tlr6* vyšel pouze jeden singifikantní výsledek - negativně selektovaný kodón 128 v *Tlr6*. Tento malý počet detekovaných míst pod selekcí je pravděpodobně dán nízkou silou testu při tak malém počtu málo diverzifikovaných sekvencí, jaký jsem měla k dispozici. Poměr dN/dS > 1 v *Tlr2* by ale mohl vypovídat o působení pozitivní selekce na tento gen v rámci druhu *Mus*.

Za účelem testování poddruhových rozdílů v imunologické reaktivitě byly peritoneální makrofágy z vybraných linií inkubovány s ligandy pro TLR1, TLR2 a TLR6 a následně byla změřena produkce IL-1 β , IL-12 a NO. Linie poddruhu *M. m. domesticus* po této stimulaci produkovaly signifikantně více IL-12 a NO a méně IL-1 β . Tyto rozdíly jsou ale především dány efektem linie, kdy v produkci IL-1 β se od všech ostatních linií signifikantně liší linie *M. m. musculus* BULS a i v produkci NO jsou rozdíly mezi liniemi nezávisle na poddruhu (např. linie *M. m. domesticus* STRA a STRB a linie *M. m. musculus* BUSNA a STUF). V produkci IL-1 β po stimulaci LPS se linie BULS od ostatních linií neliší, což by mohlo skutečně naznačovat vliv signalizace specifické pro dráhu TLR1/2/6.

V TLR1 a TLR6 má BULS stejné alely jako jiná testovaná linie BUSNA, ale liší se od ní právě svou alelou pro TLR2, ve kterém má tři záměny (N77S, P243S a S280L). První z těchto SNPs leží sekvenačně daleko od vazebného místa a nemění ani příliš vlastnosti postranního řetězce. P243S je lokalizován těsně před vazebným místem a dochází k substituci velkého strukturně rigidního hydrofóbního prolinu na menší polární serin. Třetí SNP (S280L) leží přímo ve vazebné kapse, sám se přímo na vazbě ligandu nepodílí (Kang 2009), ale vede k poměrně výrazné změně ve velikosti, ale hlavně v hydrofobicitě, což by mohlo mít vliv na signalizaci. Linie STRA, která se liší od čtyř jiných linií v produkci NO, má stejný haplotyp v *Tlr1*, *Tlr2* a *Tlr6* genech jako linie SCHEFE. Mezi SCHEFE a ostatními takové signifikantní rozdíly objeveny nebyly. Navíc se ne tak výrazně, ale taky od některých linií liší i v produkci NO po stimulaci LPS. To naznačuje, že odlišnost linie STRA od ostatních linií patrně nebude souviset s genotypem *Tlr1*, *Tlr2* ani *Tlr6*. Imunitní reakce vyvolávaná MAMPs je složitá kaskáda regulovaná a ovlivnitelná na mnoha stupních (Akira and Takeda, 2004) a odlišnosti mezi liniemi mohou být na kterékoliv z nich. Např. Conner et al. (2008) detekovali u tří inbredních linií pocházejících z poddruhu *M. m. musculus* (dvě z jv. Asie a jedna z Evropy) zvýšenou expresi regulační molekuly IRAK1BP1 po stimulaci TLR2 ligandem LTA. Pro otestování případného vlivu SNPs ve vazebném místě *Tlr2* na signalizaci by bylo potřeba provést experiment s vybranými SNPs na identickém genetickém pozadí.

Závěr

Vrozená imunita hraje při obraně organismu bezesporu srovnatelnou roli jako imunita adaptivní. Tvoří totiž první vlnu imunitní obrany proti nejrůznějším patogenním nákazám, například i tím, že následně aktivuje právě adaptivní část imunity. Proto je její optimální funkce zcela zásadní pro zdárné přežití jedince. TLRs patří mezi receptory, které v tomto procesu plní detekční úlohu, jejich rolí je cizorodé mikrobiální částice včas rozpoznat a spustit odpovídající signální kaskádu. Mnoho studií ukázalo, že jejich optimální „nastavení“ je zásadní pro úspěšnou obranu hostitele proti nejrůznějším chorobám. Na molekulární úrovni u nich probíhá neustálý mikro-evoluční zápas s evolučně se vyvíjejícími mikrobiálními strukturami. Variabilita mikrobiálních struktur tedy může selektovat na variabilitu v imunitních receptorech.

Ve své diplomové práci jsem provedla základní popis genetické variability v TLR1, 2 a 6 u 24 inbredních linií myši domácí. Linie, které jsem osekvenovala, jsou odvozeny především ze zvířat z přirozených geograficky oddělených populací vyskytujících se v Evropě. Zjistila jsem, že se jednotlivé linie v těchto receptorech liší mírou polymorfismu. TLR6 je nejvíce konzervativní, zatímco u TLR2 se nacházejí několik potenciálně významných substitucí v okolí vazebného regionu. To by mohlo naznačovat nezávislou koevoluci TLR2 s patogeny u obou poddruhů. Většina nalezených alel byla sdílena mezi liniemi pouze v rámci jednotlivých poddruhů (vyjma TLR1 u linie PWD, TLR2 u linie STAIL). Zdá se tedy, že co se týče zkoumaných imunitních receptorů, oba poddruhy myši domácí jsou jasně fylogeneticky odděleny. Navíc se jednotlivé linie i poddruhy prokazatelně liší i po funkční stránce. Po stimulaci peritoneálních makrofágů modelovými ligandy specifickými pro TLR2/TLR1 a TLR2/TLR6 byla zjištěna odlišná produkce IL-1 β , IL-12 i NO. Ačkoliv na základě uvedených výsledků nelze jednoznačně vztáhnout polymorfismus ve studovaných receptorech k funkční variabilitě v imunitní odpovědi na ligandy studovaných heterodimerů, výsledky mé molekulárně genetické práce naznačují především potenciální význam polymorfismu TLR2 v koevoluci poddruhů myši domácí s jejich patogeny.

10 Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli dr. Michalu Vinklerovi za cenné rady, znamenité nápady a podnětné připomínky. Zvláštní poděkování si zaslouží za trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi prom. biol. Jaroslavu Piálkovi, protože bez něj a jeho inbredních linií by tato práce nemohla vůbec vzniknout. Je mou milou povinností poděkovat také prof. Vladimíru Holáňovi a dr. Aleně Zajícové a dr. Magdaléně Krulové z jeho týmu za poskytnutí veškerých dat k produkci cytokinů použitých v této práci, za uvedení do problematiky jejich nasbírání a za trpělivé odpovídání na všechny mé dotazy. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem členům oddělení Populační biologie ve Studenci, jmenovitě Dagmar Čížkové, Anně Bryjové, Aleně Fornůskové, Lucie Vlčkové a Haně Bainové, za veškerou pomoc v laboratoři i mimo ni. Obrovský dík si také zaslouží moji rodiče a Marcin za velkou podporu a neutuchající důvěru.

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory grantu GA ČR projekt č. 206/08/0640.

11 Seznam zkratek

zkratka	anglicky
Å	Angstrom
BIC	Bayesian Information Criterion
BSA	Bovine serum albumin
BT	Bootstrap
CDS	Coding DNA Sequence
CMS	Codon Model Selection
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxy-nucleotide-tri phosphates
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GARD	Genetic Algorithms for Recombination Detection
GLMs	Generalised Linear Models
HSD	Honestly significant difference
iFEL	Internal fixed effects likelihood
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IRAKs	IL-1R-associated kinases
JNK	JUN N-terminal kinases
LPS	Lipopolysaccharides
LRRs	Leucine-rich repeats
LTA	Lipoteichoic acid
MAM	Minimum adequate model
MAMPs	Microbe-associated molecular patterns
MAP kinases	Mitogen-activated protein kinases
ML	Maximum likelihood
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nsSNPs	Non-synonymous single nucleotide polymorphisms
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRRs	Pattern-recognition receptors
SBP	Single Breakpoint Recombination
SBP	Single breakpoint analysis
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
sSNPs	Synonymous single nucleotide polymorphisms
TAB	TAK1-binding proteins
TAK1	TGF- β -activated kinase 1
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLRs	Toll-like receptors
TNF	Tumour-necrosis factor
TRAF6	TNF-receptor-associated factor 6

12 Seznam aminokyselin

zkratka	název
A	Alanin
C	Cystein
D	Kyselina asparagová
E	Kyselina glutamová
F	Fenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptofan
Y	Tyrosin

13 Seznam literatury

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.

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.

Anderson, K.V., Bokla, L., and Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791–798.

Baird, S.J.E., Macholán, M. (2012). What can the *Mus musculus musculus*/*M. m. domesticus* hybrid zone tell us about speciation? In Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P. (eds) *Evolution of the House Mouse*. Cambridge University Press, Cambridge

Barreiro, L.B., Ben-Ali, M., Quach, H., Laval, G., Patin, E., Pickrell, J.K., Bouchier, C., Tichit, M., Neyrolles, O., Gicquel, B., et al. (2009). Evolutionary Dynamics of Human Toll-Like Receptors and Their Different Contributions to Host Defense. *PLoS Genet.* 5.

Belloq, J.G., Ribas, A., Baird, S.J.E. (2012). New insights into parasitism in the house mouse hybrid zone. In Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P. (eds) *Evolution of the House Mouse*. Cambridge University Press, Cambridge

Ben-Ali, M., Barbouche, M.-R., Bousnina, S., Chabbou, A., and Dellagi, K. (2004). Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 625–626.

Ben-Ali, M., Corre, B., Manry, J., Barreiro, L.B., Quach, H., Boniotto, M., Pellegrini, S., and Quintana-Murci, L. (2011). Functional characterization of naturally occurring genetic variants in the human TLR1-2-6 gene family. *Hum. Mutat.* 32, 643–652.

Berdeli, A., Celik, H.A., Ozyürek, R., Dogrusoz, B., and Aydin, H.H. (2005). TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 83, 535–541.

Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1–5.

BiMová, B.V., Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., Dufková, P., Laukaitis, C.M., Karn, R.C., Luzynski, K., Tucker, P.K., and Piálék, J. (2011). Reinforcement selection acting on the European house mouse hybrid zone: REINFORCEMENT IN HYBRID ZONE. *Mol. Ecol.* 20, 2403–2424.

Bonhomme, F., Rivals, E., Orth, A., Grant, G.R., Jeffreys, A.J., and Bois, P.R. (2007). Species-wide distribution of highly polymorphic minisatellite markers suggests past and

- present genetic exchanges among house mouse subspecies. *Genome Biol.* 8, R80.
- Bowie, A., and O'Neill, L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* 67, 508–514.
- Campino, S., Behrschmidt, C., Bagot, S., Guénet, J.-L., Cazenave, P.-A., Holmberg, D., and Penha-Gonçalves, C. (2002). Unique Genetic Variation Revealed by a Microsatellite Polymorphism Survey in Ten Wild-Derived Inbred Strains. *Genomics* 79, 618–620.
- Casanova, J.-L., Abel, L., and Quintana-Murci, L. (2011). Human TLRs and IL-1Rs in Host Defense: Natural Insights from Evolutionary, Epidemiological, and Clinical Genetics. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 447–491.
- Chan, S.L., Mukasa, T., Santelli, E., Low, L.Y., and Pascual, J. (2010). The crystal structure of a TIR domain from *Arabidopsis thaliana* reveals a conserved helical region unique to plants. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 19, 155–161.
- Chen, G., Zhuchenko, O., and Kuspa, A. (2007). Immune-like Phagocyte Activity in the Social Amoeba. *Science* 317, 678–681.
- Chinwalla, A.T., Cook, L.L., Delehaunty, K.D., Fewell, G.A., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Graves, T.A., Hillier, L.W., Mardis, E.R., McPherson, J.D., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562.
- Chuang, T.-H., and Ulevitch, R.J. (2001). Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1518, 157–161.
- Delport, W., Poon, A.F.Y., Frost, S.D.W., and Kosakovsky Pond, S.L. (2010a). Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 2455–2457.
- Delport, W., Scheffler, K., Gravenor, M.B., Muse, S.V., and Kosakovsky Pond, S. (2010b). Benchmarking multi-rate codon models. *PloS One* 5, e11587.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T.L., Oswald-Richter, K., Kasprovicz, D.J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., et al. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J. Clin. Invest.* 116, 916–928.
- Dunne, A. (2003). Structural Complementarity of Toll/Interleukin-1 Receptor Domains in Toll-like Receptors and the Adaptors Mal and MyD88. *J. Biol. Chem.* 278, 41443–41451.
- Etokebe, G.E., Skjeldal, F., Nilsen, N., Rodionov, D., Knezevic, J., Bulat-Kardum, L., Espevik, T., Bakke, O., and Dembic, Z. (2010). Toll-like receptor 2 (P631H) mutant impairs membrane internalization and is a dominant negative allele. *Scand. J. Immunol.* 71, 369–381.
- Garantziotis, S., Hollingsworth, J.W., Zaas, A.K., and Schwartz, D.A. (2008). The effect of toll-like receptors and toll-like receptor genetics in human disease. *Annu. Rev. Med.* 59,

343–359.

Gautam, J.K., Ashish, Comeau, L.D., Krueger, J.K., and Smith, M.F. (2006). Structural and Functional Evidence for the Role of the TLR2 DD Loop in TLR1/TLR2 Heterodimerization and Signaling. *J. Biol. Chem.* *281*, 30132–30142.

Guénet, J.L., and Bonhomme, F. (2003). Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet. TIG* *19*, 24–31.

Hasegawa, M., Kishino, H., and Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* *22*, 160–174.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099–1103.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740–745.

Hidmark, A., von Saint Paul, A., and Dalpke, A.H. (2012). Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 2717–2721.

Huang, Y., Temperley, N.D., Ren, L., Smith, J., Li, N., and Burt, D.W. (2011). Molecular evolution of the vertebrate TLR1 gene family--a complex history of gene duplication, gene conversion, positive selection and co-evolution. *BMC Evol. Biol.* *11*, 149.

Ideraabdullah, F.Y. (2004). Genetic and Haplotype Diversity Among Wild-Derived Mouse Inbred Strains. *Genome Res.* *14*, 1880–1887.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* *5*, 987–995.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* *327*, 291–295.

Janeway, C.A., and Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197–216.

Jiang, Z., Georgel, P., Li, C., Choe, J., Crozat, K., Rutschmann, S., Du, X., Bigby, T., Mudd, S., Sovath, S., et al. (2006). Details of Toll-like receptor:adapter interaction revealed by germ-line mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 10961–10966.

Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.-G., Lee, H., and Lee, J.-O. (2007). Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* *130*, 1071–1082.

Johnson, C.M., Lyle, E.A., Omueti, K.O., Stepensky, V.A., Yegin, O., Alpsoy, E., Hamann, L., Schumann, R.R., and Tapping, R.I. (2007). Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 7520–7524.

- Kang, J.Y., and Lee, J.-O. (2011). Structural Biology of the Toll-Like Receptor Family. In *Annual Review of Biochemistry*, Vol 80, R.D. Kornberg, C.R.H. Raetz, J.E. Rothman, and J.W. Thorner, eds. (Palo Alto: Annual Reviews), pp. 917–941.
- Kang, T.J., and Chae, G.T. (2001). Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *31*, 53–58.
- Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.-J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.-G., and Lee, J.-O. (2009). Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* *31*, 873–884.
- Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *11*, 725–732.
- Koblansky, A.A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M.S., Akira, S., Sher, A., and Ghosh, S. (2013). Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* *38*, 119–130.
- Kormann, M.S.D., Depner, M., Hartl, D., Klopp, N., Illig, T., Adamski, J., Vogelberg, C., Weiland, S.K., von Mutius, E., and Kabesch, M. (2008). Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *122*, 86–92, 92.e1–8.
- Kosakovsky Pond, S.L., Frost, S.D.W., Grossman, Z., Gravenor, M.B., Richman, D.D., and Brown, A.J.L. (2006). Adaptation to Different Human Populations by HIV-1 Revealed by Codon-Based Analyses. *PLoS Comput Biol* *2*, e62.
- Krishnegowda, G., Hajjar, A.M., Zhu, J., Douglass, E.J., Uematsu, S., Akira, S., Woods, A.S., and Gowda, D.C. (2005). Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J. Biol. Chem.* *280*, 8606–8616.
- Kutukculer, N., Yeniay, B.S., Aksu, G., and Berdeli, A. (2007). Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor-2 gene in children with recurrent febrile infections. *Biochem. Genet.* *45*, 507–514.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860–921.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J.A. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene *Cassette spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* *86*, 973–983.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2011). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* *40*, D302–D305.
- Leulier, F., and Lemaitre, B. (2008). Toll-like receptors — taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 165–178.
- Little, C.C., and Tyzzer, E.E. (1916). Further experimental studies on the inheritance of

- susceptibility to a Transplantable tumor, Carcinoma (J. W. A.) of the Japanese waltzing Mouse. *J. Med. Res.* 33, 393–453.
- Lorenz, E., Mira, J.P., Cornish, K.L., Arbour, N.C., and Schwartz, D.A. (2000). A Novel Polymorphism in the Toll-Like Receptor 2 Gene and Its Potential Association with Staphylococcal Infection. *Infect. Immun.* 68, 6398–6401.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5598–5603.
- Malhotra, D., Relhan, V., Reddy, B.S.N., and Bamezai, R. (2005). TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. *Hum. Genet.* 116, 413–415.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.
- Misch, E.A., Macdonald, M., Ranjit, C., Sapkota, B.R., Wells, R.D., Siddiqui, M.R., Kaplan, G., and Hawn, T.R. (2008). Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e231.
- Mishra, B.B., Gundra, U.M., and Teale, J.M. (2008). Expression and distribution of Toll-like receptors 11–13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J. Neuroinflammation* 5, 53.
- Mooney, S. (2005). Bioinformatics approaches and resources for single nucleotide polymorphism functional analysis. *Brief. Bioinform.* 6, 44–56.
- Moullia, C. and Joly, P. (2009). Parasitism and hybrid zones. *In: Thomas, F., Guégan, J.-F., and Renaud, F. (eds.). Ecology and Evolution of Parasitism: Hosts to Ecosystems (Oxford Biology) (Oxford University Press, USA), 69 - 82*
- Nakajima, T., Ohtani, H., Satta, Y., Uno, Y., Akari, H., Ishida, T., and Kimura, A. (2008). Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. *Immunogenetics* 60, 727–735.
- O'Neill, L.A.J., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 353–364.
- Offord, V., Coffey, T.J., and Werling, D. (2010). LRRfinder: A web application for the identification of leucine-rich repeats and an integrative Toll-like receptor database. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 1035–1041.
- Ogus, A.C., Yoldas, B., Ozdemir, T., Uguz, A., Olcen, S., Keser, I., Coskun, M., Cilli, A., and Yegin, O. (2004). The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur. Respir. J.* 23, 219–223.
- Omueti, K.O. (2005). Domain Exchange between Human Toll-like Receptors 1 and 6 Reveals a Region Required for Lipopeptide Discrimination. *J. Biol. Chem.* 280, 36616–36625.

Opsal, M.A., Våge, D.I., Hayes, B., Berget, I., and Lien, S. (2006). Genomic organization and transcript profiling of the bovine toll-like receptor gene cluster TLR6-TLR1-TLR10. *Gene* 384, 45–50.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13766–13771.

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786.

Pifer, R., Benson, A., Sturge, C.R., and Yarovinsky, F. (2011). UNC93B1 Is Essential for TLR11 Activation and IL-12-dependent Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 286, 3307–3314.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science* 282, 2085–2088.

Pond, S.L.K., Posada, D., Gravenor, M.B., Woelk, C.H., and Frost, S.D.W. (2006). Automated Phylogenetic Detection of Recombination Using a Genetic Algorithm. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1891–1901.

Qiu, Y., Ding, Y., Zou, L., Tan, Z., Liu, T., Fu, X., and Xu, W. (2013). Divergent Roles of Amino Acid Residues Inside and Outside the BB Loop Affect Human Toll-Like Receptor (TLR)2/2, TLR2/1 and TLR2/6 Responsiveness. *PLoS ONE* 8, e61508.

Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., and Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9577–9582.

Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 588–593.

Ryu, Y.J., Kim, E.J., Koh, W.-J., Kim, H., Kwon, O.J., and Chang, J.H. (2006). Toll-like receptor 2 polymorphisms and nontuberculous mycobacterial lung diseases. *Clin. Vaccine Immunol.* CVI 13, 818–819.

Sanghavi, S.K., Shankarappa, R., and Reinhart, T.A. (2004). Genetic analysis of Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) domain sequences from rhesus macaque Toll-like receptors (TLRs) 1-10 reveals high homology to human TLR/TIR sequences. *Immunogenetics* 56, 667–674.

Schroder, N.W.J. (2003). Lipoteichoic Acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* Activates Immune Cells via Toll-like Receptor (TLR)-2, Lipopolysaccharide-binding Protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 Are Not Involved. *J. Biol. Chem.* 278, 15587–15594.

Schröder, N.W.J., Diterich, I., Zinke, A., Eckert, J., Draing, C., von Baehr, V., Hassler, D.,

- Priem, S., Hahn, K., Michelsen, K.S., et al. (2005). Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by *Borrelia burgdorferi* and protects from late stage Lyme disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 2534–2540.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C.J. (1999). Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2. *J. Biol. Chem.* *274*, 17406–17409.
- Shinkai, H., Tanaka, M., Morozumi, T., Eguchi-Ogawa, T., Okumura, N., Muneta, Y., Awata, T., and Uenishi, H. (2006). Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. *Immunogenetics* *58*, 324–330.
- Sun, J., Wiklund, F., Hsu, F.-C., Bälter, K., Zheng, S.L., Johansson, J.-E., Chang, B., Liu, W., Li, T., Turner, A.R., et al. (2006). Interactions of sequence variants in interleukin-1 receptor-associated kinase4 and the toll-like receptor 6-1-10 gene cluster increase prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *15*, 480–485.
- Suzuki, H., Aplin, P.K. (2012). Phylogeny and biogeography of the genus *Mus* in Eurasia. In Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P. (eds) *Evolution of the House Mouse*. Cambridge University Press, Cambridge
- Swiderek, W.P., Bhide, M.R., Gruszczyńska, J., Soltis, K., Witkowska, D., and Mikula, I. (2006). Toll-like receptor gene polymorphism and its relationship with somatic cell concentration and natural bacterial infections of the mammary gland in sheep. *Folia Microbiol. (Praha)* *51*, 647–652.
- Tabel, Y., Berdeli, A., and Mir, S. (2007). Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children. *Int. J. Immunogenet.* *34*, 399–405.
- Takada, T., Ebata, T., Noguchi, H., Keane, T.M., Adams, D.J., Narita, T., Shin-I, T., Fujisawa, H., Toyoda, A., Abe, K., et al. (2013). The ancestor of extant Japanese fancy mice contributed to the mosaic genomes of classical inbred strains. *Genome Res.* *23*, 1329–1338.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity* *11*, 443–451.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* *13*, 933–940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 10–14.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* *28*, 2731–

2739.

Tao, X., Xu, Y., Zheng, Y., Beg, A.A., and Tong, L. (2002). An extensively associated dimer in the structure of the C713S mutant of the TIR domain of human TLR2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 216–221.

Thomas, F., Guégan, J.-F., and Renaud, F. (2009). *Ecology and Evolution of Parasitism: Hosts to Ecosystems* (Oxford Biology) (Oxford University Press, USA).

Underhill, D.M., Ozinsky, A., Smith, K.D., and Aderem, A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14459–14463.

Venter, J.C. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science* 291, 1304–1351.

Villesen, P. (2007). FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Mol. Ecol. Notes* 7, 965–968.

Wang, J.R., de Villena, F.P.-M., and McMillan, L. (2012). Comparative analysis and visualization of multiple collinear genomes. *BMC Bioinformatics* 13, S13.

Wong, S.H., Gochhait, S., Malhotra, D., Pettersson, F.H., Teo, Y.Y., Khor, C.C., Rautanen, A., Chapman, S.J., Mills, T.C., Srivastava, A., et al. (2010). Leprosy and the Adaptation of Human Toll-Like Receptor 1. *PLoS Pathog.* 6, e1000979.

Xiong, Y., Song, C., Snyder, G.A., Sundberg, E.J., and Medvedev, A.E. (2012). R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88. *J. Biol. Chem.* 287, 38327–38337.

Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J.L., and Tong, L. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408, 111–115.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., and al, et (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324–329.

Yang, H., Wang, J.R., Didion, J.P., Buus, R.J., Bell, T.A., Welsh, C.E., Bonhomme, F., Yu, A.H.-T., Nachman, M.W., Pialek, J., et al. (2011). Subspecific origin and haplotype diversity in the laboratory mouse. *Nat. Genet.* 43, 648–655.

Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., et al. (2005). TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein. *Science* 308, 1626–1629.

Zamyatnin, A.A. (1984). Amino acid, peptide, and protein volume in solution. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 13, 145–165.

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., and Ghosh, S. (2004). A Toll-like Receptor That Prevents Infection by Uropathogenic Bacteria. *Science* 303, 1522–1526.

14 Přílohy

Tabulka P1: SNPs v kódující oblasti Tlr1 inbrední linie myši středozevní (SMON)

Typ SNP	Pozice (bp)
synonymní	G336A, A345G, T390C, A555G, G822A, C1038T, A1194G, G1734C, G1839A, C2223T, T2373C
nesynonymní	C361T, G416C, G508A, G563A, A574G, G1267T, A1315G, G1495C, G1501C, A1711C, G1712A, C1955A

Tabulka P2: SNPs v kódující oblasti Tlr2 inbrední linie myši středozevní (SMON)

Typ SNP	Pozice (bp)
synonymní	G420A, T550C, C594A, C744T, G777C, T954C, G1017A, C1257T, G1422A, G1689A, A1752G, T1794C, C1929T, G1986A, G2181A
nesynonymní	C19T, A466G, G773A, G904A, C1214T, G1780A, C1957T, G2225A

Tabulka P3: SNPs v kódující oblasti Tlr6 inbrední linie myši středozevní (SMON)

TYP SNP	Pozice v CDS (bp)
synonymní	A438G, T1128C, T1137C, A1290G, T1353C, T1506C, C1539T, G1773C, T2196C
nesynonymní	C280A, G499A, G637A, C932T, G940A, T956C, G967A, C1171T, A1750C, G1751A, C1994A, A2036G, A2207G

Tabulka P4: SNPs v Tlr1 (pozice SNP číslována podle pozice v kódující sekvenci; aminokyseliny značeny jednopísmennou zkratkou; EC = extracelulární doména, TM = transmembránová doména, IC = intracelulární doména).

Pozice (bp)	Záměna v kodónu	Záměna v proteinové sekvenci	D o m én a	Výskyt v alelách <i>Tlr1</i>								
				A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	AS	
57	CT <u>T</u> → CT <u>A</u>	synonymní	EC	X								
194	AC <u>T</u> → AA <u>T</u>	T65N	EC			X						
335	TT <u>G</u> → TC <u>G</u>	L112S	EC	X	X	X	X	X	X	X	X	X
458	CG <u>G</u> → CA <u>G</u>	R153Q	EC			X					X	
597	TT <u>C</u> → TT <u>T</u>	synonymní	EC			X						
617	CG <u>T</u> → CA <u>T</u>	R206H	EC								X	
647	AC <u>G</u> → AT <u>G</u>	T216M	EC				X	X	X			
715	G <u>C</u> T → A <u>C</u> T	A239T	EC								X	
740	CT <u>G</u> → CC <u>G</u>	L247P	EC	X	X	X	X	X	X	X	X	X
786	AA <u>T</u> → AA <u>C</u>	synonymní	EC				X					
813	GT <u>T</u> → GT <u>G</u>	synonymní	EC							X		
971	AG <u>T</u> → AA <u>T</u>	S324N	EC			X						
1005	ACA → AC <u>T</u>	synonymní	EC				X	X				
1182	AT <u>C</u> → AT <u>T</u>	synonymní	EC	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1248	AG <u>C</u> → AG <u>T</u>	synonymní	EC				X	X	X			X
1266	TG <u>C</u> → TG <u>T</u>	synonymní	EC							X		
1347	AAA → AA <u>G</u>	synonymní	EC				X	X	X			X
1348	G <u>T</u> C → A <u>T</u> C	V450I	EC				X	X	X			
1411	C <u>A</u> G → G <u>A</u> G	Q471E	EC				X	X	X			
1533	GAT → GA <u>C</u>	synonymní	EC				X	X	X			
1589	CA <u>A</u> → CG <u>A</u>	Q530R	EC	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1647	GT <u>G</u> → GT <u>A</u>	synonymní	EC			X						
1697	AG <u>G</u> → AA <u>G</u>	R566K	EC				X	X	X			X
1719	TT <u>C</u> → TT <u>T</u>	synonymní	EC				X	X	X			
1734	CT <u>A</u> → CT <u>G</u>	synonymní	EC	X	X		X	X	X	X		
1743	GAT → GA <u>C</u>	synonymní	EC				X	X	X			
1800	GG <u>G</u> → GG <u>A</u>	synonymní	TM				X	X	X			
1818	TAC → TA <u>T</u>	synonymní	IC								X	
1841	AG <u>G</u> → AC <u>G</u>	R614T	IC				X					
2003	CA <u>G</u> → CG <u>G</u>	Q668R	IC	X	X							
2292	GAG → GA <u>A</u>	synonymní	IC	X	X	X						

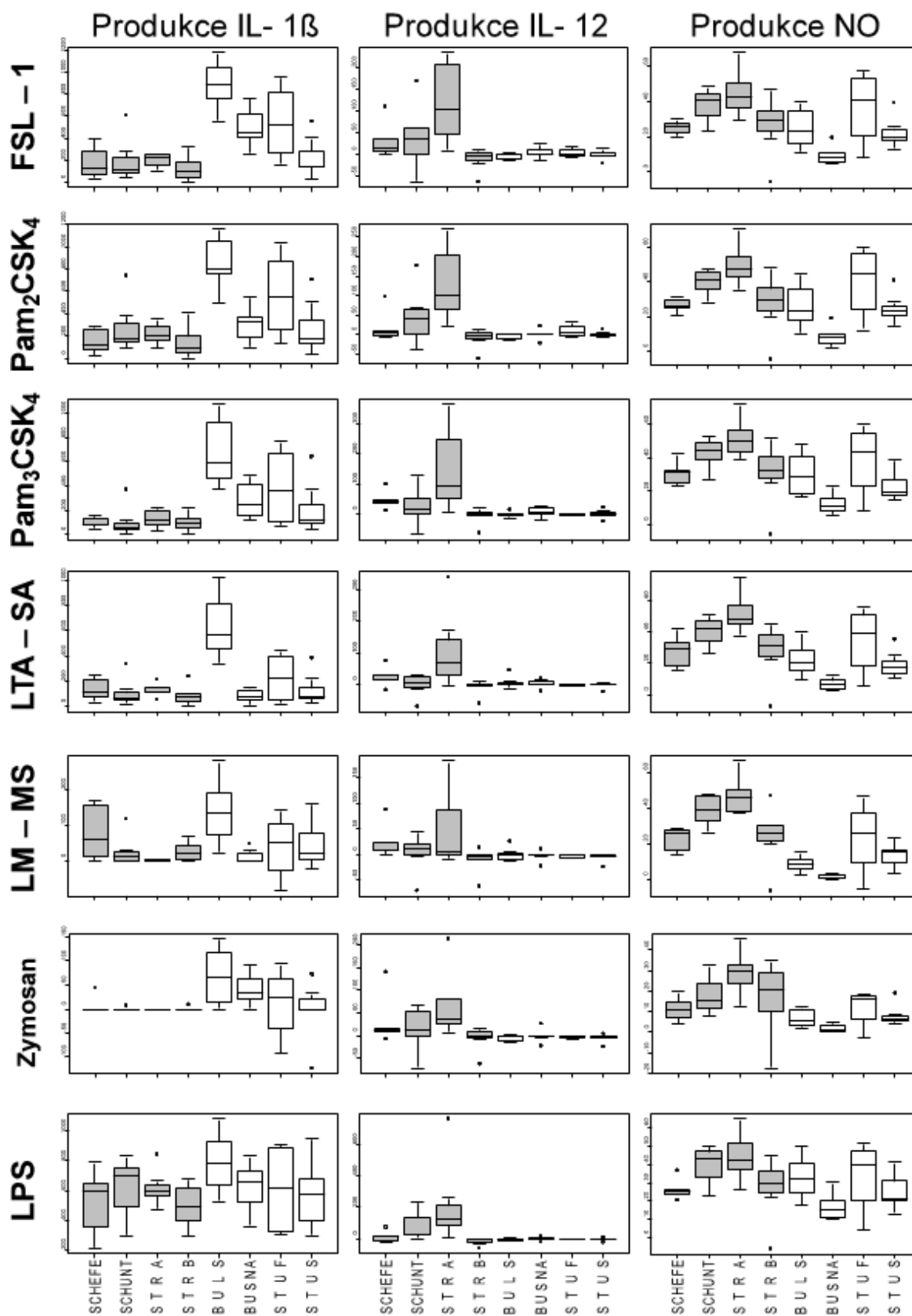
Pozice (bp)	Záměna v kodónu	Záměna v proteínové sekvenci	D o m én a	Výskyt v alelách <i>Tlr1</i>								
				A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	AS	
2370	AC <u>G</u> → AC <u>A</u>	synonymní	IC								X	

Tabulka P5: SNPs v *Tlr2* (pozice SNP číslována podle pozice v kódující sekvenci; aminokyseliny značeny jednopísmennou zkratkou; EC = extracelulární doména, TM = transmembránová doména, IC = intracelulární doména).

Pozice (bp)	Záměna v kodónu	Záměna v proteínové sekvenci	Dom éna	Výskyt v alelách <i>Tlr2</i>														
				A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A1 0	A1 1	A1 2	A1 3	AS		
61	<u>CGC</u> → <u>GGC</u>	R21G	EC								X	X		X		X		
146	<u>GGA</u> → <u>GTA</u>	G49V	EC						X									
165	<u>AAA</u> → <u>AAG</u>	synonymní	EC							X	X	X	X	X	X	X		
218	<u>CGA</u> → <u>CAA</u>	R73Q	EC													X		
230	<u>AAC</u> → <u>AGC</u>	N77S	EC								X							
246	<u>ATG</u> → <u>ATT</u>	M82I	EC		X	X												
282	<u>GAC</u> → <u>GAT</u>	synonymní	EC					X										
333	<u>CAC</u> → <u>CAT</u>	synonymní	EC			X												
432	<u>CTT</u> → <u>CTC</u>	synonymní	EC							X	X	X	X	X	X			
721	<u>CCA</u> → <u>GCA</u>	P241A	EC							X	X	X	X	X	X	X		
723	<u>CCA</u> → <u>CCC</u>	synonymní	EC								X	X	X					
727	<u>CCC</u> → <u>TCC</u>	P243S	EC							X	X					X		
755	<u>AAG</u> → <u>AGG</u>	K252R	EC							X	X	X	X	X	X	X		
770	<u>CGA</u> → <u>CAA</u>	R257Q	EC													X		
772	<u>GGC</u> → <u>AGC</u>	G258S	EC				X	X		X	X	X	X	X	X	X		
804	<u>GAG</u> → <u>GAA</u>	synonymní	EC							X	X	X	X	X	X	X		
839	<u>TCG</u> → <u>TTG</u>	S280L	EC								X							
912	<u>AGC</u> → <u>AGA</u>	S304R	EC							X	X	X	X	X	X	X		
948	<u>AGG</u> → <u>AGA</u>	synonymní	EC							X	X					X		
1251	<u>TCT</u> → <u>TCC</u>	synonymní	EC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
1314	<u>ATG</u> → <u>ATA</u>	M438I	EC													X		
1433	<u>CGG</u> → <u>CTG</u>	R478L	EC											X				
1488	<u>TCG</u> → <u>TCA</u>	synonymní	EC										X					
1605	<u>TTT</u> → <u>TTC</u>	synonymní	EC							X	X					X		
2145	<u>TAC</u> → <u>TAT</u>	synonymní	IC							X	X					X		

Tabulka P6: SNPs v Tlr6 (pozice SNP číslována podle pozice v kódující sekvenci; aminokyseliny značeny jednopísmennou zkratkou; EC = extracelulární doména, TM = transmembránová doména, IC = intracelulární doména).

Pozice (bp)	Záměna v kodónu	Záměna v proteinové sekvenci	Do ména	Výskyt v alelách Tlr6							
				A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A5
371	<u>C</u> AA → <u>C</u> GA	Q124R	EC	X	X			X	X	X	X
384	T <u>G</u> C → T <u>G</u> T	synonymní	EC					X	X		
385	<u>T</u> GC → <u>G</u> GC	C129G	EC	X	X			X	X	X	
396	G <u>C</u> G → G <u>C</u> A	synonymní	EC								X
523	<u>C</u> TC → <u>T</u> TC	L175F	EC					X	X		
555	A <u>T</u> T → A <u>T</u> C	synonymní	EC					X	X	X	
687	A <u>A</u> C → A <u>A</u> T	synonymní	EC					X	X	X	X
1119	C <u>A</u> G → C <u>A</u> A	synonymní	EC								X
1246	<u>C</u> TG → <u>T</u> TG	synonymní	EC			X					
1255	<u>T</u> TG → <u>C</u> TG	synonymní	EC					X	X	X	X
1476	G <u>C</u> A → G <u>C</u> G	synonymní	EC					X	X	X	
1495	<u>C</u> TT → <u>T</u> TT	L499F	EC					X	X	X	
1572	G <u>A</u> T → G <u>A</u> C	synonymní	EC					X	X	X	
1628	C <u>A</u> A → C <u>G</u> A	Q543R	EC			X	X				X
1635	A <u>C</u> A → A <u>C</u> G	synonymní	EC					X	X	X	
1782	G <u>A</u> T → G <u>A</u> C	synonymní	EC						X		
1930	<u>T</u> TA → <u>G</u> TA	L644V	IC	X	X	X	X				
2028	G <u>A</u> G → G <u>A</u> A	synonymní	IC		X						
2125	<u>G</u> CC → <u>T</u> CC	A709S	IC	X	X	X	X	X	X	X	X
2169	T <u>G</u> C → T <u>G</u> T	synonymní	IC			X	X				
2247	C <u>C</u> C → C <u>C</u> G	synonymní	IC			X	X				
2392	<u>T</u> TA → <u>G</u> TA	L798V	IC	X	X						



Obrázek P7: Porovnání produkce IL-1 β , IL-12 a NO makrofágy z různých linií myši domácí po stimulaci jednotlivými ligandy TLRs; šedě označeny linie poddruhu *M. m. domesticus*, bíle linie *M. m. musculus*.