

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Anežka Pojezdná

Variabilita alel MHC I a kožní prozánětlivá reaktivita u plemen kura
domácího

*MHC class I allelic variability and pro-inflammatory responsiveness in
domestic fowl*

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Konzultant práce: Mgr. Josef Bryja, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Tato diplomová práce vznikla pod vedením mého školitele RNDr. Michala Vinklera, PhD, dále ve spolupráci se skupinou prof. Jima Kaufmana z Department of Pathology, University of Cambridge a Annou Bryjovou z Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v.v.i., detašovaného pracoviště ve Studenci. Přestože hlavní podíl práce jsem zpracovávala samostatně, na této práci se podíleli i další spolupracovníci. Podíl ostatních spolupracovníků na jednotlivých částech diplomové práce je zmíněn v textu a v poděkování.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovávala 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 dne 14. 8. 2015

Anežka Pojezdná

Abstrakt

Kur domácí (*Gallus Gallus f. domestica*) je ekonomicky důležitý modelový druh. Znalost imunitního systému tohoto druhu je tedy klíčová. Inbrední modelové linie Kura domácího, běžně používané ve výzkumu jsou dobrým modelem pro výzkum imunity. Mají však nepřírozenou variabilitu, v důsledku vzniku těchto linií příbuzenským křížením. Jejich genetická i fenotypová variabilita proto redukována. Pro mapování variability imunitní odpovědi mohly být dobrým modelem plemena slepic, vyšlechtěná v dobách dávno minulých a nyní udržovaná v zájmových chovech. V této diplomové práci jsem mapovala genetickou variabilitu vazebného místa MHC glykoproteinů I. třídy. U kura domácího je kódováno genem BF, který je v genomu kopírovaný (BF1 a BF2). Tyto geny jsou poměrně dobře známé a byla popsána značná variabilita i u zmíněných inbredních laboratorních linií. MHC výsledky práce naznačují vysokou genetickou variabilitu MHC I u plemen slepic. Identifikovali jsme 41 haplotypů u 25 jedinců 14 plemen, z toho 7 již známých z literatury. Dále jsem se zaměřila na prozánětlivou aktivitu u plemen kura domácího na příkladu subkutánní stimulace bakteriálním lipopolysacharidem. Sledovala jsem velikost otoku a expresi prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-1 β po subkutánní aplikaci lipopolysacharidu. Výsledky naznačují, že velikost otoku po stimulaci a exprese vybraných prozánětlivých interleukinů se mezi plemeny liší.

Abstract

Domestic fowl (*Gallus gallus f. domestica*) is an economically important model species in science. Knowledge of the immune system of this species is therefore crucial. In research the commercial stocks are usually used together with laboratory inbred lines. They have an unnatural variability, as a result of inbreeding, their genetic and phenotypic variability is reduced. This laboratory lines are therefore not the best model for research of variability. Presently, genetically diversified poultry populations can be found in rural stocks and fancy breeds. These breeds could be good model for research in variability of immunoresponse. In this thesis, I try to map the genetic variability of the binding site of MHC class I glycoproteins in fowl breeds. In chickens are these molecules encoded in duplicated gene called BF (BF1 and BF2). These genes are relatively well known and considerable variability has been described in domestic fowl. Our results suggest a high genetic variability of MHC I in domestic fowl breeds. We had identified 41 haplotypes in 25 individuals of 14 breeds, including 7 haplotypes already known from the literature. I also focused on proinflammatory activity in fowl breeds. I watched swelling of tissue and expression of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 β after subcutaneous injection of lipopolysaccharide. The results suggest that the magnitude of swelling after stimulation and expression of the two proinflammatory interleukins differ among fowl breeds.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	5
Obsah	6
I. Úvod.....	8
I.1 Plemena kura domácího jako model.....	8
I.2 Variabilita genů pro MHC I. Třídy.....	9
I.2.1 Struktura a funkce molekul MHC I. Třídy.....	9
I.2.2 MHC I u kura domácího	11
I.3 Exprese prozánětlivých cytokinů IL-1b a IL-6 v zánětu	13
I.3.1 Zánět	13
I.3.2 Cytokiny a jejich funkce	13
I.3.3 Prozánětlivé cytokiny IL-1b a IL-6 a jejich exprese v zanícené tkáni.....	14
II. Cíle práce.....	15
III. Metody.....	16
III.1 Variabilita MHC I.....	16
III.1.1. Pokusná zvířata	16
III.1.2 Genotypování - RSCA	16
III.1.3 Klonování, sekvenování	20
III.1.4 Zpracování sekvencí.....	21
III.2 Funkční experimenty	22
III.2.1 Pokusná zvířata	22
III.2.2 Kvantitativní PCR (qPCR).....	22
III.2.3 Analýza dat.....	24
VI. Výsledky.....	26
VI.1 Variabilita genů pro MHC I. třídy	26

VI.2 Funkční analýza	31
VI.2.1 Variabilita otoků po aplikaci LPS u plemen slepic	31
VI.2.1 Variabilita exprese IL-1 β u plemen slepic	32
VI.2.3 Variabilita exprese IL-6 u plemen slepic	34
V. Diskuze	36
V.1 Variabilita genů pro MHC I. třídy u plemen slepic	36
V.2 Funkční analýza	38
VI. Závěr.....	40
Poděkování	41
Seznam zkratk.....	42
Seznam zkratk aminokyselin a nukleových bází	43
Seznam tabulek.....	44
Seznam obrázků.....	45
Literatura	46
Přílohy	56

I. Úvod

I.1 Plemena kura domácího jako model

Kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*) je ve vědě nejvýznamnějším ptačím modelem (Kaufman 2008). Podle Světové organizace pro výživu a zemědělství (FAO) je na Zemi v současné době chováno skoro 20 miliard jedinců tohoto druhu. Jen v České republice žije přibližně 25 milionů jedinců kura domácího, ze kterých je každý rok vyprodukováno 270 tisíc tun masa a dvě miliardy vajec (<http://www.fao.org/home/>). Jeho ekonomický význam je tedy nepopíratelný. Kromě ekonomické důležitosti je tu ještě epidemiologické hledisko. V hromadných chovech se totiž snadno přenášejí a mutují všemožné bakterie a další patogenní organismy.

Domestikace kura domácího proběhla v jihovýchodní Asii před deseti až patnácti tisíci lety z pralesního ptáka kura bankivského (*Gallus gallus*), někteří autoři nevyklučují v průběhu domestikace ani hybridizaci s příbuzným druhem kurem zeleným (*Gallus varius*, Liu et al. 2006, Sawai et al. 2010). Během rozšiřování po všech kontinentech se jedinci dostávali do styku s různými tlaky prostředí, patogenů i vkusu chovatelů, které vedly k diferenciaci na různá plemena (Gongora et al. 2008). Tato plemena jsou dnes v západním světě zachovávána neintenzivními zájmovými a ekologickými chovy. Během 20. století byly, kvůli potřebě krmit rostoucí populaci, vyšlechtěny linie vysokoprodukčních jedinců, příbuzní plemene leghornka (White leghorn), kteří tvoří naprostou většinu z 20 miliard kurů na planetě. Z podobných zvířat byly vytvořeny i laboratorní inbrední linie, které jsou téměř výhradně používány ve výzkumu. Výjimečné jsou jen některé laboratorní linie Ústavu molekulární genetiky AV ČR, které jsou odvozené z plemene Minorca. Tato inbrední a vysokoprodukční zvířata jsou ale geneticky (i vzhledově) velice málo variabilní, což by v případě imunitních mechanismů, které musí rozpoznávat velké spektrum bakterií, virů a jiných patogenů, mohlo vést k větší citlivosti k různým nemocem (Muir et al. 2008).

Zachovaná stará plemena slepic se během své dlouhé evoluce potkala a stále potkávají s mnoha různými patogeny a dá se tedy u těchto zvířat předpokládat velká variabilita imunitních genů (Hillel et al. 2003), která může být konzervovaná v jedincích v zájmových chovech (Liu et al. 2006, Qu et al. 2006, Berthouly-Salazar et al. 2010, Ruan and Zheng 2011, Ruan et al. 2012). Tato variabilní zvířata by mohla být použita při

šlechtění nových odolnějších produkčních linií (Alders and Pym 2009). Zachovávat vysokou variabilitu je energeticky náročné. Mohou si ji tedy dovolit pouze jedinci, kteří mají dobrou kondici, takoví jedinci mohou být rezistentní a také atraktivnější v pohlavním výběru.

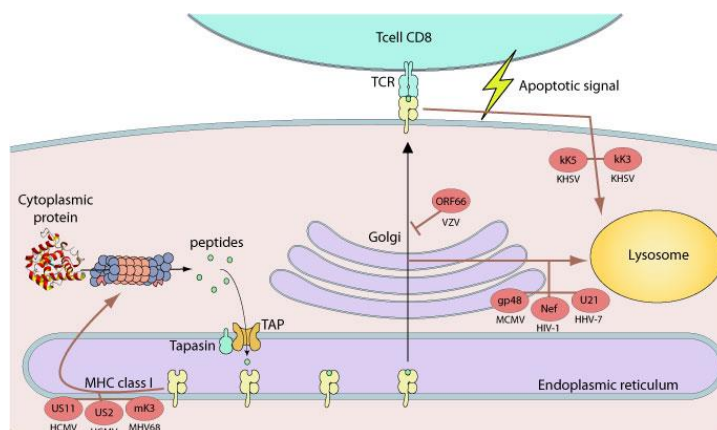
Většina poznatků o genetice kura domácího je získána ze snadno dostupných inbredních linií, vysokoprodukčních plemen nebo moderních nově vyšlechtěných plemen starých maximálně 100 let. Proto jsme se v této práci chtěli zaměřit na imunogenetiku a imunitní reakce několika plemen slepic, kde by mohla být nějaká neobjevená variabilita.

Tato práce se skládá z genetické části, ve které jsme se zaměřili na variabilitu genů pro vazebné místo MHC glykoproteinů I. třídy u plemen slepic a funkční části, kde jsme porovnávali expresi dvou vybraných cytokinů v zanícené tkáni týdenních kuřat. Mohli bychom tak vidět tak variabilitu plemen jak adaptivní tak vrozené imunity plemen kura domácího.

I.2 Variabilita genů pro MHC I. Třídy

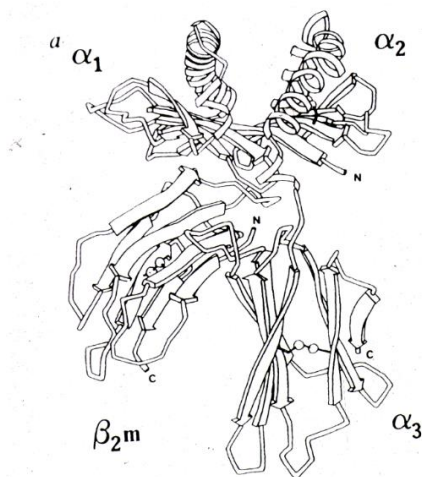
I.2.1 Struktura a funkce molekul MHC I. Třídy

MHC glykoproteiny (major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex) se nacházejí na vnější straně cytoplazmatické membrány buněk. Jsou to klíčové molekuly adaptivní složky imunitního systému. MHC glykoproteiny váží peptidy pocházející zevnitř buňky a prezentují je na povrchu cytoplazmatické membrány T-lymfocytům. V případě MHC I. třídy jsou přítomné na membránách všech buněk a váží peptidy z proteinů, které buňka právě produkuje (Cruse and Lewis 2009, Murphy 2011). MHC I komplexy s navázaným peptidem se vážou na receptory imunitních buněk (cytotoxické T lymfocyty, NK buňky) a pokud buňky rozpoznají cizorodý peptid a správné koreceptory (například CD8), spustí kaskádu imunitních reakcí vedoucí k apoptotické smrti buňky (viz obrázek 1). Tento postup je efektivní při obraně proti intracelulárním patogenům a rakovinným buňkám.



Obrázek 1 – Schéma vázání peptidů na molekuly MHC I. třídy a vazba na CD8+ T lymfocyty (http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/819.html)

Zralé molekuly MHC I. třídy obsahují dvě “open-faced sandwich” domény (α_1 a α_2) dále obsahují protilátkám podobnou doménu α_3 , propojující peptid, transmembránový region a cytoplazmatický region (viz obrázek 2). Do „žlábků“ mezi doménami α_1 a α_2 se váže 9 aminokyselin dlouhý peptid, který je rozpoznáván T receptory imunitních buněk (Bjorkman et al. 1987, Kaufman 2008).



Obrázek 2 – Struktura molekuly MHC I. třídy bez navázaného peptidu (Bjorkman et al. 1987)

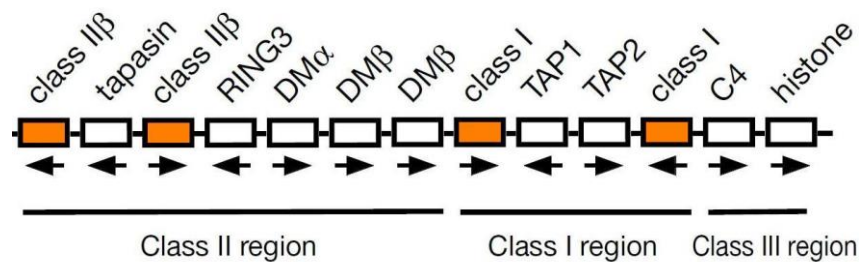
Geny pro MHC glykoproteiny jsou součástí velké genové rodiny, která obvykle obsahuje mnoho genů a pseudogenů vzniklé i vícenásobnými duplikacemi a také obsahuje i nezanedbatelné množství repetitivní DNA (The MHC sekvencing consortium 1999, Horton et al. 2004). Samotné MHC geny také bývají velmi často duplikované. MHC geny bývají hodně variabilní a mívají velké množství různých alel (Miller et al. 2004). Tato

vysoká variabilita je nejspíše způsobena balancující selekcí za strany parazitů a patogenů. Pro jedince je totiž výhodné mít několik různých variant MHC molekul. Umožňuje jim to rozeznávat větší spektrum parazitů a patogenů (v případě molekul MHC I. třídy vnitrobuněčných), dále také mutantní buňky vlastního těla (Zelano and Edwards 2002). Variabilita MHC receptorů může být také udržována i pohlavním výběrem. Bylo pozorováno, že si živočichové (i lidé) vybírají partnery s rozdílnými MHC alelami – dá se tedy předpokládat snaha o potomstvo s variabilními geny a lepšími možnostmi rozpoznávání parazitů, patogenů a vadných buněk včetně rakovinných (Potts et al. 1994, Penn et al. 2002).

I.2.2 MHC I u kura domácího

Na rozdíl od většiny ptačích MHC, je B lokus kura domácího relativně dobře známý (Kaufman et al. 1999a) a velmi kompaktní s pouze dvěma geny pro α -řetězec MHC I. třídy (BFs). Ty se nachází v 44kb dlouhém DNA segmentu na chromozomu 16 (Kaufman et al. 1999b, Jacob et al. 2000, Miller et al. 2004, Shaw et al. 2007) viz obrázek 3. Ve většině tkání se exprimuje hlavně kopie BF2, také nazývána BF Major; BF1, zvaná minor, je přepisována méně (Wallny et al. 2006, Shaw et al. 2007). U některých linií slepic má BF1 dokonce stop kodon v promotorové sekvenci vedoucí k pseudogenizaci. Obě dvě kopie genu jsou hodně variabilní, ale pravděpodobně procházely jinými selekčními tlaky a nepřepisovaný BF1 gen slouží pravděpodobně jako záložní kopie (Shaw et al. 2007).

Takovéto uspořádání jenom se dvěma kopiemi MHC genů a s dominantní expresí jednoho z nich a velmi malým procentem rekombinace se nazývá „minimal essential“ (Kaufman et al. 1999b). To bylo potvrzeno long distance PCR a sekvenováním celého MHC regionu u mnoha laboratorních linií kura domácího (Kaufman et al. 1999b, Jacob et al. 2000, Shaw et al. 2007). U kura domácího je kromě samotných MHC na rozdíl od savčích modelů variabilní další gen – TAP, který je součástí dráhy, která pumpuje rozštěpané peptidy do endoplazmatického retikula, kde se později váží na MHC (Walker et al. 2011).



Obrázek 3 - B-region Kura domácího (Kaufman et al. 1999b)

Existuje hypotéza, že „Minimal essential“ MHC by mohl být evolučně původní stav. To podporuje i fakt, že kur domácí taxonomicky patří do ptačího bazálního taxonu Galloanseres. Výrazně diferencované, variabilní mnohokrát kopírované geny za tohoto předpokladu vznikly několikrát nezávisle na sobě u odvozenějších skupin například u pěvců, savců, kostnatých ryb a dalších (Kaufman 2013). Minimal essential organizaci MHC genů kromě kurů domácích prokazatelně mají: kuři bankivští (*Gallus gallus*, Worley et al. 2008, 2010), zlatí bažanti (*Chrysolophus pictus*, Ye et al. 2012), krocani (*Meleagris gallopavo*, Chaves et al. 2009), tetřivci (*Tetrao tetrix*, Wang et al. 2012). Existují ale i zástupci Galloanseres, kteří mají MHC geny organizované jinak. Tetřivek prériový (*Tympanuchus cupido*) má pouze jeden lokus pro MHC I. (Eimes et al. 2013). Křepelky japonské (*Coturnix japonica*) mají naopak 4 lokusy pro MHC I asi jako důsledek genové duplikace, také byly v blízkosti lokusu identifikovány i pseudogeny (Shiina et al. 2004).

V případě kura domácího byla prokázána souvislost mezi B haplotypy a rezistencí k různým infekcím. Různé MHC alely zajišťují rezistenci k různým patogenům (Wallny et al. 2006, Shiina et al. 2007). Byla prokázána asociace MHC haplotypů s rezistencí proti Markově chorobě (Bacon and Witter 1993), Rous sarcoma viru (Svoboda et al. 1992), infekční bronchitidě, Newcastleké nemoci (Heller et al. 1991), zlatému stafylokokovi (Cotter et al. 1992) i střevním helmintům (Schou et al. 2007). U savců MHC jsou známy také mnohé asociace MHC haplotypů s nemocemi, ne však s infekčními chorobami, ale většinou s autoimunitními onemocněními (Hill 1998).

I.3 Exprese prozánětlivých cytokinů IL-1b a IL-6 v zánětu

I.3.1 Zánět

Zánět je soubor reakcí vrozené imunity, který se rychle aktivuje při infekci či zranění tkáně, lokalizují poškození (patogeny, fyzikálními nebo chemickými vlivy) a vede k eliminaci patogenů a ke zhojení tkáně (Nathan 2002). Reakce zánětu jsou nejdůležitějším mechanismem v první linii obrany proti bakteriálním patogenům (van de Veerdonk et al. 2011). Vnější projevy zánětlivých mechanismů, složité interakce buněk a proteinů, byly popsány již v roce 25 římským lékařem Celsem jako 4 klasické příznaky zánětu: tumor (otok), calor (zvýšená teplota), dolor (bolestivost) a rubor (zčervenání) (Tracy 2006).

Experimentálně se zánět navozuje infekcí pokusných zvířat patogeny nebo jejich částmi, jako například lipopolysacharidem (LPS), který je součástí buněčné stěny gramnegativních bakterií (Singh et al. 2012). LPS patří mezi takzvané struktury asociované s mikroby MAMPs (microbial-associated molecular patterns), které jsou u bakterií evolučně konzervované a v těle hostitele jsou rozpoznávány imunitními buňkami a tím je zahájena zánětlivá reakce (Matzinger 2007). Tyto struktury se váží na receptory na vrozené imunity na leukocytech a dalších buňkách ve tkáních, zvané pattern recognition receptory (pattern recognition receptors – PRRs) (Medzhitov and Janeway 1997, Kawai and Akira 2009). Navázání antigenů na různé PRRs ve tkáních spustí signalizaci vedoucí k produkci různých signálních proteinů cytokinů, které atrahují další buňky imunitního systému do místa zánětu a stimulují je (Ashley et al. 2012).

I.3.2 Cytokiny a jejich funkce

Cytokiny jsou skupina rozpustných proteinových nebo peptidických mediátorů produkovaných imunitními buňkami, aby regulovaly imunitní odpověď. Hrají klíčovou roli v regulaci imunitních, včetně zánětlivých procesů. Ptačí a savčí cytokiny jsou si funkčně podobné, i když bývají strukturně rozdílné (Giansanti et al. 2006).

Ptačí cytokiny se dají rozdělit podle funkce do několika skupin: prozánětlivé cytokiny (IL-1 rodina, IL-6, IL-17 rodina), Th1 interleukiny (IL-2, -12, -15, -16, a IFN- γ), Th2 interleukiny (IL-3, -4, -5, -13), regulační cytokiny (TGF- β , IL-10). Tyto skupiny nejsou striktní ani rigidní, cytokiny mají často pleiotropní funkce (Giansanti et al. 2006).

V této diplomové práci jsme po aplikaci LPS sledovali variabilitu exprese prozánětlivých cytokinů IL-1b a IL-6.

I.3.3 Prozánětlivé cytokiny IL-1b a IL-6 a jejich exprese v zanícené tkáni

Interleukiny IL-1 β a IL-6 hrají důležitou roli v iniciaci rané, akutní fáze zánětlivé reakce u savců (Hazuda et al. 1990, Plackett et al. 2007, Sevimli et al. 2008). Tyto cytokiny jsou produkovány fagocyty a dalšími buňkami v napadené tkáni v odpověď na bakteriální, ale i virovou nebo protozoální infekci kura domácího (Laurent et al. 2001, Okamura et al. 2004, Khatri et al. 2005, Hong et al. 2006)

Expresí genů z rodiny IL-1 v imunitní odpovědi kuru vede k prozánětlivé odpovědi a IL-1b je produkován fagocyty a dalšími efektorovými buňkami na odpověď na virové i bakteriální infekce (Laurent et al. 2001). V rámci zprostředkování zánětlivých reakcí, IL-1b má srovnatelnou funkci se savčím. Bylo prokázáno, že po manipulaci lipopolysacharidem množství tohoto zánětlivého mediátoru stoupá (Klasing and Peng 1987). Expresí IL-1b roste v prvních 6 hodinách po infekci, dosahuje nejvyšších hodnot mezi 6 a 12 hodinami po vyvolání zánětu a poté exprese tohoto cytokinu klesá (Hamal et al. 2010). Také při virové infekci je výrazné zvýšení exprese IL-1b v makrofázích u ptáků trpících PEMS (Poultry enteritis and mortality syndrome) ve srovnání s negativní kontrolou (Heggen et al. 2000). Po invazi *Salmonelly* do buněčné kultury makrofágů se ale exprese těchto genů IL-1 rodiny obecně snižuje (Kaiser et al. 2000).

Interleukin 6 (IL-6) je důležitou molekulou v indukci efektorové imunitní odpovědi (Lynagh et al. 2000, Kaiser et al. 2000) Je produkován makrofágy v úvodní části zánětu, zároveň vyvolává proliferaci hematopoetických prekursorů (Heinrich et al. 1990). Dále IL-6 stimuluje růst B lymfocytů a produkci imunoglobulinů (Kishimoto and Hirano 1988), účastní se aktivace T lymfocytů a ve vývoji Th2 imunitní odpovědi (Rincon et al. 1997) a zároveň inhibici imunitní odpovědi typu Th1 (Diehl et al. 2000). Také je také IL-6 schopný indukovat diferenciací dendritických buněk na makrofágy (Chomarat et al. 2000). U ptáků byla prokázána prozánětlivá role IL-6 (Lynagh et al. 2000). Po invazi bakterií do tkáně (např. *Salmonella dublin*) produkce IL-6 indukuje silnou zánětlivou odpověď a dále aktivuje specifické i nespecifické mechanismy imunity (Kaiser et al. 2000). Také jako IL-1 β jeho exprese roste v prvních 6 hodinách po infekci, dosáhne nejvyšších hodnot mezi 6 and 12 hodinami po infekci a poté exprese klesá (Hamal et al. 2010).

II. Cíle práce

- Použít RSCA metodu na zmapování variability funkčního místa genů pro MHC molekuly I. třídy (BFs) u plemen kura domácího
- U vybraných plemen kura domácího srovnat reakci na subkutánní aplikaci LPS do patagia (otok tkáně, exprese prozánětlivých cytokinů)

III. Metody

III.1 Variabilita MHC I

III.1.1. Pokusná zvířata

Pro genotypování MHC I genů jsme použili 192 jedinců 34 plemen kura domácího od 47 různých chovatelů z celé České Republiky. Do studie byly zahrnuty moderní i starobylá plemena slepic (Araukana, Australka, Bantamka, Barneveldka, Bojovnice košamo, Bojovnice Šamo, Brahmánka, Češka, Fénixka, Hamburčanka, Hedvábnička, Holokrčka, Japonka, Jokohamka, Kadeřávka, Kur Bankivský, Lafleška, Malajka, Minorka, Oravanka, Orlovka, Paduánka, Plymutka, Rousná zakrslá, Sebritka, Velsumka, Vlaška, Vranohlávka. Wyandotka, zdrobnělá Brahmánka, zdrobnělá Češka, zdrobnělá Holand'anka, zdrobnělá Holokrčka, zdrobnělá Kočinka; Pavel and Tuláček 2006). 72 jedinců byli dospělí, kterým byla odebrána krev z křídelní žíly přímo u chovatele nebo na zemědělské výstavě. Zbytek vzorků tvořila 19 denní embrya, kterým byla odebírána svalová tkáň. Pro získání embryonální tkáně pro genetické analýzy byla nakoupena násadová vejce od chovatelů. Ta byla inkubována v inkubátoru Brinsea OvaEasy 190 Advance EX. Inkubace probíhala při 37,5°C a 50% vlhkosti. Devatenáctý den inkubace byla embya usmrcena cervikální dislokací a byly jim odebrány vzorky tkání. Oba druhy tkání, krev i svaly, byly fixovány v 96% ethanolu a skladovány v -20°C. Ze všech vzorků byla vyizolována DNA kitem DNA DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (kat. číslo 69506, Qiagen, Hilden, Německo) podle návodu.

III.1.2 Genotypování - RSCA

Ve spolupráci s laboratoří profesora Jima Kaufmana z oddělení Patologie University of Cambridge byla použita pro genotypizaci MHC alel metoda RSCA (Reference strand-mediated conformation analysis). Je to genotypovací technika, při které fluorescenčně označené známé sekvence (FLRs) tvoří heteroduplexy se sekvencemi obsaženými ve vzorku (hybridizace). Tyto heteroduplexy jsou následně oddělené pomocí kapilární elektroforézy a vzdálenost jejich pohybu je zaznamenána vzhledem ke známému standartu velikosti. Počet peaků na elektroforetogramu ukazuje na počet rozdílných

heteroduplexů ve vzorku, tedy počet rozdílných sekvencí. Kombinace peaků ze 4 různých FLRs umožňuje identifikovat všechny alely genů pro oba geny pro MHC I. třídy. Může se totiž stát, že některé alely, které jsou si navzájem podobné, budou mít hodnoty elektroforetogramů stejné po hybridizaci s jednou FLR stejné nebo velice podobné. Proto se používá více různých FLRs, aby byly odhaleny všechny alely. Tato metoda již byla použita pro identifikaci MHC alel u několika dalších druhů: koček domácích (Addie et al. 2004), psů domácích (Angles et al. 2005) i člověka (Ramon et al. 1998, Corell et al. 2000).

Genotypovali jsme se 767 bp dlouhý fragment MHC I. genů, zahrnující exony 2 a 3, které kódují vazebné místo MHC molekuly. V naší analýze byly použity 4 různé FLRs po dvou od každého MHC I genu (viz tabulka 1). Před genotypováním byla změřena koncentrace DNA všech vzorků spektrofotometrem NanoDrop 2000c a vzorky byly zředěny na koncentraci 20 ng/ml. Vzorky s nižší koncentrací než 20 ng/ml byly použity nezředěné.

	gen	alela	NCBI accession number
FLR A	BF2	BF2*1501	AM282695
FLR B	BF1	BF1*0201	AM279340
FLR C	BF2	BF2*0401	AM282693
FLR D	BF1	BF1*0401	AM279337

Tabulka 1 – Informace o FLRs

Prvním krokem metody RSCA je namnožení cílového genu polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Byl použit pár nespecifických amplifikačních primerů c71 a c75 (sekvence viz tabulka 2), rutině používaných v laboratoři Jima Kaufmana pro amplifikaci obou kopií MHC I genu kura domácího.

BF	c71: 5-CGAGCTCCATACCCTGCCGTAC-3	c75: 5-CTCCTGCCCAGCTCACCCCTC-3
----	---------------------------------	--------------------------------

Tabulka 2 - Sekvence nespecifických primerů amplifikujících část vazebného místa obou MHC I (BF1 a BF2) genů (Shaw et al. 2007)

Pro PCR reakci byla použita polymeráza VELOCITY DNA Polymerase (BIOLINE Ltd., London, UK). Složení jedné PCR reakce je uvedeno v tabulce 3. PCR amplifikace

probíhala v termocykleru za následujících podmínek: iniciální denaturace při 96°C po dobu 1 minuty, poté v každém z 30 cyklů: denaturace při 96°C po dobu 1 minuty, nasedání primerů při teplotě 65°C 1 minutu, amplifikace Velocity polymerázou při 72°C 1 minutu. Po posledním cyklu proběhla ještě 10-ti minutová syntéza. Úspěšnost PCR byla ověřena horizontální elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu (180 V, 30 min.). PCR produkty byly skladovány v -20°C.

Velocity DNA polymerase kit	1 PCR reakce (μl)	Koncentrace
ddH ₂ O	32	
5xHiFi buffer	10	
DMSO	2	100%
dNTPs	1	100 mM
Primer c71	2	10 uM
Primer c75	2	10 uM
Velocity (polymeráza)	1	2 U/ul
DNA	1	
Celkem	51	

Tabulka 3 - Složení jedné PCR reakce před RSCA s použitím Velocity DNA polymerase (Bioline Ltd, London, UK)

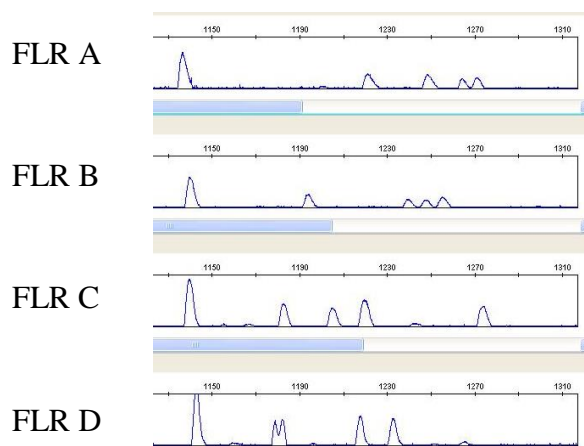
Podobná PCR reakce proběhla i při přípravě Fluorescenčně značených referencí (Fluorescent labeled references, FLRs). S rozdílem, že c75 primer byl označen fluorescenční značkou FAM na 5' konci. Jako templát byl použit plazmid z laboratoře Jima Kaufmana. Namnožené FLRs byly skladovány v -20°C.

RSCA hybridizace probíhala v termocykleru. Reakční směs se skládá z 4μl FLR a 3 μl PCR produktu. Pro každý vzorek byla namíchána hybridizační reakce s každou ze 4 FLRs. V termocykleru nejprve proběhla 10-ti minutová denaturace při 95°C, poté klesala teplota po 1°C za sekundu až na 55°C. Hybridizace pokračovala dalších 15 minut při 55°C než byla zchlazena na 4°C.

Posledním krokem byla kapilární elektroforéza produktu hybridizace. Na každé měření bylo použito 4 μl produktu hybridizace, do kterého bylo přidáno 9,8 μl ddH₂O, aby se minimalizoval negativní efekt vypařování a 0,2 μl Size Standartu (prodávány

GeneScan-2500 ROX Size Standart, Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Kapilární elektroforézu provedla Maria-Elena Mannerelli v upraveném sekvenátoru v Natural Environment Research Council, University of Sheffield.

Data z kapilární elektroforézy byla zpracována v programu GeneMapper® Software - Applied Biosystems. Nejprve bylo pro každý vzorek zkontrolováno, jak program přečetl Size standart a případně byly ručně označeny peaky, které software nerozpoznal. Pak byla teprve spuštěna v programu GeneMapper® podprogram pro analýzu RSCA dat a byly zobrazeny elektroforetogramy pro každou RSCA reakci. Příklad elektroforetogramu je na obrázku 4. Následně jsme z programu vykopírovali hodnoty peaků z elektroforetogramů do tabulky v tabulkovém editoru (MS Excel) a dále pracovali již jen s jejich číselnou hodnotou.



Obrázek 4 – Příklad Elektroforetogramů od jednoho jedince. První, největší peak vznikl hybridizací FLR (homoduplex), ostatní peaky jsou již hybridizace s různými sekvencemi vzorku (heteroduplexy)

Potencionální haplotypy určené vzorem elektroforetogramu je třeba osekvenovat, abychom mohli s jistotou učit které kombinace peaků odpovídají jakému haplotypu. Geny pro MHC I. třídy nelze osekvenovat standartním sekvenováním. Kvůli dvěma kopiím tohoto genu (BF1 a BF2) a jejich vysoké variabilitě nelze sekvenovat heterozyfotní sekvence. Proto jsme PCR produkty nesekvenovali rovnou, ale nejprve je zaklonovali do vektoru (pGEM®-T Easy Vector System I), abychom s jistotou odlišili všechny druhy sekvencí v jedinci.

III.1.3 Klonování, sekvenování

Zaklonování do vektoru a příprava sekvenační reakce proběhla v laboratoři Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v detašovaném pracovišti ve Studenci. Zaklonovány byly vždy 2 nezávislé PCR produkty, aby bylo možno rozeznat variabilitu od chyb polymerázy. Zaklonovány byly PCR produkty od 25 jedinců, kteří byli vybráni, kvůli jejich jednoduchosti a vzájemné podobnosti hodnot na elektroforetogramu RSCA. K amplifikaci byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR) s použitím KAPA HiFi PCR Kitu (Kapa Biosystems Wilmington, Massachusetts, USA). Složení jedné PCR reakce je uvedeno v tabulce 4. PCR amplifikace probíhala v termocykleru za následujících podmínek: iniciální denaturace při 95°C po dobu 4 minut, poté v každém z 35 cyklů denaturace při 95°C po dobu 30 sekund, nasedání primerů 20 sekund při teplotě 65°C, amplifikace HiFi polymerázou při 72°C 30 sekund. Po posledním cyklu proběhla prodloužená syntéza dalších 7 minut. Úspěšnost PCR byla ověřena horizontální elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu (150 V, 20 minut.). Poté byla amplifikovaná DNA přečištěná sadou EXO1-CIP PCR Clean-up Kit podle návodu.

KAPA HiFi PCR Kit	1 PCR reakce (ul)	Koncentrace
ddH ₂ O	6,2	
GC buffer	2	
dNTPs	0,25	10 mM
Primer c71	0,2	10 uM
Primer c75	0,2	10 uM
HiFi (polymeráza)	0,15	5 U/ul
DNA	1	
Celkem	10	

Tabulka 4 - Složení jedné PCR reakce před zaklonováním do vektoru

Přečištěné PCR produkty byly zaklonovány do vektoru. Byl použit kit pGEM®-T Easy Vector System I podle návodu. Z každé reakce bylo vybráno 10 kolonií se zaklonovaným plazmidem, které byly použity jako templát pro PCR reakci. PCR reakce probíhala shodně, jako před zaklonováním do vektoru, pouze jako templát byly použity bakterie se zaklonovaným vektorem, abychom zjistili, zda byl plazmid do bakterií skutečně

zaklonován. Podmínky v termocyleru byly totožné. Úspěšnost PCR byla ověřena horizontální elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu (150 V, 20 minut). 6 nejúspěšnějších PCR produktů bylo přečištěno sadou EXO1-CIP PCR Clean-up Kit podle návodu. Tyto přečištěné PCR produkty byly sekvenovány za použití primerů c71 a c75 z tabulky III.2 firmou BIOGEN PRAHA, s.r.o v European Custom Sequencing Centre, Koeln, Deutschland.

III.1.4 Zpracování sekvencí

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 byly alignovány sekvence ze všech klonů od každého jedince a byla provedena manuální kontrola kvality sekvencí. Alignment sekvencí (sekvence srovnané pod sebou tak, aby stejné báze byly pod sebou) byl exportován do souborů ve formátu fasta. Následně byly nukleotidové sekvence ořezány, uspořádány, přejmenovány v programu BioEdit v7.1.3.0 (Tom Hall, *Ibis Biosciences, Carlsbad, California, USA*). Do haplotypů byly sekvence rozděleny v programu FaBox v1.40 (Villesen 2007). Haplotypy, které byly identifikovány, jsme se snažili spojit s daty z genotypování RSCA a určit, jaké hodnoty z elektroforetogramu od všech čtyř FLRs odpovídají identifikovanému haplotypu.

Dále byla ze všech sekvencí vymazána sekvence intronu a zbylá sekvence byla přeložena do aminokyselinové sekvence. Byly zkonstruovány fylogenetické stromy. Fylogenetické stromy byly z alignmentu nukleotidových sekvencí i aminokyselinových sekvencí zkonstruovány metodou nejvyšší věrohodnosti (maximum likelihood; ML) v programu MEGA v5.2 (Tamura et al. 2011).

Alignment všech sekvencí (DNA) byl dále analyzován na serveru Datamonkey.org (Delpont et al. 2010a). Nejprve bylo pomocí funkce CMS (Codon Model Selection; Delpont et al. 2010b) otestováno, který model evoluce nukleotidů nejlépe sedí na daná alignment. Vyšel model označený 010010, tento model byl použit na analýzy na serveru Datamonkey. V dalším kroku byla pomocí nástrojů SBP (Single Breakpoint Recombination) a GARD (Genetic Algorithms for Recombination Detection) zkoumána případná přítomnost rekombinačních zlomů.

III.2 Funkční experimenty

III.2.1 Pokusná zvířata

Pro funkční experimenty jsme použili 24 jedinců 5 plemen (Bantamka, Česka, Fénixka, Holokrčka, Rousná zakrslá). Pro potřeby experimentu byla nakoupena násadová vejce od 5 různých chovatelů, která byla inkubována v inkubátoru Brinsea OvaEasy 190 Advance EX. Po 21 dnech inkubace při teplotě 37,5°C a 50% vlhkosti se kuřata vylíhla. Chována byla všechna v kleci za celodenního světelného režimu, krmena ad libitum krmivem Kuře Mini K1 a napájena pouze čistou vodou.

Ve věku 7 dní jsme kuřata zvážili (digitální váha, přesnost 0,01g) a změřili jim tarsus posuvným měřítkem (přesnost 0,05 mm). Byla jim odebrána krev z krční žíly a z krve byl udělán krevní roztěr. Z krevního roztěru byly spočítány absolutní počty bílých krvinek (lymfocytů, heterofilů, basofilů, eozinofilů, monocytů). Hematologické analýzy provedla Mgr. Barbora Bílková.

Poté jim byl injikován roztok lipopolysacharidu (*E. coli*, 0,01 mg/20 ul) do levého patagia. Pravé patagium jsme nechali bez manipulace jako kontrolu (Berthouly et al. 2008). Po 6 hodinách jim byla mikrometrem (přesnost 0,01 mm; Mitutoyo 547-313, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan) změřena šířka obou patagií. Následně jim byla provedena biopsie obou patagií kruhovým skalpelem v průměru 3 mm. Biopsie byly ihned vloženy do fixačního činidla RNAlateru (Qiagen), byly skladovány po 24 hodin v lednici (4°C) potom byly zchlazeny a skladovány v -80°C. Ze všech vzorků byla posléze vyizolovaná RNA kitem RNeasy Plus Mini Kit od Qiagen podle návodu výrobce a skladovaná v -80°C.

III.2.2 Kvantitativní PCR (qPCR)

Kvalitativní PCR byla měřena exprese genů. Nejprve byla změřena koncentrace RNA všech vyizolovaných vzorků na spektrofotometru Biorad SmartSpec 3000 (5ul vzorku a 95ul ddH₂O). Pro každý vzorek byla provedena 3 měření a byla spočítána průměrná koncentrace vzorku. Posléze byla RNA zředěna na koncentraci nejméně koncentrovaného vzorku a to na koncentraci 23,9 µg/ml. Ředění bylo provedeno ddH₂O, která byla také eluční činidlo v izolačním kitu RNeasy Plus Mini Kit od Qiagen. Kvantitativní PCR (qPCR) byla provedena u každého vzorku pro tři geny: jeden house-

keeping gen (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) a dva geny cytokinů (interleukin-1b a 6, IL-1 β a IL-6). House-keeping je takový gen, který by měl být exprimován ve všech buňkách ve stejném množství. GAPDH, který byl použit je jeden z enzymů glykolýzy. Pro qPCR byly použity primery a proby známé z literatury (Kaiser et al. 2003) a jsou i se sekvencemi uvedeny v tabulce 5. Každá qPCR reakce byla provedena v triplicátu, zároveň na každém platíčku byly negativní a pozitivní kontroly. Negativní kontrola byla PCR reakce, ve které byl templát nahrazen vodou, pozitivní kontrola byla ředící řada z plazmidů pro všechny tři geny, poskytnutého laboratoří Petea Kaisera z Roslin-Institutu v Edinburgu. Z ředící řady byla v softwaru LightCycler® 480 spočítána efektivita PCR reakce na každém platíčku.

	F Primer	R Primer	Proba
GAPDH	5-TTGGCATTGTGGAGGGTCTT-3	5-GGGCCATCCACCGTCTTC-3	5-FAM- CGTCCATGCCATCACAGCCACAC- BHQ1-3
IL-1 β	5- GCTCTACATGTCGTGTGATGAG -3	5-GCTGTCGATGTCCCGCAT-3	5-FAM- CCACACTGCAGCTGGAGGAAGCC -BHQ1-3
IL-6	5-GCTCGCCGGCTTCGA-3	5-GGTAGGTCTGAAAGGCGAACA-3	5-FAM- AGGAGAAATGCCTGACGAAGCTC TCCA-BHQ1-3

Tabulka 4 - Primery a proby použité na qPCR analýzy (Kaiser et al. 2003)

Pro qPCR byl použit kit qPCRBIO probe Onestep NO rox (Bioline). Složení jedné reakce je uvedeno v tabulce 6. Reakce proběhly v přístroji LightCycler® 480 Detection System (RocheApplied Science). Data byla zpracována v LightCycler® 480 Softwaru (RocheApplied Science) včetně výpočtu efektivitu PCR. Ta byla, vedle hodnot Ct (cycle threshold) použita při výpočtu hodnoty $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl 2001, Vinkler et al. 2014). Ct hodnota je hodnota cyklu pCR reakce, když začne sledovaný PCR produkt při reakci v LightCycleru exponenciálně růst. Hodnota Ct je úměrná s množstvím daného genu v templátu, tedy jeho obsah v RNA. Pro další statistiku bylo vypočítáno $\Delta\Delta Ct$.

$\Delta\Delta Ct$ je hodnota, která ukazuje na rozdílnou expresi v manipulované a nemanipulované tkáni u jedinců. $\Delta\Delta Ct$ bylo vypočítáno zvlášť pro expresi IL-1b a IL-6. Nejprve byly odečteny hodnoty Ct získané z manipulované a nemanipulované tkáně pro hous-keeping gen (GAPDH) i cílový gen (IL-1 β nebo IL-6). Tyto hodnoty byly umocněny

na efektivitu platička ve kterém reakce probíhala, která byla vypočítána v programu LightCycler® 480 Software (RocheApplied Science). Abychom získali $\Delta\Delta Ct$, byla vždy takto upravená data mezi sebou vydělena (Pfaffl 2001).

kit qPCRBIO probe Onestep NO rox	GAPDH (μ l)	IL-1 β (μ l)	IL-6 (μ l)	Koncentrace
F+R primery	0,8	0,8	0,4	5 μ M
Proba	0,15			10 μ M
RTase	1			20 μ M
2xqPCRBIO	5			
ddH ₂ O	1,05	1,05	1,45	
RNA	2			
Celkem	10			

Tabulka 6 - Složení jedné PCR reakce pro kvantitativní PCR

III.2.3 Analýza dat

Data byla analyzována v statistickém programu R verze 3.0.1 (R Foundation for Statistical Computing 2013, Vídeň, Rakousko).

Pro srovnání reakce na subkutánní aplikaci LPS manipulované tkáně a kontroly jsme použili párový t-test. Vliv na velikost otoku byl testován zobecněnými lineární modely (Generalised Linear Models; GLMs) zahrnujícími tyto vysvětlující proměnné (linie, várka, věk) 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. Residuály výsledného modelu byly použity pro sestrojení krabicového grafu. Plemena slepic byla dále testována TukeyhoHSD (honestly significant difference) testu.

Vliv na produkci IL-1 β , IL-6 po stimulaci LPS byl také testován zobecněnými lineární modely, které zahrnovaly tyto proměnné: velikost otoku, délka tarsu, hmotnost jedince, absolutní počet různých bílých krvinek (lymfocytů, heterofilů, basofilů, eozinofilů, monocytů). Residuály výsledného modelu byly rovněž použity pro sestrojení krabicových

grafů. Plemena slepic byla dále testována párovým TukeyhoHSD (honestly significant difference) testem.

Dále byla v balíčku programu R Recomander vytvořena Pearsnova korelační matice se všemi jmenovanými poměry. Byly také vypočítány Holmovou metodou upravené p-hodnoty (Adjusted p-values; Holm's method). Dále byly vytvořeny grafy vztahu expresí obou interleukinů a absolutního počtu 5 typů bílých krvinek (lymfocytů, heterofilů, basofilů, eozinofilů, monocytů). Grafy byla proložena lineární spojnicí trendu a byla odečtena hodnota R^2 .

VI. Výsledky

VI.1 Variabilita genů pro MHC I. třídy

Z RSCA dat bylo vybráno 24 jedinců 14 plemen, kterým jsme zaklonovali a osekvenovali PCR produkty, abychom zjistili, jaké kombinace hodnot z elektroforetogramů odpovídají jakým sekvencím.

U zaklonovaných jedinců byl sekvenován 767bp dlouhý úsek obsahující exony 2 a 3 obou kopií genů pro MHC I. Třídy (BF1 a BF2). Bylo osekvenováno 24 jedinců. Bohužel sekvenování neproběhlo ideálně, takže pro potřeby dalších analýz byly všechny sekvence oříznuté na stejnou délku 561bp, uprostřed je intron dlouhý 229 bp. Celkem bylo identifikováno 41 různých sekvencí u 25 jedinců. Tyto haplotypy byly pojmenovány hap_1-41. Sekvence haplotypů byly přeloženy do 110 aminokyselin dlouhé sekvence. Pouze haplotypy hap_20 a hap_22, nebyly překládány, protože naše sekvence byly příliš krátké, i když rozdílné od ostatních haplotypů. Pouze 2 námi identifikované haplotypy mají po překlada do aminokyselin stejnou sekvenci a to hap_02 a hap_18, ostatní se liší. Žádná z aminokyselinových sekvencí neobsahuje stopkodón uprostřed sekvence.

U každého jedince bylo nalezeno 2-8 různých haplotypů (viz tabulka 7). V tabulce 8 je uvedeno všech 41 různých haplotypů spolu s hodnotami z RSCA, pokud se podařily najít kombinace hodnot unikátní pro daný haplotyp. Sedm námi identifikovaných haplotypů již bylo identifikováno v minulosti, jména haplotypů a accession number databáze NCBI je rovněž uvedeno v tabulce 8. Z námi identifikovaných haplotypů jich bylo 17 osekvenováno vícekrát, 24 pouze 1x. Četnosti námi identifikovaných haplotypů jsou uvedeny v grafu na obrázku 5.



Obrázek 5 - Graf četností nalezených haplotypů MHC I. třídy

číslo jedince	Plemeno	počet nalezených haplotypů	Haplotypy
46	Bantamka	3	hap_07, hap_18, hap_23
47	Bantamka	3	hap_02, hap_07, hap_19
49	Češka	3	hap_06, hap_14, hap_29
52	Bantamka	5	hap_02, hap_07, hap_18, hap_19, hap_37
59	Češka	5	hap_01, hap_03, hap_24, hap_31, hap_39
61	Minorka	6	hap_12, hap_13, hap_17, hap_33, hap_40, hap_41
62	Minorka	8	hap_05, hap_10, hap_12, hap_13, hap_17, hap_25, hap_26, hap_32
63	Rousná zakrslá	3	hap_08, hap_14, hap_16
67	Barneveldka zakrslá	4	hap_06, hap_07, hap_16, hap_36
69	Minorka	3	hap_10, hap_12, hap_13
78	Holandanka zakrslá	2	hap_09, hap_15
81	Holokrčka zakrslá	3	hap_05, hap_16, hap_21
88	Brahmánka	3	hap_01, hap_04, hap_05
89	Malajka	3	hap_05, hap_07, hap_09
92	Bojovnice šamo	2	hap_05, hap_07
93	Orlovka	2	hap_05, hap_07
94	Lafleška	3	hap_01, hap_05, hap_22
107	Bojovnice šamo	2	hap_07, hap_14
108	Malajka	4	hap_14, hap_27, hap_34, hap_35
119	Češka zdrobnělá	3	hap_07, hap_21, hap_38
129	Minorka	3	hap_13, hap_28, hap_30
141	Holandanka zakrslá	3	hap_07, hap_15, hap_20
142	Holandanka zakrslá	3	hap_11, hap_15, hap_20
147	Paduánka zakrslá	3	hap_12, hap_13, hap_14

Tabulka 7 – Nalezené haplotypy u sekvenovaných jedinců

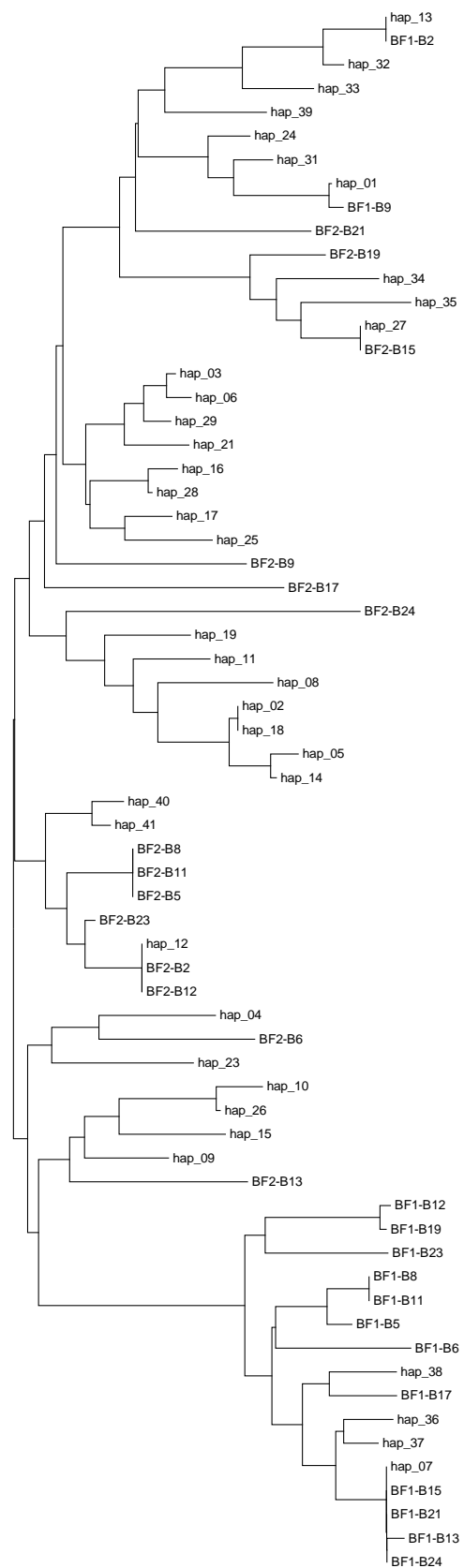
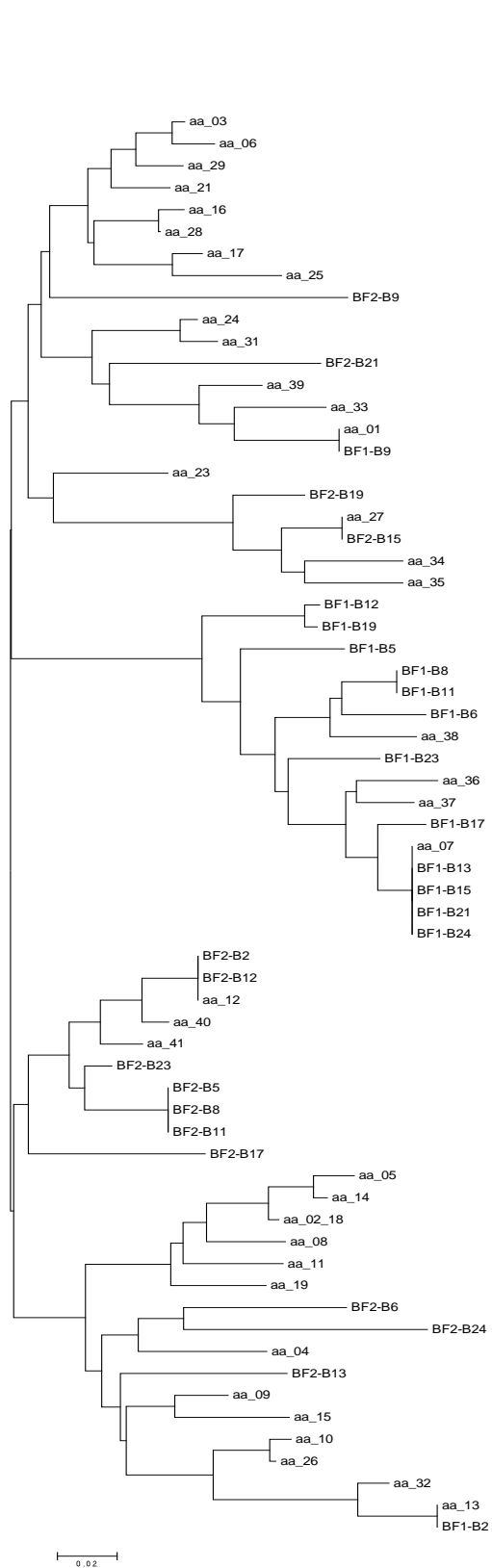
	četnost haplotypu	FLR A <i>BF2</i>	FLR B <i>BF1</i>	FLR C <i>BF2</i>	FLR D <i>BF1</i>	haplotypy blast	NCBI accession number
hap_01	3	1186	1174		1270		
hap_02	2						
hap_03	1	1185,1206	1173				
hap_04	1	1208	1175	1208			
hap_05	8						
hap_06	2					BF2*1401	AM282694.1
hap_07	10					BF1*2101, BF1*JF2	AM279339.1, AM419160.1
hap_08	1						
hap_09	2			1263,1266			
hap_10	2						
hap_11	1		1229,124	1239,1253	1248,1265	BF1*JF9	AM419168.1
hap_12	4					BF2*0201	AM282692.1
hap_13	5					BF1*0201	AM279336.1
hap_14	5						
hap_15	3		1183				
hap_16	3						
hap_17	2	1200					
hap_18	2						
hap_19	2						
hap_20	2						
hap_21	2					BF1*JF1	AM419163.1
hap_22	1	1207,1267	1174,1241	1199	1176		
hap_23	1						
hap_24	1						
hap_25	1						
hap_26	1						
hap_27	1	1326			1268	BF2*1501	AM282695.1
hap_28	1						
hap_29	1						
hap_30	1		1195	1244			
hap_31	1						
hap_32	1						
hap_33	1						
hap_34	1						
hap_35	1						
hap_36	1	1258		1174			
hap_37	1	1324		1192			
hap_38	1	1219,1273		1183			
hap_39	1	1185	1173				
hap_40	1						
hap_41	1						

Tabulka 8 – Identifikované haplotypy genů pro MHC I, jejich frekvence a odpovídající hodnoty elektroforetogramů RSCA

Jak je zřejmé z tabulky 8, přiřazení hodnot elektroforetogramů ke zjištěným haplotypům se ani zdaleka nepovedlo ve všech případech. Data získaná z RSCA analýzy (uvedená v příloze 1) totiž příliš neodpovídají nalezeným sekvencím.

Dále byly vytvořeny fylogenetické stromy, ve snaze určit, zda námi osekvenované haplotypy jsou geny BF1 nebo BF2. Proto byly do fylogenetického stromu zařazeny sekvence z našeho experimentu a také sekvence z literatury (Hosomichi et al. 2008). Byl vytvořen jeden strom ze sekvencí DNA a druhý ze sekvencí přeložených do aminokyselinové sekvence (sekvence aminokyselin jsou v příloze 2). Z obrázku 6 nejsou patrné samostatné clusterly pro BF1 ani BF2 geny ani u stromu konstruovaného ze sekvence DNA ani ze sekvence aminokyselin. Do tvorby fylogenetických stromů nebyly zahrnuté haplotypy hap_20 a hap_22, protože osekvenované sekvence byly příliš krátké (cca polovina délky všech ostatních haplotypů, přesto mají unikátní SNPs).

Analýza rekombinace proběhla na serveru Datamonkey.org. Analýza GARD (Genetic Algorithms for Recombination Detection) neodhalila žádné rekombinační zlomy. Naopak SBP (Single Breakpoint Recombination) analýza objevila jeden rekombinační zlom a to na 143 místě od začátku analyzované sekvence. Tato pozice leží na rozhraní exon-intron.



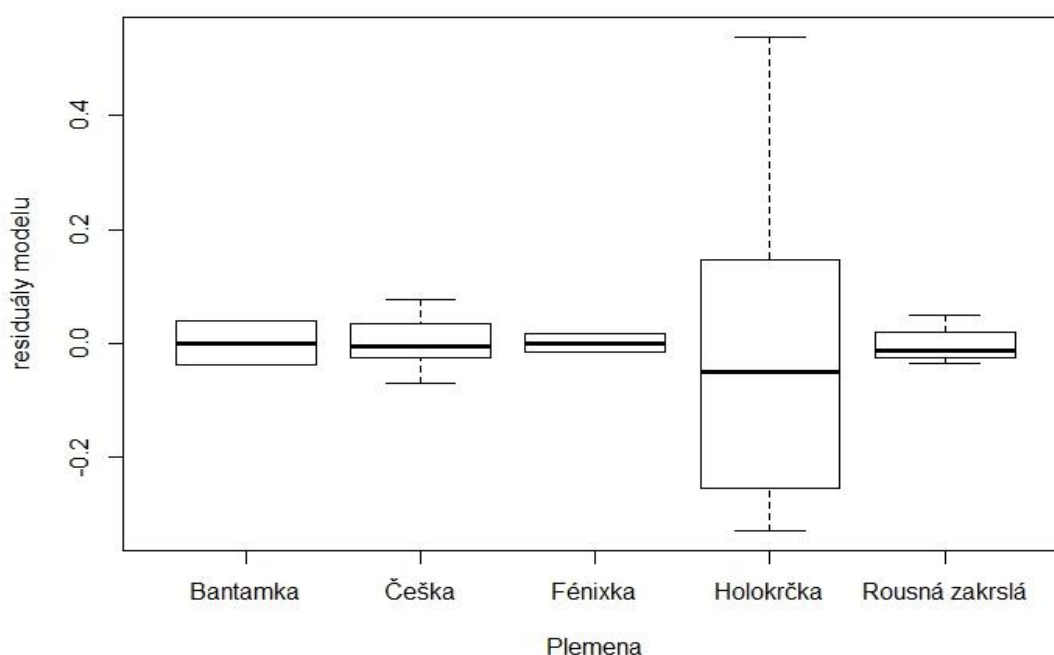
Obrázek 6 – *Fylogenetické stromy*

VI.2 Funkční analýza

VI.2.1 Variabilita otoků po aplikaci LPS u plemen slepic

Po aplikaci LPS do patagií kuřat jim byl změřeno oteklé patagium. Velikost otoku na manipulovaném křídle se signifikantně liší oproti kontrole – pravému, nemanipulovanému křídle ($t = 3.6766$, $df = 27.357$, $p\text{-value} = 0.001019$). Míra otékání tkáně je vysvětlena pomocí generalizovaného lineárního modelu zahrnujícího pouze jednu proměnou a to plemeno. Residuály modelu byly otestovány Shapiro-Wilkinsovým testem: $p\text{-hodnota} = 8.77e-05$. Residuály modelu byly použity k vytvoření grafu (Obrázek 7).

Po použití párového TukeyhoHSD testu byla dvojice plemen, jejichž otok se navzájem signifikantně liší, jsou holokrčky a rousné zakrslé ($p=0.0332452$) dále holokrčky a češky ($p=0.0244366$). Po vyřazení tohoto velmi variabilního plemene – holokrček (viz Obrázek 7), se mezi sebou dále marginálně nesignifikantně liší plemena rousné zakrslé a češky ($p=0.0657333$).

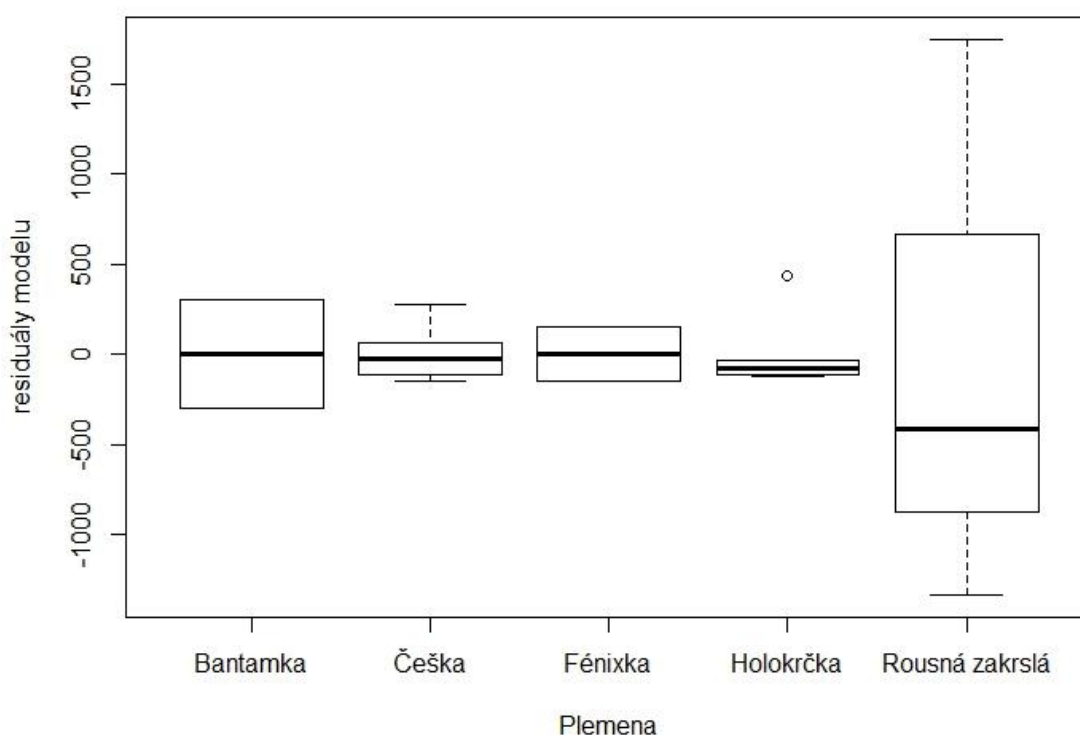


Obrázek 7 - Krabicový diagram ukazující na rozdíly v otocích patagií (jako závislost reziduí z MAM) po aplikaci LPS u vybraných plemen slepic

VI.2.1 Variabilita exprese IL-1 β u plemen slepic

Míra exprese IL-1b byla vysvětlena generalizovaným lineárním modelem. Minimální adekvátní model vysvětlovaná proměnná exprese IL-1b je vysvětlována pouze proměnou plemeno. Residuály modelu byly otestovány Shapiro-Wilkinsovým testem: p-hodnota = 4.621e-05. Residuály modelu byly použity k vytvoření grafu (Obrázek 8).

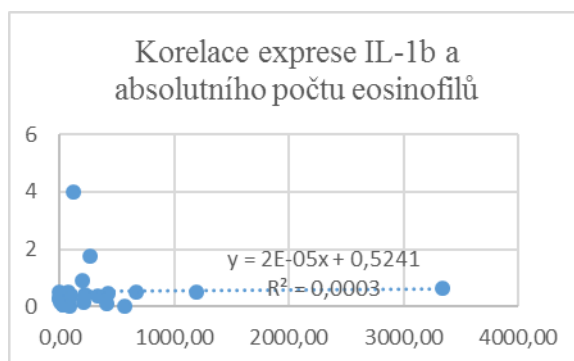
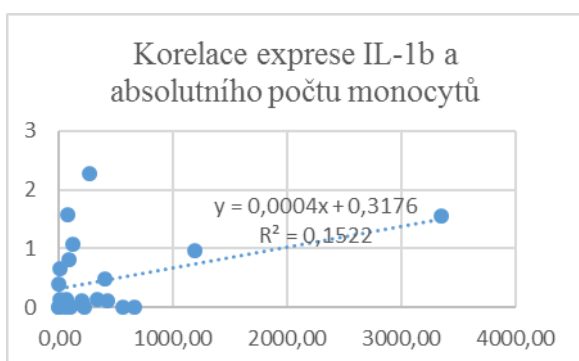
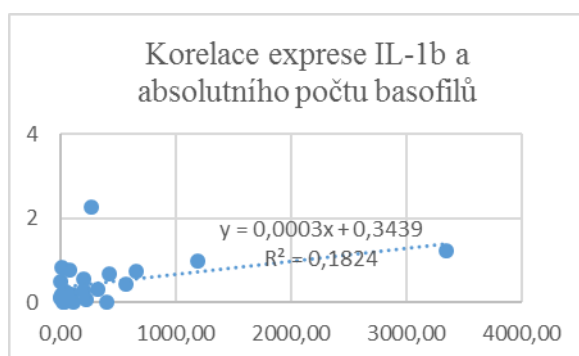
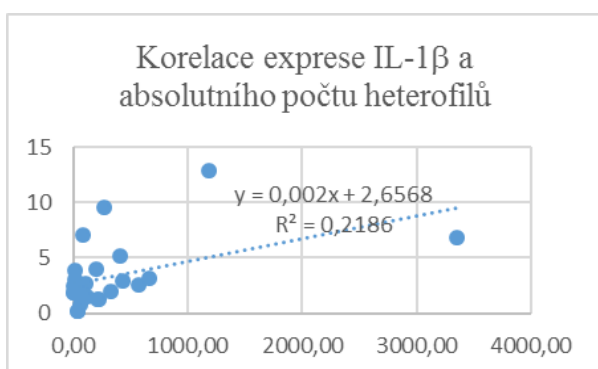
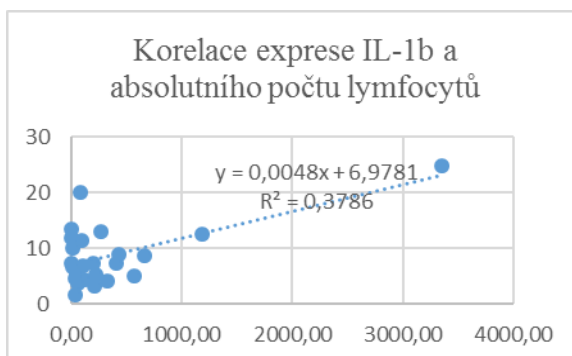
V párovém TukeyhoHDS testu vyšly signifikantně rozdílně dvojice těchto plemen: rousné zakrslé a češky (p=0,0045553), Rousné zakrslé a holokrčky (0,008877) a marginálně nesignifikantně rousné zakrslé a fénixky (p=0,0900126).



Obrázek 8 - Krabicový diagram ukazující na rozdíly exprese IL-1 β (jako závislost reziduí z MAM) po aplikaci LPS u vybraných plemen slepic

Pearsonova korelace exprese IL-1b se všemi měřenými proměnnými vyšla pouze marginálně nesignifikantně korelace s absolutním počtem lymfocytů: $R^2=0.6153$, adjusted p-value (Holms method) = 0,0563. Pearsonovy korelace se všemi ostatními proměnnými vyšly nesignifikantně. Byly vytvořeny grafy exprese IL-1b a absolutních počtů lymfocytů (Obrázek 9). Byl zjištěn korelace mezi Expresí IL-1b a absolutním počtem lymfocytů

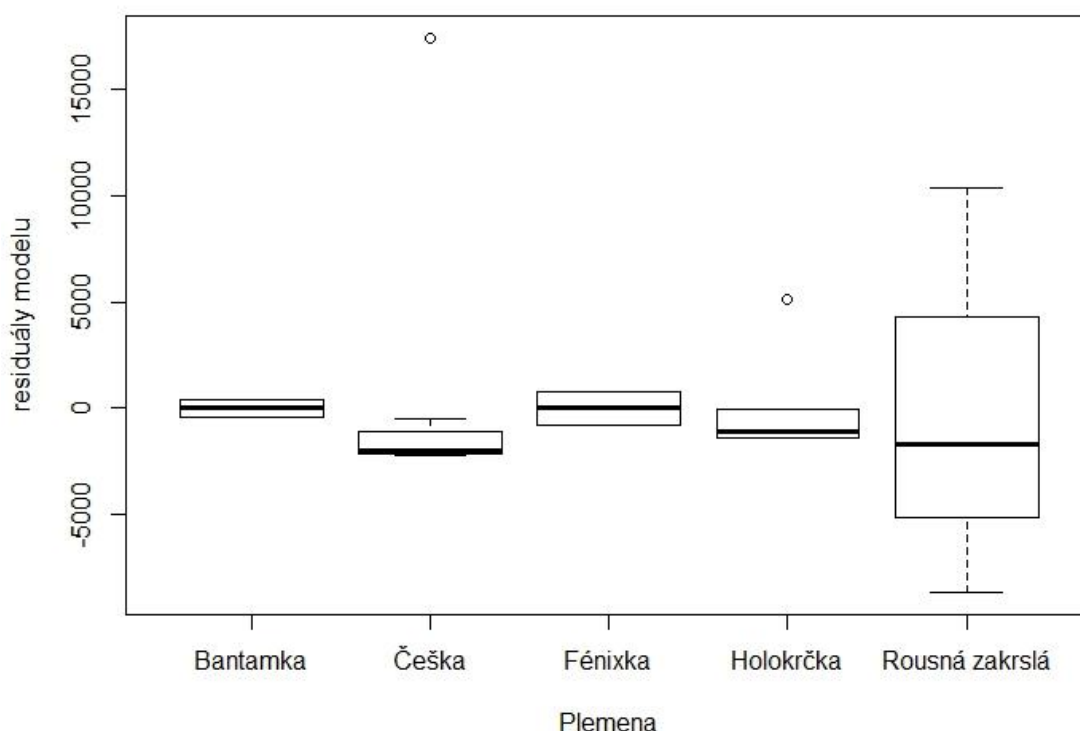
($R^2=0,3786$), absolutním počtem heterofilů ($R^2=0,2186$), absolutním počtem basofilů ($R^2=0,1824$) a absolutním počtem monocytů ($R^2=0,1522$).



Obrázek 9 – Korelace exprese IL-1 β a absolutních počtů leukocytů

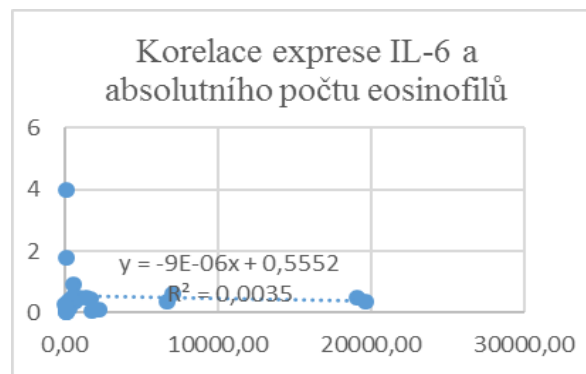
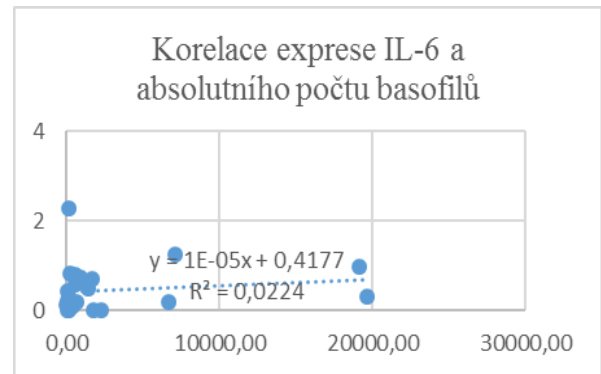
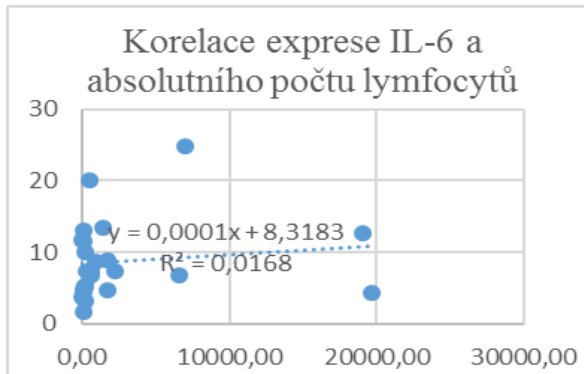
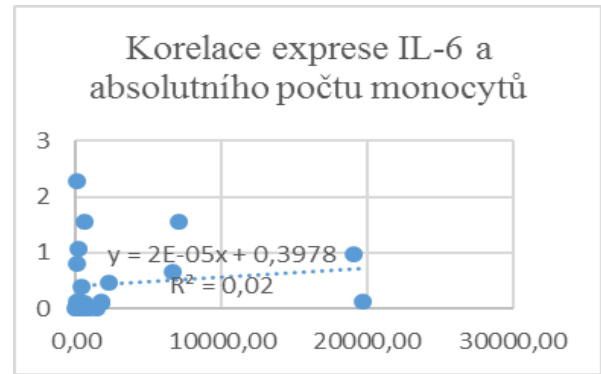
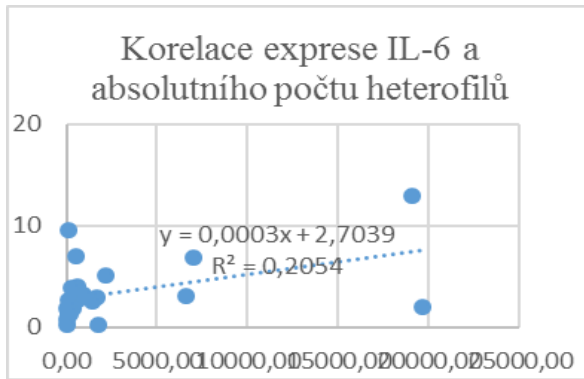
VI.2.3 Variabilita exprese IL-6 u plemen slepic

Míra exprese IL-6 byla vysvětlena generalizovaný lineární model, z všech měřených proměných v MAM zůstala akorát proměná plemeno. Residuály modelu byly otestovány Shapiro-Wilkinsovým testem: p-hodnota = 4.501e-06. Residuály modelu byly použity k vytvoření grafu (Obrázek 10). Tento model je ale pouze marginálně signifikantně odlišný od nulového modelu (F-kritérium = 0.06877).



Obrázek 10 - Krabicový diagram ukazující na rozdíly exprese IL-6 (jako závislost reziduí z MAM) po aplikaci LPS u vybraných plemen slepic

TukeyhoHSD ani Pearsnova korelační matice neodhalili žádné signifikantní vztahy. Nicméně v grafech vytvořených z dat proloženými spojnicí trendu byla zjištěna korelace s absolutním počtem heterofilů $R^2=0,2054$, jak je vidět na grafu, viz obrázek 11.



Obrázek 11 – Korelace exprese IL-6 a absolutních počtů leukocytů

V. Diskuze

V.1 Variabilita genů pro MHC I. třídy u plemen slepic

Byly osekvenovány zaklonované PCR produkty vazebného místa MHC I. třídy (intron 2 a 3 genů BF1 a BF2). Bylo identifikováno celkem 41 haplotypů a celkem 40 aminokyselinových variant u 24 jedinců. U sekvenovaných jedinců bylo nalezeno 2-8 haplotypů. Takovýto velký počet alel může být způsoben několika faktory. První je že použitá zvířata jsou hodně variabilní nejen proto, že jsou z několika různých plemen, ale variabilita může být způsobena vzájemným křížením plemen chovateli. To by mohlo vést ke genetickému toku imunitních genů, mezi které patří také MHC.

Vysoký počet nalezených haplotypů u některých jedinců (např. jedinci číslo 61, 62) naznačuje, že PCR reakce nemusela proběhnout optimálně. Je možné, že díky vysokému obsahu bází cytosinu a guaninu (GC párů), navíc uspořádaných do ostrůvků, se polymeráza tzv. „sklouzla“. Tedy že uprostřed reakce při přepisování intronu přestala fungovat. Fragment byl poté v dalším cyklu použit jako primer u jiného templátu. Tím mohly být použité PCR chybové produkty, které jsme potom osekvenovali a byly určeny jako haplotypy. Z toho vyplývá, že některé identifikované haplotypy mohou být pouze produktem sklouznutí polymerázy a mohou být složené po částech z jiných alel. To by se mohlo pravděpodobně týkat hlavně haplotypů, které byly v datasetu nalezeny jen jednou a zároveň nebyly nalezeny v databázi NCBI. Z 24 haplotypů, které byly osekvenovány pouze jednou byla v internetové databázi nalezena sekvence haplotypu hap_11. U ostatních, hap_03, hap_04, hap_08, hap_22-hap_41, je třeba předpokládat tyto haplotypy mohly vzniknout špatnou PCR reakcí. Touto chybou mohla být také zatížena data z genotypování metodou RSCA. Tím mohly být vygenerovány falešné haplotypy při sekvenování ale i při genotypování.

Zároveň je nutné poznamenat, že jsme díky metodě zaklonování PCR produktů do vektoru a jejich sekvenování lokus nespecifickými primery, nemuseli odhalit úplně všechny haplotypy u daného jedince. Dále je možné, že jsme se o nějakou variabilitu připravili, když jsme sekvence ořezali, abychom je měli všechny stejně dlouhé a mohli je srovnávat.

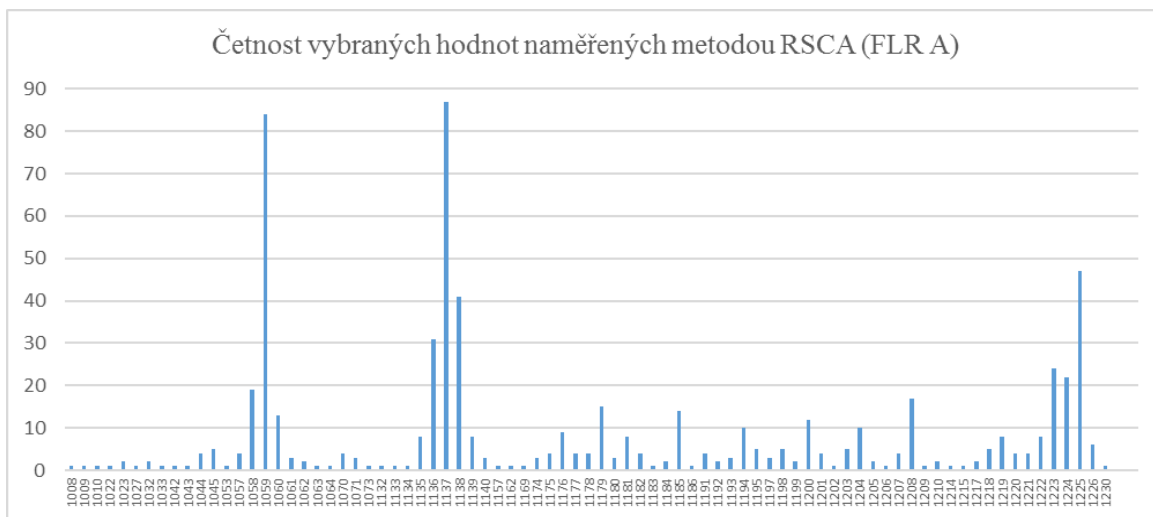
Jedním z cílů práce bylo přiřadit osekvenované haplotypy k datům získaným genotypováním RSCA. Naše RSCA data jsou velmi variabilní a složitá, jen obtížně jsme

vybírali pro zaklonování do vektoru a sekvenování jedince s jednoduchými a zároveň podobnými RSCA vzory peaků. Předpokládala jsem, že když mají dva jedinci jednu ze sekvencí shodnou, tak budou mít shodné alespoň některé hodnoty na elektroforetogramech RSCA. Tyto hodnoty se mi ale vždy nepodařilo nalézt.

Kvůli vysoké variabilitě RSCA jsem tedy nedokázala zcela využít potenciál genotypovací techniky RSCA, použila jsem postup optimalizovaný na laboratorních a komerčních liniích kura domácího. Moje vzorky jsou z ale rozmanitých slepic různých plemen z malochově, a tudíž jsou o dost variabilnější. Možná jsem měla zařadit do datasetu méně plemen a více jedinců na plemeno. RSCA data by byla pravděpodobně jednodušší a lépe by se podle nich haplotypy identifikovaly. Nebo úplně přeskočit genotypování RSCA metodou a osekvenovat MHC geny některou z metod sekvenování nové generace (NextGeneration Sequencing).

Dalším problémem metody RSCA by mohl být fakt, že jsme pro analýzu RSCA a následné sekvenování použili pokaždé jiné PCR produkty, mohlo se tedy stát, že jsem vlastně genotypovala jiné PCR produkty než jsem posléze sekvenovala. Chyby v PCR reakci mohly být totiž různé při množení daného úseku PCR reakcí před genotypováním metodou RSCA a před zaklonováním do vektoru a sekvenováním. Tyto PCR reakce proběhly každá v jiné laboratoři a s použitím jiné chemie. To může být důvodem, proč se nepodařilo k sekvencím přiřadit hodnoty z elektroforetogramů hybridizace ani s jednou FLR. Částečným řešením by bylo použít pro sekvenování stejné PCR produkty jako pro genotypování, bohužel ale všechny zůstaly v laboratoři profesora Jima Kaufmana, kde byla RSCA analýza z velké části provedena.

Dalším problémem přiřazování haplotypům k hodnotám elektroforetogramů je povaha RSCA dat, která jsem vyprodukovala. Hodnoty peaků nejsou vždy přesné, liší se trochu reakcí od reakce. Hodnoty v datasetu, spíše tvoří shluky podobných hodnot, než aby se určitá hodnota mnohokrát opakovala. Jak je patrné z obrázku četností naměřených dat RSCA (obrázek 12), někdy lze snadno určit, které hodnoty patří k sobě a které ne, jako v případě peaků kolem hodnoty 1059 na grafu četností, protože další shluky jsou číselně vzdálené. Další případy ale nejsou tak snadné, jako například peaky mezi hodnotami 1191-1210. Rozptýl shluků peaků je totiž větší než vzdálenost mezi různými shluky peaků. Proto jsem nemohla ve spoustě případů určit hodnoty peaků elektroforetogramů k osekvenovaným haplotypům. Kvůli těmto skutečnostem se mi také nepovedlo identifikovat haplotypy podle RSCA peaků, jak bylo plánováno.



Obrázek 12 - Graf četností vybraných hodnot RSCA pro FLR A

Snažila jsem se vytvořit fylogenetické stromy našich sekvencí a sekvencí stažených z databáze NCBI. Předpokládala jsem totiž, že by geny BF1 a BF2 mohly tvořit cluster, a já bych mohla identifikovat, zda mnou osekvenované haplotypy jsou BF1 nebo BF2 kopie genu pro MHC I. třídy. Podobně jako ve článku Worley et al. 2008 je v mých fylogenetických stromech několik menších clusterů, obsahujících pouze BF1 nebo BF2 geny. Nedokázala jsem však s jistotou určit, které geny jsou mnou osekvenované haplotypy.

Dalším zdrojem variability by mohla být rekombinace v genech pro MHC I. třídy. Rekombinace v tomto úseku je ale velmi vzácná. Velmi málo rekombinace bylo zaznamenáno vůbec v rámci celého B lokusu (Hála et al. 1988, Skjødt et al. 2008). SBP analýza našich sekvencí našla ale jeden rekombinační zlom, tento zlom ale nebyl potvrzen analýzou GARD. Navíc odhalený rekombinační zlom ale leží na intron-exon rozhraní, je tedy možné že tato analýza byla také zatížena chybou, sklouznutím polymerázy při PCR reakci.

Původně jsem měla v plánu genotypovat pro MHC I. třídy jedince, na kterých byly prováděny funkční experimenty a spojit variabilitu v MHC genech s variabilitou v zánětlivé odpovědi. Kvůli nezvládnutému interpretování RSCA jsem tuto analýzu pro další jedince již neprováděla.

V.2 Funkční analýza

Ve funkční analýze jsme sledovali změny ve tkáni po aplikaci LPS, který je složkou membrán gramnegativních bakterií a organismech vyvolává zánět. Sledovali jsme velikost otoku a expresi cytokinů IL-1b a IL-6 po 6 hodinách po injekci LPS.

Při analýze údajů měřených z otoků, bylo potvrzeno, že tkáň po injekci LPS signifikantně oteče a že exprese prozánětlivých cytokinů je vyšší než v nemanipulované, kontrolní tkáni. Dále jsem pomocí testování MAM zjistila, že velikost otoku a exprese obou zkoumaných cytokinů závisí na plemenu slepice. Je to způsobeno tím, že je v sledované proměnné vždycky jedno plemeno hodně variabilní (viz obrázky 7, 8, 10). V případě otoků jsou to holokrčky, v případě exprese obou sledovaných interleukinů jsou to rousné zakrslé. To bylo taky potvrzeno párovými TukeyHSD testy.

Dále jsem se zaměřila na korelace proměnných s absolutními počty leukocytů před aplikací LPS do tkáně. IL-1 β marginálně nesignifikantně koreluje s absolutním počtem lymfocytů. Když jsem proložila křivku trendu daty, ukázaly se i další, slabší korelace s heterofily, basofily i monocyty. Produkce IL-6 naopak koreluje pouze s absolutním počtem heterofilů v krvi. To by mohlo být interpretováno, že IL-6 je spíš exprimován imunitními buňkami, které již ve tkáni jsou a heterofily jako první obrannou linií zánětu, a IL-1b je exprimován spíše buňkami, které do místa zánětu migrují z krve po vypuknutí zánětu.

VI. Závěr

Kur domácí (*Gallus gallus f. domestica*) je nejdůležitější ptačí model ve vědě, jeden z nejprozkoumanějších ptáků vůbec, je to zároveň ekonomicky velice významný a díky chovu na jídlo extrémně rozšířený živočich, slepic je na Zemi více než lidí. V současnosti se chovají i zkoumají hlavně vysokoprodukční plemena nebo laboratorní linie, která ale nejsou příliš variabilní, převážná většina jich je odvozená z jednoho plemene – Leghornky. Variabilní slepice přetrvávají v malochovech, v plemenech chovaných pro zábavu. Tato plemena mají různou historii, tedy i různou genetickou výbavu. Genetická variabilita je důležitá pro životaschopnost celé populace. Variabilita imunitní odpovědi je výhodná i na úrovni jedince, heterozygotní imunitní geny umožňují rozpoznávat větší spektrum patogenů. V této diplomové práci jsem se zaměřila na variabilitu imunitní odpovědi u různých plemen slepic.

V této diplomové práci jsem se zaměřila nejprve na variabilitu genů pro MHC I. třídy u vybraných plemen slepic. Gen pro vazebné místo MHC I. třídy je dvakrát zkopírovaný. Byla použita genotypovací metoda RSCA pro 192 jedinců, 34 plemen od 47 chovatelů z České Republiky. Z těchto jedinců bylo vybráno pro sekvenování 24 jedinců 14 plemen. V nich jsem identifikovala 41 haplotypů, z toho sedm již známých z literatury. Tak vysoký počet alel u tak málo jedinců ukazuje na vysokou variabilitu genů pro MHC u plemen slepic.

Dále jsem se zaměřila na prozánětlivou aktivitu u plemen kura domácího. Aplikovala jsem subkutánně roztok lipopolysacharidu, sacharidu obsaženého v bakteriálních membránách, který běžně vyvolává zánět. Sledovala jsem velikost otoku a expresi prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-1 β po subkutánní aplikaci lipopolysacharidu. Výsledky naznačují, že velikost otoku po stimulaci a exprese obou prozánětlivých cytokinů se mezi plemeny liší.

Tato práce pravděpodobně kvůli malému množství vzorků a zaměření na plemena chovaná v České Republice popisuje jen zlomek variability imunitní odpovědi mezi plemeny slepic. Tím pádem zůstává spousta prostoru pro další výzkum.

Poděkování

Velice bych chtěla poděkovat mému školiteli RNDr. Michalu Vinklerovi, PhD. za vedení práce, cenné rady, nekonečnou trpělivost a vynaložený čas. Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi Mgr. Josefu Bryjovi, Ph.D. za inspiraci a nápady. Za pomoc při statistickém zpracování a konzultace děkuji Zuzaně Bainové. Se statistikou také výrazně pomáhala autorka hematologické analýzy Barbora Bílková. Dále bych chtěla poděkovat všem dalším kolegyním a kolegům z naší skupiny Ekologické a evoluční imunologie za připomínky, pomoc a podporu. Ještě je nutné poděkovat Anně Bryjové za pomoc a konzultace v laboratoři Ústavu biologie obratlovců AV ČR v detašovaném pracovišti Studenec, Jimu Kaufmanovi a Nicole Potts (Department of Pathology, University of Cambridge) za sdílení jejich know-how co se týče přípravy vzorků na genotypovací techniku RCSA a Marii-Eleně Mannerelli (University of Scheffield) za obsluhu sekvenátoru upraveného pro RCSA. Nesmím zapomenout na Grantové agentury tuzemské i zahraniční, bez jejichž financování by tato práce vůbec nemohla vzniknout. Nejvíce však děkuji celé mojí rodině a Tomáši Fabiánovi za finanční, materiální a hlavně psychickou podporu.

Seznam zkratk

BF	Gen pro MHC I. třídy, odvozeno od B locus, kde leží
bp	base pairs, pár bází
Ct	Cycle treshold
ddH ₂ O	Deionizovaná voda
DNA	Deoxyribonucleid acid, Deoxyribonukleová kyselina
FLR	Fluorescent labeled reference
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GARD	Genetic algoritmus for recombination detection
GLMs	Generalized linear models
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysacharid
MAM	Minimum adekvate model
MAMPs	Microbe associated molecular patterns
MHC	Major hisrocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
NCBI	The National Center for Biotechnology Information (internetová databáze)
PCR	Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PRR	Pattern recognition receptor
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction, kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	Ribonucleid acid, ribonukleová kyselina
RSCA	Reference strand-mediated conformational analysis
SBP	Single breakpoint recombination
TGF	Tumor growing factor
TNF	Tumor necrosis factor

Seznam zkratek aminokyselin a nukleových bází

Aminokyseliny

zkratka název

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

Nukleové báze

zkratka název

C	Cytosin
T	Thimin
G	Guanin
U	Uracil

Seznam tabulek

číslo tabulky		strana
1	Informace o FLRs	18
2	Sekvence nespecifických primerů amplifikujících část vazebného místa obou MHC 1 (BF1 a BF2) genů	18
3	Složení jedné PRC reakce před RSCA s použitím Velocity DNA polymerase	19
4	Složení jedné PRC reakce před zaklonováním do vektoru	21
5	Primery a proby použité na qPCR analýzy	24
6	Složení jedné PCR reakce pro kvantitativní PCR	25
7	Nalezené haplotypy u sekvenovaných jedinců	28
8	Identifikované haplotypy genů pro MHC I, jejich frekvence a odpovídající hodnoty elektroforetogramů RSCA	29

Seznam obrázků

číslo obrázku		strana
1	Schéma vázání peptidů na molekuly MHC I. třídy a vazba na CD8+ T lymfocyty	10
2	Struktura molekuly MHC I. třídy bez navázaného peptidu	10
3	B-region Kura domácího	12
4	Příklad Elektroforetogramů od jednoho jedince. První, největší peak vznikl hybridizací FLR (homoduplex), ostatní peaky jsou již hybridizace s různými sekvencemi vzorku (heteroduplexy)	20
5	Graf četností nalezených haplotypů MHC I. třídy	28
6	Fylogenetické stromy	31
7	Krabicový diagram ukazující na rozdíly v otocích patágií (jako závislost reziduí z MAM) po aplikaci LPS u vybraných plemen slepic	32
8	Krabicový diagram ukazující na rozdíly exprese IL-1b (jako závislost reziduí z MAM) po aplikaci LPS u vybraných plemen slepic	33
9	Korelace exprese IL-1b a absolutních počtů leukocytů	34
10	Krabicový diagram ukazující na rozdíly exprese IL-6 (jako závislost reziduí z MAM) po aplikaci LPS u vybraných plemen slepic	35
11	Korelace exprese IL-6 a absolutních počtů leukocytů	36
12	Graf četností vybraných hodnot RSCA pro FLR A	38

Literatura

- Addie, D. D., L. J. Kennedy, R. Ryvar, K. Willoughby, R. M. Gaskell, W. E. R. Ollier, P. Nart, and A. D. Radford. 2004. Feline leucocyte antigen class II polymorphism and susceptibility to feline infectious peritonitis. *Journal of feline medicine and surgery* 6:59–62.
- Alders, R. G., and R. A. E. Pym. 2009. Village poultry: still important to millions, eight thousand years after domestication. *World's Poultry Science Journal* 65:181.
- Angles, J. M., L. J. Kennedy, and N. C. Pedersen. 2005. Frequency and distribution of alleles of canine MHC-II DLA-DQB1, DLA-DQA1 and DLA-DRB1 in 25 representative American Kennel Club breeds. *Tissue Antigens* 66:173–184.
- Ashley, N. T., Z. M. Weil, and R. J. Nelson. 2012. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43:385–406.
- Bacon, L. D., and R. L. Witter. 1993. Influence of B-Haplotype on the Relative Efficacy of Marek's Disease Vaccines of Different Serotypes. *Avian Diseases* 37:53.
- Berthouly, A., A. Cassier, and H. Richner. 2008. Carotenoid-induced maternal effects interact with ectoparasite burden and brood size to shape the trade-off between growth and immunity in nestling great tits. *Functional Ecology* 22:854–863.
- Berthouly-Salazar, C., X. Rognon, T. N. Van, M. Gély, C. V. Chi, M. Tixier-Boichard, B. Bed'Hom, N. Bruneau, E. Verrier, J. C. Maillard, and J. R. Michaux. 2010. Vietnamese chickens: a gate towards Asian genetic diversity. *BMC genetics* 11:53.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:512–8.

- Corell, A., L. Pay, M. Little, M. Hoddinott, J. R. Argüello, M. Borton, C. Dunne, H. Ogilvie, J. O'Shea, J. a Madrigal, and S. G. Marsh. 2000. Reference strand mediated conformation analysis resolves HLA-DRB1 typing ambiguities when matching for unrelated bone marrow transplantation. *Tissue antigens* 56:82–6.
- Cotter, P. F., R. L. Taylor, and H. Abplanalp. 1992. Differential Resistance to *Staphylococcus aureus* Challenge in Major Histocompatibility (B) Complex Congenic Lines. *Poultry Science* 71:1873–1878.
- Cruse, J. M., and R. E. Lewis. 2009. *Illustrated Dictionary of Immunology*, Third Edition. CRC Press.
- Delport, W., A. F. Y. Poon, S. D. W. Frost, and S. L. Kosakovsky Pond. 2010a. Datamonkey 2010: A suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26:2455–2457.
- Delport, W., K. Scheffler, M. B. Gravenor, S. V. Muse, and S. K. Pond. 2010b. Benchmarking multi-rate codon models. *PLoS ONE* 5:3–7.
- Diehl, S., J. Anguita, A. Hoffmeyer, T. Zaptón, J. N. Ihle, E. Fikrig, and M. Rincón. 2000. Inhibition of Th1 Differentiation by IL-6 Is Mediated by SOCS1. *Immunity* 13:805–815.
- Eimes, J. a., K. M. Reed, K. M. Mendoza, J. L. Bollmer, L. a. Whittingham, Z. W. Bateson, and P. O. Dunn. 2013. Greater prairie chickens have a compact MHC-B with a single class IA locus. *Immunogenetics* 65:133–144.
- Giansanti, F., M. F. Giardi, and D. Botti. 2006. Avian cytokines--an overview. *Current pharmaceutical design* 12:3083–99.
- Gongora, J., N. J. Rawlence, V. A. Mobegi, H. Jianlin, J. A. Alcalde, J. T. Matus, O. Hanotte, C. Moran, J. J. Austin, S. Ulm, A. J. Anderson, G. Larson, and A. Cooper. 2008. Indo-European and Asian origins for Chilean and Pacific chickens revealed by mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:10308–10313.

- Hála, K., A.-M. Chausse, Y. Bourlet, O. Lassila, V. Hasler, and C. Auffray. 1988. Attempt to detect recombination between B-F and B-L genes within the chicken B complex by serological typing, in vitro MLR, and RFLP analyses. *Immunogenetics* 28:433–438.
- Hamal, K. R., R. F. Wideman, N. B. Anthony, and G. F. Erf. 2010. Differential gene expression of proinflammatory chemokines and cytokines in lungs of ascites-resistant and -susceptible broiler chickens following intravenous cellulose microparticle injection. *Veterinary immunology and immunopathology* 133:250–5.
- Hazuda, D. J., J. Strickler, F. Kueppers, P. L. Simon, and P. R. Young. 1990. Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease. *The Journal of biological chemistry* 265:6318–6322.
- Heggen, C. L., M. a Qureshi, F. W. Edens, and H. J. Barnes. 2000. Alterations in Macrophage-Produced Cytokines and Nitrite Associated with Poult Enteritis and Mortality Syndrome. *Avian Diseases* 44:59.
- Heinrich, P. ;, J. ; Castell, and T. Andus. 1990. INTERLEUKIN-6 AND THE ACUTE PHASE RESPONSE. *Biochemical journal* 265:621–636.
- Heller, E. D., Z. Uni, and L. D. Bacon. 1991. Serological evidence for major histocompatibility complex (B complex) antigens in broilers selected for humoral immune response. *Poultry science* 70:726–732.
- Hill, A. V. S. 1998. THE IMMUNOGENETICS OF HUMAN INFECTIOUS DISEASES. *Annual Review of Immunology* 16:593–617.
- Hillel, J., M. A. Groenen, M. Tixier-Boichard, A. B. Korol, L. David, V. M. Kirzhner, T. Burke, A. Barre-Dirie, R. P. Crooijmans, K. Elo, M. W. Feldman, P. J. Freidlin, A. Mäki-Tanila, M. Oortwijn, P. Thomson, A. Vignal, K. Wimmers, and S. Weigend. 2003. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics, selection, evolution : GSE* 35:533–557.
- Hong, Y. H., H. S. Lillehoj, S. H. Lee, R. a Dalloul, and E. P. Lillehoj. 2006. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and

- Eimeria tenella* infections. *Veterinary immunology and immunopathology* 114:209–23.
- Horton, R., L. Wilming, V. Rand, R. C. Lovering, E. a Bruford, V. K. Khodiyar, M. J. Lush, S. Povey, C. C. Talbot, M. W. Wright, H. M. Wain, J. Trowsdale, A. Ziegler, and S. Beck. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nature reviews. Genetics* 5:889–99.
- Hosomichi, K., M. M. Miller, R. M. Goto, Y. Wang, S. Suzuki, J. K. Kulski, M. Nishibori, H. Inoko, K. Hanzawa, and T. Shiina. 2008. Contribution of mutation, recombination, and gene conversion to chicken MHC-B haplotype diversity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181:3393–3399.
- Chaves, L. D., S. B. Krueth, and K. M. Reed. 2009. Defining the turkey MHC: sequence and genes of the B locus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183:6530–6537.
- Chomarat, P., J. Banchereau, J. Davoust, and a K. Palucka. 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology* 1:510–4.
- Jacob, J. P., S. Milne, S. Beck, and J. Kaufman. 2000. The major and a minor class II beta-chain (B-LB) gene flank the Tapasin gene in the B-F /B-L region of the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 51:138–47.
- Kaiser, P., L. Rothwell, E. E. Galyov, P. A. Barrow, J. Burnside, and P. Wigley. 2000. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiology (Reading, England)* 146 Pt 12:3217–26.
- Kaiser, P., G. Underwood, and F. Davison. 2003. Differential Cytokine Responses following Marek's Disease Virus Infection of Chickens Differing in Resistance to Marek's Disease. *Journal of Virology* 77:762–768.
- Kaufman, J. 2008. *The Avian MHC. Avian Immunology. Elsevier.*

- Kaufman, J. 2013. Antigen processing and presentation: evolution from a bird's eye view. *Molecular immunology* 55:159–61.
- Kaufman, J., J. Jacob, I. Shaw, B. Walker, S. Milne, S. Beck, and J. Salomonsen. 1999a. Gene organisation determines evolution of function in the chicken MHC. *Immunological reviews* 167:101–17.
- Kaufman, J., S. Milne, T. W. Göbel, B. a Walker, J. P. Jacob, C. Auffray, R. Zoorob, and S. Beck. 1999b. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature* 401:923–5.
- Kawai, T., and S. Akira. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology* 21:317–37.
- Khatri, M., J. M. Palmquist, R. M. Cha, and J. M. Sharma. 2005. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. *Virus Research* 113:44–50.
- Kishimoto, T., and T. Hirano. 1988. Molecular Regulation Of B Lymphocyte Response. *Annual Review of Immunology* 6:485–512.
- Klasing, K. C., and R. K. Peng. 1987. Influence of cell sources, stimulating agents, and incubation conditions on release of interleukin-1 from chicken macrophages. *Developmental & Comparative Immunology* 11:385–394.
- Laurent, F., R. Mancassola, S. Lacroix, R. Menezes, and M. Naciri. 2001. Analysis of chicken mucosal immune response to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infection by quantitative reverse transcription-PCR. *Infection and immunity* 69:2527–34.
- Liu, Y. P., G. S. Wu, Y. G. Yao, Y. W. Miao, G. Luikart, M. Baig, A. Beja-Pereira, Z. L. Ding, M. G. Palanichamy, and Y. P. Zhang. 2006. Multiple maternal origins of chickens: Out of the Asian jungles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:12–19.
- Lynagh, G. R., M. Bailey, and P. Kaiser. 2000. Interleukin-6 is produced during both murine and avian *Eimeria* infections. *Veterinary immunology and immunopathology* 76:89–102.

- Matzinger, P. 2007. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nature immunology* 8:11–3.
- Medzhitov, R., and C. a Janeway. 1997. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* 91:295–298.
- Miller, M. M., L. D. Bacon, K. Hala, H. D. Hunt, S. J. Ewald, J. Kaufman, R. Zoorob, and W. E. Briles. 2004. 2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. *Immunogenetics* 56:261–79.
- Muir, W. M., G. K.-S. Wong, Y. Zhang, J. Wang, M. a M. Groenen, R. P. M. a Crooijmans, H.-J. Megens, H. Zhang, R. Okimoto, A. Vereijken, A. Jungerius, G. a a Albers, C. T. Lawley, M. E. Delany, S. MacEachern, and H. H. Cheng. 2008. Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:17312–7.
- Murphy, K. M. 2011. *Janeway's Immunobiology*.
- Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846–52.
- Okamura, M., H. Lillehoj, R. Raybourne, U. Babu, and R. Heckert. 2004. Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella enteritidis* vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN- γ production. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 27:255–272.
- Pavel, I., and F. Tuláček. 2006. *Vzorník plemen drůbeže. Český svaz chovatelů*.
- Penn, D. J., K. Damjanovich, and W. K. Potts. 2002. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:11260–4.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:45e–45.

- Plackett, T. P., A. Colantoni, S. A. Heinrich, K. A. N. Messingham, R. L. Gamelli, and E. J. Kovacs. 2007. The Early Acute Phase Response After Burn Injury in Mice. *Journal of Burn Care & Research* 28:167–172.
- Potts, W. K., C. J. Manning, and E. K. Wakeland. 1994. The role of infectious disease, inbreeding and mating preferences in maintaining MHC genetic diversity: an experimental test. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 346:369–78.
- Qu, L., X. Li, G. Xu, K. Chen, H. Yang, L. Zhang, G. Wu, Z. Hou, G. Xu, and N. Yang. 2006. Evaluation of genetic diversity in Chinese indigenous chicken breeds using microsatellite markers. *Science in China Series C: Life Sciences* 49:332–341.
- Ramon, D. S., J. R. Argüello, S. T. Cox, a McWhinnie, a M. Little, S. G. Marsh, and J. a Madrigal. 1998. Application of RSCA for the typing of HLA-DPB1. *Human immunology* 59:734–47.
- Rincon, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig, and R. Flavell. 1997. Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4-producing CD4+ T Cells. *Journal of Experimental Medicine* 185:461–470.
- Ruan, W. K., Y. H. Wu, J. An, D. F. Cui, H. R. Li, and S. J. Zheng. 2012. Toll-like receptor 2 type 1 and type 2 polymorphisms in different chicken breeds. *Poultry science* 91:101–6.
- Ruan, W. K., and S. J. Zheng. 2011. Polymorphisms of chicken toll-like receptor 1 type 1 and type 2 in different breeds. *Poultry science* 90:1941–7.
- Sawai, H., H. L. Kim, K. Kuno, S. Suzuki, H. Gotoh, M. Takada, N. Takahata, Y. Satta, and F. Akishinonomiya. 2010. The origin and genetic variation of domestic chickens with special reference to junglefowls *Gallus g. gallus* and *G. varius*. *PloS one* 5:e10639.
- Sevimli, A., D. Misirlioğlu, A. Yağci, A. Bülbül, A. Yilmaztepe, and K. Altunbas. 2008. The role of chicken IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha in the occurrence of amyloid arthropathy. *Veterinary research communications* 32:499–508.

- Shaw, I., T. J. Powell, D. a Marston, K. Baker, A. van Hateren, P. Riegert, M. V Wiles, S. Milne, S. Beck, and J. Kaufman. 2007. Different evolutionary histories of the two classical class I genes BF1 and BF2 illustrate drift and selection within the stable MHC haplotypes of chickens. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178:5744–5752.
- Shiina, T., W. E. Briles, R. M. Goto, K. Hosomichi, K. Yanagiya, S. Shimizu, H. Inoko, and M. M. Miller. 2007. Extended gene map reveals tripartite motif, C-type lectin, and Ig superfamily type genes within a subregion of the chicken MHC-B affecting infectious disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178:7162–7172.
- Shiina, T., S. Shimizu, K. Hosomichi, S. Kohara, S. Watanabe, K. Hanzawa, S. Beck, J. K. Kulski, and H. Inoko. 2004. Comparative Genomic Analysis of Two Avian (Quail and Chicken) MHC Regions. *The Journal of Immunology* 172:6751–6763.
- Schou, T. W., a Permin, H. R. Juul-Madsen, P. Sørensen, R. Labouriau, T. L. H. Nguyễn, M. Fink, and S. L. Pham. 2007. Gastrointestinal helminths in indigenous and exotic chickens in Vietnam: association of the intensity of infection with the Major Histocompatibility Complex. *Parasitology* 134:561–573.
- Singh, K. K., M. Kumar, P. Kumar, M. K. Gupta, D. K. Jha, S. Kumari, B. K. Roy, and S. Kumar. 2012. “Free” copper: a new endogenous chemical mediator of inflammation in birds. *Biological trace element research* 145:338–48.
- Skjødt, K., C. Koch, M. Crone, and M. Simonsen. 2008. Analysis of chickens for recombination within the MHC (B-complex). *Tissue Antigens* 25:278–282.
- Svoboda, J., J. Plachý, J. Hejnar, I. Karakoz, R. V. Guntaka, and J. Geryk. 1992. Tumor induction by the LTR, v-src, LTR DNA in four B (MHC) congenic lines of chickens. *Immunogenetics* 35.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731–2739.

- The MHC sequencing consortium. 1999. No Title. *Nature* 401:921–923.
- Van de Veerdonk, F. L., M. G. Netea, C. a Dinarello, and L. a B. Joosten. 2011. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends in immunology* 32:110–6.
- Villesen, P. 2007. FaBox: An online toolbox for FASTA sequences. *Molecular Ecology Notes* 7:965–968.
- Vinkler, M., J. Svobodová, B. Gabrielová, H. Bainová, and A. Bryjová. 2014. Cytokine expression in phytohaemagglutinin-induced skin inflammation in a galliform bird. *Journal of Avian Biology* 45:43–50.
- Walker, B. A., L. G. Hunt, A. K. Sowa, K. Skjodt, T. W. Gobel, P. J. Lehner, and J. Kaufman. 2011. The dominantly expressed class I molecule of the chicken MHC is explained by coevolution with the polymorphic peptide transporter (TAP) genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Wallny, H.-J., D. Avila, L. G. Hunt, T. J. Powell, P. Riegert, J. Salomonsen, K. Skjødt, O. Vainio, F. Vilbois, M. V Wiles, and J. Kaufman. 2006. Peptide motifs of the single dominantly expressed class I molecule explain the striking MHC-determined response to Rous sarcoma virus in chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:1434–9.
- Wang, B., R. Ekblom, T. Strand, S. Portela-Bens, and J. Hoglund. 2012. Sequencing of the core MHC region of black grouse (*Tetrao tetrix*) and comparative genomics of the galliform MHC. *BMC Genomics* 13:553.
- Worley, K., J. Collet, L. G. Spurgin, C. Cornwallis, T. Pizzari, and D. S. Richardson. 2010. MHC heterozygosity and survival in red junglefowl. *Molecular ecology* 19:3064–75.
- Worley, K., M. Gillingham, P. Jensen, L. J. Kennedy, T. Pizzari, J. Kaufman, and D. S. Richardson. 2008. Single locus typing of MHC class I and class II B loci in a population of red jungle fowl. *Immunogenetics* 60:233–47.

Ye, Q., K. He, S. Y. Wu, and Q. H. Wan. 2012. Isolation of a 97-kb minimal essential MHC B locus from a new reverse-4D BAC library of the golden pheasant. PLoS ONE 7.

Zelano, B., and S. V Edwards. 2002. An MHC component to kin recognition and mate choice in birds: predictions, progress, and prospects. *The American naturalist* 160 Suppl :S225–37.

Přílohy

Příloha 1

RSCA data jedinců, jejichž BF geny byly sekvenovány

Příloha 2

Alignment haplotypů přeložený do aminokyselinové sekvence