



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE
INDIRIZZO BIOMOLECOLARE

*POLIMORFISMI NEI GENI TOLL-LIKE
RECEPTOR 2, 4 E 6 IN BOS TAURUS*

RELATORE

Prof. Giorgio Pranterà

CORRELATORE

Dott. Lorraine Pariset

LAUREANDO

Marco Mariotti

matr. 1519

CONTRORELATORE

Prof. Pasquale Mosesso

ANNO ACCADEMICO 2006 – 2007

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag.	1
1.1 Il sistema immunitario	pag.	1
1.1.1 Le basi cellulari dell'immunità	pag.	2
1.1.2 Teoria della selezione clonale	pag.	3
1.1.3 La memoria immunologia	pag.	4
1.1.4 I recettori per le cellule T	pag.	5
1.1.5 Le superfici epiteliali aiutano a prevenire le infezioni	pag.	6
1.1.6 Le cellule riconoscono caratteristiche conservate dei patogeni	pag.	8
1.1.7 Le cellule fagocitiche inglobano e distruggono i patogeni	pag.	9
1.1.8 I macrofagi attivati reclutano ulteriori cellule fagocitiche nei siti di infezione	pag.	10
1.2 La scoperta dei Toll-like receptors	pag.	11
1.2.1 Il ruolo critico del <i>TLR</i>	pag.	14
1.2.2 <i>TLR2</i>	pag.	18
1.2.3 <i>TLR4</i>	pag.	18
1.2.4 <i>TLR6</i>	pag.	19
1.2.5 I <i>TLR</i> bovini	pag.	20
1.3 L'informazione genetica	pag.	21
1.3.1 Marcatori genetici	pag.	22
1.3.2 Marcatori molecolari	pag.	23
1.3.3 SNPs	pag.	23
1.4 Malattie	pag.	25
1.4.1 IBR	pag.	25
1.4.2 Mastite	pag.	25
1.4.3 Enterite	pag.	26
1.4.4 Para-tubercolosi	pag.	26

2. SCOPO DELLA TESI	pag.	28
3. MATERIALI E METODI	pag.	30
3.1 Campionamento	pag.	30
3.2 Estrazione del DNA	pag.	33
3.3 Elettroforesi su gel di agarosio	pag.	34
3.4 Disegno dei primers	pag.	34
3.5 Polymerase chain reaction (PCR)	pag.	36
3.6 Purificazione dei prodotti PCR	pag.	37
3.7 Reazione di sequenziamento	pag.	37
3.8 Purificazione dei prodotti di sequenziamento	pag.	38
3.9 Caricamento e corsa su sequenziatore automatico	pag.	39
3.10 Analisi ed allineamento delle sequenze	pag.	39
3.11 Analisi statistica	pag.	39
4. RISULTATI	pag.	41
4.1 Identificazione di SNP nei <i>TLR</i>	pag.	41
4.2 Frequenza degli SNPs negli animali malati	pag.	43
4.2.1 Analisi campioni con IBR	pag.	43
4.2.2 Analisi campioni con Mastite	pag.	45
4.2.3 Analisi campioni con Enterite	pag.	47
4.2.4 Analisi campioni con malattie batteriche	pag.	48
4.3 Frequenza dei polimorfismi in razze bovine europee	pag.	51
5. DISCUSSIONE	pag.	58
5.1 Associazione tra polimorfismi e malattie	pag.	58
5.2 Frequenza dei polimorfismi in razze bovine europee	pag.	60
6. CONCLUSIONI	pag.	62
7. BIBLIOGRAFIA	pag.	63

1. INTRODUZIONE

1.1 Il sistema immunitario

Tutti i vertebrati possiedono un sistema immunitario che risulta fondamentale per la sopravvivenza dell'individuo, poiché permette la difesa contro un gran numero di agenti infettivi: batteri, virus, funghi e parassiti.

L'immunità ha due caratteristiche principali: un'alta specificità, per esempio contro un particolare virus, e la capacità di distinguere molecole estranee da molecole non estranee.

Quasi ogni macromolecola, se estranea per il ricevente, può indurre una risposta immunitaria; ogni sostanza capace di scatenare una risposta immunitaria viene definita antigene (da antibody generator). Il sistema immunitario può distinguere antigeni molto simili, come proteine che differiscono solo per un amminoacido o due isomeri ottici della stessa molecola.

Esistono due ampie classi di risposte immunitarie:

- risposte anticorpali;
- risposte immunitarie mediate da cellule.

Le risposte anticorpali comportano la produzione di proteine specifiche (immunoglobuline) con funzione di anticorpo; queste circolano nel torrente ematico e permeano gli altri fluidi corporei, dove si legano specificamente agli antigeni estranei che hanno indotto la loro produzione. Il legame con gli anticorpi inattiva i virus e le tossine batteriche bloccando la loro capacità di

interagire con recettori presenti nelle cellule dell'ospite; inoltre il legame rende i microrganismi invasori riconoscibili, in modo che possano essere distrutti.

Le risposte immunitarie mediate da cellule coinvolgono la produzione di cellule specializzate che reagiscono con gli antigeni estranei localizzati sulla superficie di altre cellule dell'ospite (Alberts et al., 2004).

1.1.1 Le basi cellulari dell'immunità

Le cellule responsabili della specificità immunitaria appartengono ad una classe di globuli bianchi detti linfociti. Essi si trovano in grande quantità nel sangue, nella linfa e negli organi linfoidei, come il timo, i linfonodi, la milza e l'appendice.

Durante gli anni '60 si scoprì che le due principali categorie di risposte immunitarie sono mediate da classi differenti di linfociti:

- *le cellule T*, che si sviluppano nel timo, sono responsabili dell'immunità mediata da cellule.
- *le cellule B*, che nei mammiferi si sviluppano nel midollo osseo dell'adulto e nel fegato fetale, producono anticorpi.

Cellule T e B non stimolate (a riposo) sono molto simili sia al microscopio ottico che al microscopio elettronico: entrambe sono piccole, appena più grandi dei globuli rossi del sangue e sono quasi per intero occupate dal nucleo. Esse diventano morfologicamente distinguibili solamente dopo essere state stimolate da un antigene.

Le *cellule B* attivate si sviluppano in cellule che secernono anticorpi, le più mature delle quali sono le *plasmacellule*, che sono dotate di un esteso reticolo endoplasmatico rugoso. Al contrario, le *cellule T* attivate contengono molto

poco reticolo endoplasmatico e non secernono anticorpi, ma secernono vari mediatori detti *linfocine*, *interleuchine* o *citochine* (Alberts et al., 2004).

1.1.2 Teoria della selezione clonale

La caratteristica più rilevante del sistema immunitario consiste nel fatto che può rispondere a milioni di antigeni estranei differenti in una maniera altamente specifica. Il modo in cui ciò si verifica incominciò ad essere compreso negli anni '50 in seguito alla formulazione della *teoria della selezione clonale*.

Secondo questa teoria, ogni animale dapprima genera casualmente una notevole varietà di linfociti e, poi, quelle cellule che reagiscono contro antigeni estranei che l'animale incontra realmente vengono specificamente selezionate perchè possano svolgere la loro funzione. La teoria si basa sull'assunto che nel corso dello sviluppo ogni linfocita sia già indirizzato a reagire con un determinato antigene ancora prima di essere stato esposto ad esso. Ogni cellula manifesta questa predisposizione sotto forma di proteine recettoriali della superficie cellulare che sono complementari all'antigene in maniera specifica. L'interazione dell'antigene con i recettori attiva la cellula e fa sì che essa proliferi e maturi. Quindi, un antigene estraneo stimola selettivamente quelle cellule che esprimono recettori complementari specifici per l'antigene e che, quindi, sono già indirizzate a rispondere all'antigene stesso. Questo è ciò che rende le risposte immunitarie specifiche per l'antigene.

La maggior parte delle macromolecole, ivi comprese praticamente tutte le proteine e molti polisaccaridi, può svolgere funzioni di antigene. Quelle porzioni di un antigene che interagiscono con il sito deputato al legame per l'antigene stesso presente su una molecola anticorpale o su un recettore linfocitario sono dette determinanti antigenici o epitopi. Gli antigeni possono avere vari

determinanti antigenici che stimolano la produzione di anticorpi o di risposte immunitarie da parte delle *cellule T*. Alcuni determinanti sono più antigenici di altri, così che la reazione contro di essi può dominare l'intera risposta, e vengono detti immunodominanti (Alberts et al., 2004).

1.1.3 La memoria immunologica

Il sistema immunitario, come il sistema nervoso, è dotato di memoria. Questo è il motivo per cui nei vertebrati si sviluppa un'immunità nei confronti di molte malattie virali comuni, che dura tutta la vita. Se un animale viene iniettato una volta con l'antigene A, la sua risposta immunitaria compare dopo un periodo di latenza della durata di diversi giorni, aumenta rapidamente ed esponenzialmente e, poi, più gradualmente, diminuisce di nuovo. Questo è l'andamento caratteristico di una risposta immunitaria primaria, che avviene in seguito ad una prima esposizione dell'animale ad un antigene. Se dopo alcune settimane, o mesi, o anche anni, l'animale viene reiniettato con l'antigene A, esso genera di solito una risposta immunitaria secondaria, che è molto differente dalla risposta primaria: il periodo di latenza è più corto e la risposta è più intensa. Quindi, la risposta secondaria rispecchia una memoria immunologica specifica per l'antigene A.

In un animale adulto, le *cellule T* e *B* degli organi linfoidi secondari sono una miscela di cellule presenti in almeno tre stadi di maturazione: cellule vergini, cellule della memoria e cellule attivate. Quando le cellule vergini incontrano un antigene per la prima volta, alcune di esse vengono stimulate a moltiplicarsi e diventare cellule attivate. Queste sono cellule che sono attivamente coinvolte nel realizzare una risposta. Altre cellule vergini vengono, invece, stimulate a moltiplicarsi e a maturare in cellule della memoria, cioè cellule che non

producono esse stesse una risposta, ma che vengono rapidamente indotte ad attivarsi in seguito ad un incontro successivo con lo stesso antigene. Pertanto, la memoria immunitaria viene generata durante la risposta primaria in parte perchè la proliferazione delle cellule vergini scatenata dall'antigene crea molte cellule della memoria, un processo noto come espansione clonale, e in parte perchè le cellule vergini si differenziano in cellule della memoria che sono in grado di rispondere più rapidamente all'antigene rispetto alle cellule vergini (Alberts et al., 2004).

1.1.4 I recettori per le cellule T

Le *cellule T* differiscono dalle *cellule B* per molti aspetti importanti. Innanzitutto, agiscono soltanto a breve raggio, poiché le *cellule T* interagiscono direttamente con un'altra cellula dell'organismo che possono uccidere o con cui possono scambiare segnali; al contrario le *cellule B* secernono anticorpi che possono agire a distanza. Inoltre, le *cellule T* sono specializzate a riconoscere un antigene estraneo soltanto quando è presente sulla superficie di una cellula bersaglio. Per tale ragione, la forma dell'antigene riconosciuta dalle *cellule T* è differente da quella riconosciuta dalle *cellule B*: mentre le *cellule B* riconoscono antigeni interi, le *cellule T* riconoscono frammenti peptidici appartenenti ad antigeni proteici che sono stati parzialmente degradati all'interno della cellula bersaglio e, poi, trasportati alla superficie cellulare e qui presentati.

Esistono due classi principali di *cellule T*:

- le *cellule T citotossiche*, che uccidono direttamente le cellule infettate da un virus o da qualche altro microrganismo intracellulare;
- le *cellule T helper*, che contribuiscono a stimolare le risposte di altre cellule.

Poiché le risposte delle *cellule T* dipendono dal contatto diretto con una cellula bersaglio, i recettori per l'antigene prodotti dalle *cellule T*, diversamente dagli anticorpi prodotti dalle *cellule B*, esistono solo in forma legata alla membrana e non vengono secreti. Proprio per questa ragione, sono stati isolati con difficoltà e non vennero identificati biochimicamente fino al 1983.

Sulle *cellule T*, sia *citotossiche* che *helper*, i recettori sono composti da due catene polipeptidiche (dette α e β) unite da ponti disolfuro, ciascuna delle quali contiene due domini del tipo *Ig* che condividono con gli anticorpi la proprietà di possedere una regione amminoternale variabile e una regione carbossiterminale costante. Una piccola minoranza delle cellule T, invece di produrre catene α e β , produce un tipo diverso di recettore eterodimerico composto da catene γ e δ . Queste cellule vengono generate in stadi di sviluppo precoce e si trovano principalmente negli epiteli, laddove sono in grado di assicurare una prima linea di difesa contro i microrganismi che cercano di penetrare attraverso questi fogli di cellule (Alberts et al., 2004).

1.1.5 Le superfici epiteliali aiutano a prevenire le infezioni

Nei vertebrati, la pelle e altre superfici epiteliali, comprese quelle che rivestono polmoni e intestino, forniscono una barriera fisica fra l'interno del corpo e il mondo esterno. Giunzioni strette fra cellule vicine impediscono un facile ingresso ai patogeni potenziali. Le superfici epiteliali interne sono rivestite anche da uno strato di muco che protegge queste superfici dagli insulti microbici, meccanici e chimici; molti anfibi e pesci hanno uno strato mucoso che ne riveste la pelle. Il rivestimento di muco mucillaginoso è costituito soprattutto da *mucina* secreta e da altre glicoproteine e aiuta fisicamente ad

impedire ai patogeni di aderire all'epitelio, oltre a facilitare la loro eliminazione da parte di ciglia battenti delle cellule epiteliali.

Lo strato di muco contiene anche sostanze che uccidono i patogeni o ne inibiscono la crescita. Fra le più abbondanti vi sono peptidi antimicrobici, chiamati *difensine*, che si trovano in tutti gli animali e in tutti i vegetali. Essi sono generalmente corti (15-50 amminoacidi), carichi positivamente e hanno domini idrofobici o anfipatici nella loro struttura ripiegata. Costituiscono una famiglia diversificata con un ampio spettro di attività antimicrobica, compresa la capacità di uccidere o di inattivare batteri *Gram-negativi* e *Gram-positivi*, funghi (compresi i lieviti), parassiti (compresi protozoi e nematodi) e persino virus provvisti di involucro come l'*HIV*. Le *difensine* sono anche il tipo di proteina più abbondante nei neutrofili, che le usano per uccidere i patogeni fagocitati.

Non è ancora chiaro il modo in cui le *difensine* uccidono i patogeni. Una possibilità è che usino i loro domini idrofobici o anfipatici per inserirsi nella membrana delle loro vittime, distruggendo così l'integrità della membrana. Una parte della loro selettività per i patogeni rispetto alle cellule dell'ospite può derivare dalla loro preferenza per membrane che non contengono colesterolo. Dopo aver distrutto la membrana del patogeno, i peptidi carichi positivamente possono interagire anche con vari bersagli carichi negativamente dentro il microbo, compreso il DNA. A causa della natura relativamente non specifica dell'interazione fra le *difensine* e i microbi che uccidono, è difficile per i microbi acquisire una resistenza alle *difensine*. Così, in linea di principio, le *difensine* potrebbero essere agenti terapeutici utili per combattere le infezioni, da sole o in combinazione con farmaci più tradizionali.

1.1.6 Le cellule riconoscono caratteristiche conservate dei patogeni

I microrganismi ogni tanto superano le barricate epiteliali, il sistema immunitario innato e quello adattativo devono riconoscerli e distruggerli, senza danneggiare l'ospite. Di conseguenza, i sistemi immunitari devono essere capaci di distinguere ciò che è proprio da ciò che è estraneo. Il sistema immunitario innato si basa sul riconoscimento di tipi particolari di molecole che sono comuni a molti patogeni ma sono assenti nell'ospite.

Queste molecole associate ai patogeni (chiamate *immunostimolanti associati ai patogeni*) stimolano due tipi di risposte immunitarie innate:

- le risposte infiammatorie;
- la fagocitosi da parte di cellule come neutrofili e macrofagi.

Gli *immunostimolanti associati ai patogeni* sono di vari tipi. L'inizio della traduzione nei procarioti differisce dall'inizio della traduzione negli eucarioti in quanto in genere si usa come primo amminoacido la *formilmetionina* invece della normale *metionina*. I peptidi che contengono *formilmetionina* all'N-terminale saranno tutti di origine batterica, e agiscono da potenti chemoattraenti per i neutrofili, che migrano rapidamente verso la fonte di questi peptidi e inglobano i batteri che li stanno producendo.

Inoltre, la superficie esterna di molti microrganismi è composta da molecole che non esistono nei loro ospiti multicellulari e anche queste molecole agiscono da immunostimolanti. Esse comprendono la parete cellulare di peptidoglicano e i flagelli dei batteri, oltre al lipopolisaccaride (LPS) sui batteri *Gram-negativi* e gli acidi teicoici sui batteri *Gram-positivi* e comprendono anche molecole delle pareti cellulari di funghi come *zimosano*, *glucano* e *chitina*.

Anche brevi sequenze di DNA batterico possono agire da immunostimolanti, come il "*motivo CpG*" che consiste in un dinucleotide non metilato CpG

fiancheggiato da due purine al 5' e da due pirimidine al 3', questa breve sequenza è almeno venti volte meno comune nel DNA dei vertebrati rispetto a quello batterico.

Le varie classi di immunostimolanti associati ai patogeni si trovano spesso sulla superficie del patogeno in schemi ripetitivi. Essi sono riconosciuti da parecchi tipi di recettori dedicati dell'ospite, che sono chiamati collettivamente *recettori di riconoscimenti di schemi*.

Questi recettori comprendono recettori solubili nel sangue (componenti del sistema del complemento) e recettori legati a membrane sulla superficie delle cellule dell'ospite (membri della *famiglia dei recettori Toll-like, TLR*). I recettori di superficie hanno due funzioni: iniziano la fagocitosi del patogeno e stimolano un programma di espressione genica nella cellula dell'ospite per stimolare le risposte immunitarie innate. I recettori solubili aiutano anch'essi la fagocitosi e, in alcuni casi, l'uccisione diretta del patogeno.

1.1.7 Le cellule fagocitiche inglobano e distruggono i patogeni

In tutti gli animali, invertebrati e vertebrati, il riconoscimento di un invasore microbico è in genere seguito rapidamente dal suo inglobamento da parte di una cellula fagocitica. I vegetali mancano invece di questo tipo di risposta immunitaria innata. Nei vertebrati, i *macrofagi* risiedono nei tessuti di tutto il corpo e sono particolarmente abbondanti in aree in cui è probabile che si verifichino infezioni, per esempio polmoni e intestino. Essi sono presenti in gran numero nei tessuti connettivi, nel fegato e nella milza. Queste cellule a lunga vita pattugliano i tessuti del corpo e sono fra le prime cellule a incontrare i microbi invasori. La seconda famiglia principale di cellule fagocitiche nei vertebrati, i neutrofili, sono cellule a vita breve, abbondanti nel sangue ma non

presenti nei tessuti normali sani. Essi sono reclutati rapidamente in corrispondenza dei siti di infezione sia da *macrofagi* attivati da molecole, come peptidi che contengono *formilmetionina*, rilasciate dagli stessi microbi.

I *macrofagi* e i *neutrofili* mostrano una varietà di recettori di superficie, che li rendono in grado di riconoscere e di inglobare i patogeni, fra i quali sono inclusi *recettori di riconoscimento di schemi* come i *TLR*.

I *TLR* sono abbondanti sulla superficie di *macrofagi* e *neutrofili*, oltre che sulle cellule epiteliali che rivestono polmoni e intestino. Essi agiscono da sistema di allarme per avvisare sia il sistema immunitario innato che quello adattativo che si sta formando un'infezione. Molecole correlate a *Toll* e ai *TLR* sono chiaramente coinvolte nell'immunità innata in tutti gli organismi multicellulari. Nei vegetali, proteine con ripetizioni ricche di *leucina* e con domini omologhi alla porzione citosolica dei *TLR* sono necessari per la resistenza a patogeni fungini, batterici e virali.

Così, almeno due componenti del sistema immunitario innato, le *defensine* e i *TLR*, sembrano essere evolutivamente molto antiche, forse antecedenti alla divisione fra animali e vegetali più di un miliardo di anni fa. La loro conservazione durante l'evoluzione indica l'importanza di queste risposte innate nella difesa contro i patogeni microbici (Alberts et al., 2004).

1.1.8 I macrofagi attivati reclutano ulteriori cellule fagocitiche nei siti di infezione

Quando un patogeno invade un tessuto, quasi sempre suscita una risposta infiammatoria. Questa risposta è caratterizzata da dolore, rossore, calore e gonfiore nel sito di infezione, tutti causati da cambiamenti nei vasi sanguigni locali. I vasi sanguigni si dilatano e diventano permeabili a fluido e proteine,

portando a rigonfiamento locale e a un accumulo di proteine nel sangue che aiutano nella difesa, compresi i componenti della cascata del complemento. Contemporaneamente, le cellule endoteliali che rivestono i vasi sanguigni locali sono stimulate ad esprimere proteine di adesione cellulare che facilitano l'attacco e lo stravasamento di globuli bianchi, fra i quali neutrofili, linfociti e monociti.

La risposta infiammatoria è mediata da una molteplicità di molecole di segnalazione. L'attivazione dei *TLR* porta alla produzione sia di molecole di segnalazione lipidiche, come le *prostaglandine*, che di molecole di segnalazione proteiche come le *citochine*, le quali contribuiscono tutte alla risposta infiammatoria. Il rilascio proteolitico di frammenti del complemento contribuisce anch'esso alla risposta infiammatoria. Alcune *citochine* prodotte dai *macrofagi* attivati sono chemoattraenti (note come *chemochine*). Alcune di queste attraggono *neutrofili*, che sono le prime cellule reclutate in gran numero nel sito della nuova infezione. Altre attraggono più tardi *monociti* e *cellule dendritiche*. Le *cellule dendritiche* raccolgono antigeni dei patogeni invasori e li portano a linfonodi nelle vicinanze, dove presentano gli antigeni ai linfociti per arruolare le forze del sistema immunitario adattativo.

Altre citochine scatenano la febbre, un aumento della temperatura corporea. La febbre aiuta di fatto il sistema immunitario nella lotta contro l'infezione, in quanto la maggior parte dei patogeni batterici e virali cresce meglio a temperature più basse, mentre le risposte immunitarie adattative sono più potenti a temperature più alte (Alberts et al., 2004).

1.2 La scoperta dei *Toll-like receptors*

Molti *recettori di riconoscimento di schemi* della superficie cellulare dei mammiferi, responsabili dell'attivazione dell'espressione dei geni della cellula dell'ospite in risposta ai patogeni, sono membri della famiglia dei *recettori Toll-like (TLR)*.

Il *Toll* di *Drosophila* è una proteina transmembrana con un grosso dominio extracellulare che consiste in una serie di ripetizioni ricche di leucina.

Questa venne identificata originariamente come una proteina recettoriale della superficie cellulare che era coinvolta nella determinazione della polarità dorso-ventrale nelle giovani larve di *Drosophila melanogaster* (Stein et al., 1991).

Successivamente è stato scoperto che essa giocava anche un ruolo cruciale nella resistenza alle infezioni fungine nella mosca adulta, insieme ad altri peptidi antimicrobici. La via intracellulare di trasduzione del segnale attivata a valle di *Toll*, quando una mosca è esposta a un fungo patogeno, porta alla traslocazione della proteina *NF-κB* nel nucleo, dove attiva la trascrizione di vari geni, compresi quelli che codificano *difensine* antifungine (Lemaitre et al., 1996).

Il sequenziamento del genoma della *Drosophila melanogaster* ha permesso di rivelare l'esistenza di nove proteine che appartengono tutte alla stessa famiglia *Toll* (Tauszig et al., 2000). Si assunse che ogni membro della famiglia fosse coinvolto nella difesa contro i patogeni, anche se tuttora la funzione immunitaria è attribuita solo ad alcune proteine (un membro della famiglia è attivato dall'esposizione a batteri patogeni e porta alla produzione di una difesa antibatterica).

Negli anni novanta furono identificate le prime proteine dei mammiferi correlate strutturalmente ai *Toll* della *Drosophila* che sono attualmente chiamate recettori umani *Toll-like 1* e *4 (TLR)* (Medzhitov et al., 1997; Nomura et al., 1994). Fino ad oggi è stato dimostrato che 10 proteine trans-membrana umane e

9 murine appartengono alla famiglia *TLR* dei mammiferi (Akira et al., 2001; Zarembet et Godowski, 2002) (Tab. 1).

Tabella 1: TLR e suoi ligandi (Werling et al., 2003).

<i>TLR</i>	ORIGINE DEI LIGANDI	LIGANDI
<i>TLR1</i>	Gram-positive bacteria	Modulin, lipopeptides
<i>TLR2</i>	Gram-positive bacteria Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus Mycobacteriae, Mycoplasmae Listeria Trypanosoma cruzi Spirochetae	Lipoprotein, PGN, LTA, Mannuronic acid polymers Modulin Lipoprotein, Lipoarabinomannan, lipopeptides Heat-killed bacteria GPI anchored proteins LPS
<i>TLR3</i>	Virus	DsRNA
<i>TLR4</i>	Gram-negative bacteria Gram-positive bacteria Plant Respiratory syncytial virus Host	LPS Lipoteichoid acid, mannuronic acid polymers Taxol F protein HSP60, HSP70, Fibronectin, EDA domain
<i>TLR5</i>	Gram-negative bacteria Gram-positive bacteria	Flagellin
<i>TLR6</i>	Gram-positive bacteria	Modulin, soluble tuberculosis Factor STF, Borrelia burgdorferi Outer surface protein A Lipoprotein (Ospa-L)
<i>TLR7</i>		Small antiviral compounds
<i>TLR8</i>		Small antiviral compounds
<i>TLR9</i>	Bacteria	Unmethylated CpG-DNA

Le proteine della famiglia *Toll* e quelle della famiglia *TLR* sono caratterizzate dalla condivisione di componenti di segnalazione omologhe; infatti, presentano un dominio extracellulare con ripetizioni ricche di *leucina* e una regione intracitoplasmatica contenente un dominio del recettore *Toll/interleukin-1*, critico sia nella segnalazione dei *Toll* della *Drosophila* che nei *TLR* dei mammiferi. Per ciascun gradino di segnalazione sono state descritte componenti omologhe nei due sistemi, il *TLR* di mammifero ed il *Toll* della *Drosophila*, suggerendone la conservazione filogenetica nel tempo (Horng e Medzhitov, 2001).

1.2.1 Il ruolo critico del *TLR*

L'elemento chiave per l'iniziazione della risposta immunitaria innata è l'identificazione di uno o più componenti dei patogeni che non sono normalmente presenti nell'ospite. Queste componenti sono state definite *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) (Medzhitov e Janeway, 1997). Al momento dell'infezione, le cellule che presentano antigeni, le cellule macrofaghe e le cellule dendritiche, esprimendo il *TLR* sulla propria superficie, legano i PAMP ed iniziano una sequenza di segnalazione che stimola le difese dell'ospite attraverso l'induzione di intermedi di ossigeno reattivo e azoto. Inoltre ha inizio anche l'immunità adattativa nel momento in cui vengono attivate le cellule che presentano antigeni inducendo la produzione di *citochinine* pro-infiammatorie e regolando al rialzo le molecole co-stimolatorie. La segnalazione del *TLR* stimola anche la maturazione e la migrazione delle cellule dendritiche nei linfonodi in alcune specie, come i topi; nei ruminanti questa migrazione sembra essere più importante, ma può essere modulata (Haig et al., 1999). Nel topo e nell'uomo il traffico di cellule è mediato dai recettori

della *chemochina* espressi dalle cellule dendritiche che a loro volta seguono la stimolazione del *TLR* (Rescigno et al., 1999, 2000; Sallusto et al., 1999). LPS, un tipico PAMP che interagisce con i *TLR*, regola al ribasso l'espressione dei recettori della *chemochina* come *CCR5* e, in concomitanza, regola al rialzo l'espressione di *CCR7* sulle cellule dendritiche. Allo stesso modo, la *citosina-fosfato-guanosina* (CpG) induce il traffico delle cellule nel linfonodo drenante (Uwiera et al., 2001). Negli organi linfoidi secondari, le cellule dendritiche stimolano le *cellule T*, attraverso la presentazione dei peptidi associati alle molecole MHC, combinati con un segnale secondario trasmesso da molecole costimolatorie come *CD80/86*. Le MHC sono proteine codificate da un complesso di geni detti *complesso maggiore d'istocompatibilità*; hanno la funzione di legare i frammenti peptidici, che vengono generati dalla degradazione di antigeni proteici estranei all'interno della cellula bersaglio, e di trasportarli alla superficie.

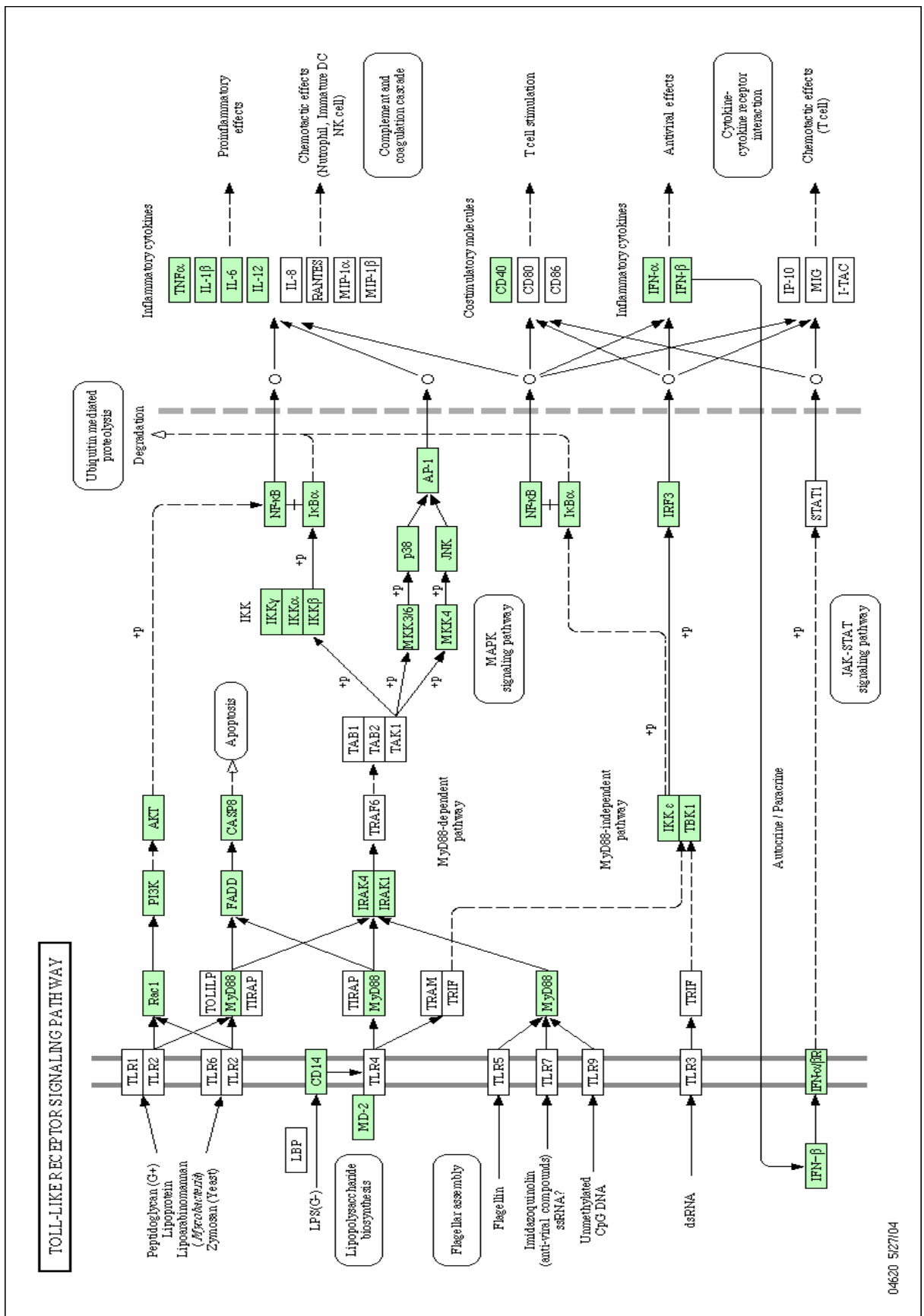
Nei modelli murini, l'infezione batterica attiva le *cellule dendritiche* attraverso la stimolazione del *TLR* ed in via preferenziale induce le *citochine* che inducono *Th1*, come *IL-12*. Quindi, le cellule dendritiche, stimolate dai *TLR*, tendono a portare alla differenziazione delle *cellule T* verso il tipo cellulare *Th1*. Non è ancora abbastanza chiaro se le cellule dendritiche inducano la differenziazione delle cellule *Th2* attraverso la stimolazione dei *TLR* o attraverso altri recettori.

I topi con difetto di *TLR4*, se esposti ad un allergene, mostrano riduzioni delle infiammazioni delle vie aeree accompagnate da una ridotta risposta del *Th2* (Dabbagh et al., 2002).

Il *TLR4* può essere necessario per l'induzione di una risposta ottimale del *Th2* all'antigene che deriva da una fonte non patogena. Ciò suggerisce che i ligandi del *TLR*, come LPS dei batteri commensali, possono svolgere un ruolo

fondamentale nella maturazione del sistema immunitario innato, prima dell'esposizione al patogeno (Dabbagh et al., 2002).

In conclusione, i *TLR* risultano fondamentali non solo nella prima fase dell'infezione con la risposta immunitaria innata, ma anche nel collegare all'immunità innata quella adattativa attraverso l'intero sviluppo della risposta (Werling e Jungi, 2003).



04620 512704

Figura 1: Segnalazioni cellulari di Toll-like receptor *Bos Taurus*, www.genome.jp.

1.2.2 TLR2

Il recettore *TLR2* riconosce vari tipi di patogeni tra cui i batteri *Gram-positivi*, che possono provocare risposte immuni simili a quelle generate da LPS. La parete cellulare dei batteri *Gram-positivi* contiene lipoproteine ad acidi lipoteici inseriti in uno strato di peptidoglicano (PGN). Le analisi dei topi *TLR2*-deficienti o delle cellule derivate da questi animali hanno dimostrato che il *TLR2* è essenziale per la risposta al PGN, il *lipopeptide micoplasmatico* attivante i macrofagi *lipopeptide-2* (MALP-2) (Takeuchi et al., 1999, 2000, 2001) e anche per la risposta al *lipoarabinomannano*, un glicolipide della parete cellulare primaria derivato dal *Mycobacterium tuberculosis* (Jones et al., 2001). Gli studi in vitro e di trasfezione suggeriscono che gli acidi lipoteici e, in uno studio, l'organismo *Gram-positivo Listeria monocytogenes*, attivano le cellule via *TLR2*. Secondo alcuni autori l'abilità del *TLR2* di legare una tale varietà di ligandi è basata sulla sua capacità di formare eterodimeri con altri *TLR*, principalmente con *TLR6* e *TLR1* (Ozinsky et al., 2000; Takeuchi et al., 2001).

1.2.3 TLR4

Il recettore *TLR4* riconosce sia PAMP batterici sia PAMP virali; il PAMP meglio descritto è LPS, un componente maggiore della membrana esterna dei batteri *Gram-negativi*. LPS provoca varie risposte immunostimolatorie, inclusa la produzione delle *citochine* pro-infiammatorie come *IL12* e delle sostanze effettrici infiammatorie. È stata identificata una proteina denominata *CD14*, specifica per il legame con LPS, espressa dai fagociti mononucleari, ma che manca di una regione intracitoplasmatica. Essendo incapace di trasdurre il segnale, potrebbero essere necessarie altre proteine di membrana per la

segnalazione di LPS nei fagociti mononucleari (Ingalls et al., 1999). Alcuni studi hanno messo in evidenza che un segnale LPS è trasmesso dal *TLR4* (Poltorak et al., 1998).

1.2.4 *TLR6*

Nell'uomo la sequenza amminoacidica del *TLR6* presenta una similarità di sequenza con il *TLR1* umano pari a circa il 69% (Takeuchi et al., 1999). Studiando il dominio TIR in diverse specie di vertebrati Beutler e Rehli (2002) hanno valutato che il gene ancestrale di *TLR1* e *TLR6* si è duplicato approssimativamente 130 milioni di anni fa dando origine ai due geni, mentre il precursore del *TLR10* si è diversificato dal *TLR1/TLR6* 300 milioni di anni fa. Nel pollo sono stati identificati due *TLRs* detti ch*TLR1* di tipo 1 e di tipo 2; questi sono gli omologhi di *TLR1* e *TLR6* umani, ma non è possibile determinare quali siano ch*TLR1* o ch*TLR6* (Yilmaz et al., 2005). Questa omologia è in accordo con il fatto che il primo *TLR* ancestrale duplicato nei mammiferi ha circa lo stesso tempo di divergenza degli uccelli (300 milioni anni). Nei mammiferi, *TLR1*, *TLR6* e *TLR10* sono presenti su un unico cromosoma.

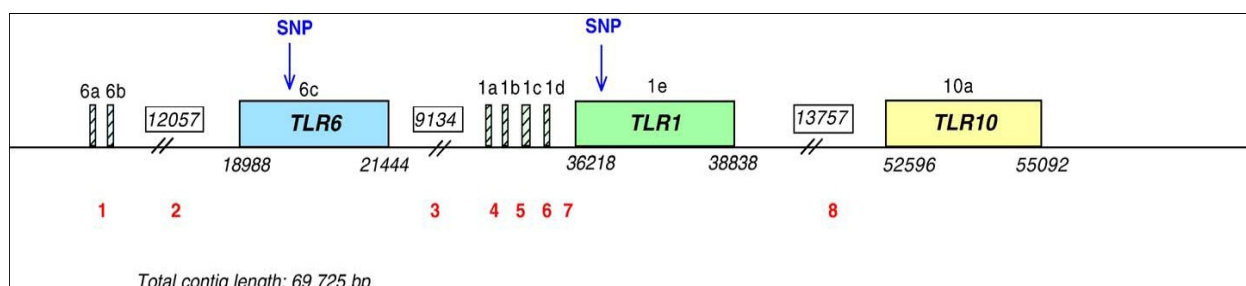


Figura 2: Struttura del gene: organizzazione del cluster bovino per *TLR6-TLR1-TLR10* (Opsal et al., 2006).

1.2.5 I *TLR* bovini

Mentre i geni *TLR* dell'uomo e del topo sono stati mappati con successo, solo alcuni *TLR* nelle specie di interesse zootecnico sono stati studiati; ad esempio solo il *TLR2*, il *TLR4*, il *TLR6* ed il *TLR9* sono stati mappati nel genoma del maiale (Muneta et al., 2003; Franceschi et al., 2004). Per gli omologhi bovini di tutti i 10 *TLR* umani sono disponibili sia le informazioni sulla sequenza sia la mappatura, ossia la collocazione cromosomica. Tutte le posizioni cromosomiche identificate sono in linea con le aspettative della sintonia cromosomica tra l'uomo e i mammiferi allevati (McGuire et al., 2005). In *Bos taurus*, i *TLR1*, *TLR6* e *TLR10* si raggruppano nel cromosoma 6, organizzazione simile a quella osservata nel cromosoma umano 4 e che si ritiene derivi da una duplicazione genica (Beutler e Rehli, 2002). Similarmente, *TLR7* e *TLR8* sono localizzati sul cromosoma X bovino così come nell'uomo e nel topo. I *TLR3* e *TLR5* bovini si trovano rispettivamente sul cromosoma 27 e sul cromosoma 16. I *TLR2* e *TLR4* si trovano rispettivamente sull'estremità prossimale del cromosoma 17 e sull'estremità distale del cromosoma 8 (White et al., 2003). Il *TLR9* è stato mappato sull'estremità distale del cromosoma 22 (Goldammer et al., 2004).

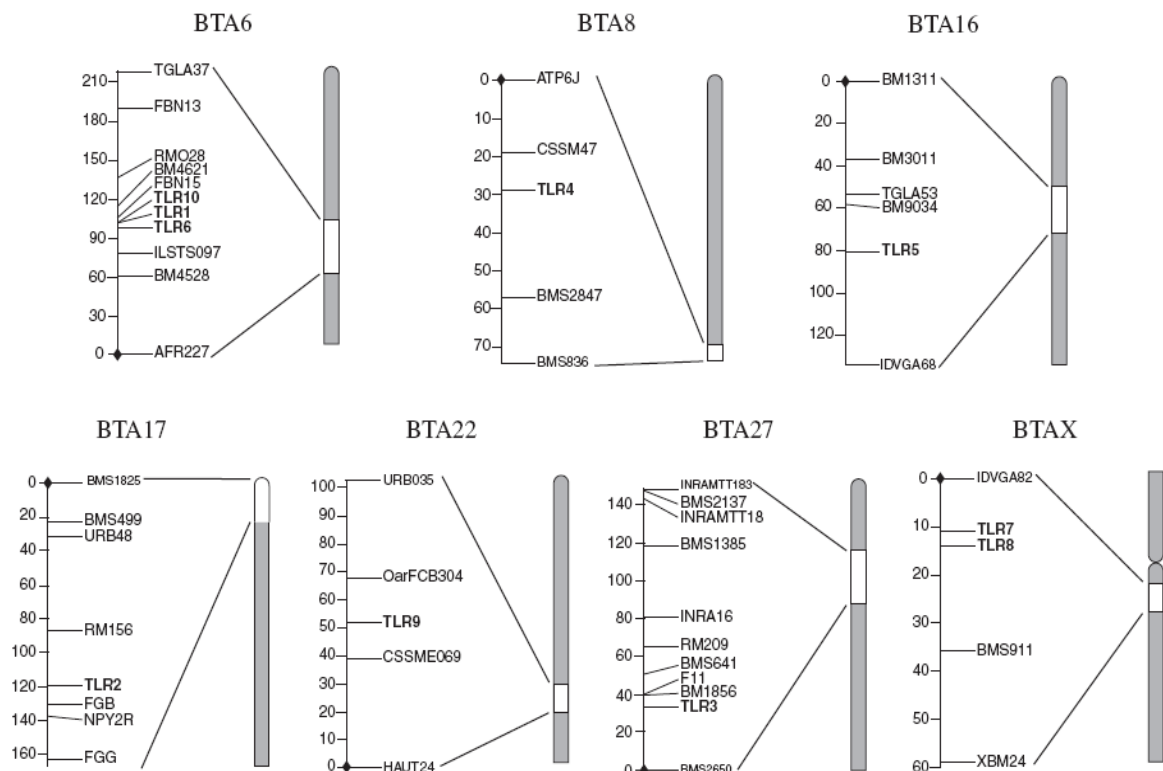


Figura 3: Mappatura dei TLRs nei cromosomi bovini: 6, 8, 16, 17, 22, 27 e X (McGuire et al., 2005).

Le similarità a livello degli amminoacidi delle proteine *TLR* bovine con quelle dell'uomo e del topo sono, rispettivamente, del 77% e del 67% per il *TLR2*; del 72% e del 65% per il *TLR4*; del 64% e del 55% per l'*MD2*.

1.3 L'Informazione genetica

Il genoma rappresenta il materiale genetico di un individuo e contiene l'informazione necessaria per la nascita, lo sviluppo e il mantenimento degli organismi viventi. Costituente fondamentale del genoma è il DNA (acido desossiribonucleico), costituito da catene complementari di nucleotidi e organizzato in cromosomi, che si presentano a coppie di omologhi e il cui numero varia a seconda della specie. Durante la riproduzione i cromosomi

vengono trasmessi tramite le cellule germinali al nuovo individuo; i cromatidi che compongono ciascuna coppia derivano uno dall'individuo maschile e l'altro dall'individuo femminile. Le caratteristiche trasmesse da una generazione all'altra sono definite “caratteristiche ereditarie” (Mendel le chiamò *caratteri*) e sono controllate da tratti di DNA chiamati geni (Mendel li chiamò *fattori*). In un organismo, la costituzione genetica rappresenta il genotipo e le caratteristiche visibili il fenotipo, che è determinato dall'interazione dei geni con l'ambiente.

1.3.1 Marcatori genetici

I marcatori genetici sono sequenze polimorfiche (presentano più varianti alleliche) che si trovano in un *locus* specifico all'interno del cromosoma, si comportano in modo mendeliano e sono di facile rilevazione. Identificano regioni cromosomiche nelle quali possono essere localizzati geni importanti, la cui segregazione è difficile da seguire.

I marcatori genetici, essendo polimorfici, possono essere utilizzati per valutare la variabilità genetica presente in una specie o in una popolazione, identificando le mutazioni che si sono accumulate nel corso dell'evoluzione.

I marcatori possono essere rilevati:

- a livello morfologico (caratteri mendeliani);
- a livello biochimico (isoenzimi, proteine, gruppi sanguigni);
- a livello molecolare (analisi del DNA).

1.3.2 Marcatori molecolari

Lo studio della variabilità genetica di una specie all'interno o tra le comunità è molto importante sia per la conservazione che per l'utilizzo delle risorse genetiche.

Le moderne tecnologie molecolari permettono, grazie all'uso di marcatori molecolari, di analizzare i polimorfismi al livello del DNA. Alcuni di questi marcatori di DNA non sono influenzati dall'ambiente, sono neutri, ovvero non producono nessun effetto fenotipico apprezzabile, presentano assenza di epistasi e pleiotropia e sono numerosi; ciò permette il loro utilizzo nello stesso genoma o nella medesima popolazione segregante. Possono essere usati su entrambi i sessi e a qualsiasi età, sono generalmente codominanti, polimorfici, facili da monitorare ed analizzabili con metodiche automatizzate. Marcatori distribuiti uniformemente lungo il genoma possono essere usati per studiare le differenze genetiche e la segregazione di piccole regioni cromosomiche. Risultano, inoltre, essere uno strumento utile per studiare la variabilità genetica a livello molecolare in quanto permettono di valutare direttamente sul genoma similitudini o differenze tra individui.

1.3.3 SNPs

Un marcatore genetico ideale per studi di popolazione e di evoluzione deve essere abbondante e ampiamente distribuito nel genoma; inoltre i dati devono essere facilmente confrontabili tra laboratori che utilizzano metodiche e tecnologie diverse. Come marcatori molecolari per lo studio di frequenze alleliche sono stati molto utilizzati: DNA fingerprinting, sequenziamento del DNA mitocondriale, RFLP (Restriction fragment length polymorphism),

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) e microsatelliti. Gli SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) sono variazioni di sequenza del DNA, dovute all'alterazione di un singolo nucleotide (A, T, C o G) nella sequenza del genoma, che possono cadere sia in una regione codificante (esone), sia in una regione non-codificante (introne) del gene.

Nel caso in cui uno SNP cade in una sequenza codificante, questo può modificare o meno la sequenza proteica; si possono distinguere in base all'effetto che provocano sulla proteina due diversi tipi di SNPs:

- SNPs sinonimi che non determinano modificazioni nella sequenza amminoacidica, perchè il codice genetico è degenerato, ossia la terza base del codone può variare senza determinare modifiche nell'amminoacido;
- SNPs non sinonimi che determinano invece la sostituzione amminoacidica nella sequenza proteica.

Anche gli SNPs che cadono nella sequenza non codificante (introne) possono modificare l'espressione genica influenzando ad esempio lo splicing o il legame del DNA ai fattori di trascrizione.

I polimorfismi dei nucleotidi sembrano avere caratteristiche del marcatore genetico ideale, essendo: abbondanti nel genoma (costituiscono, infatti, il 90% di tutte le variazioni genetiche umane), facilmente riproducibili in diversi laboratori, e semplici da individuare. Gli SNPs, in generale, possono essere molto utili per studi di genetica di popolazione e per individuare le tracce della selezione: sono, infatti, molto frequenti nelle popolazioni e, singolarmente, determinano piccoli effetti sul fenotipo di un individuo. È ormai stabilito che gruppi di queste piccole variazioni sommandosi causano la suscettibilità o la resistenza a molte delle malattie umane più comuni (ad es. il diabete, il cancro, l'arteriosclerosi, l'alzheimer).

1.4 Malattie

Nel seguente studio sono state prese in considerazione le malattie bovine più diffuse nella provincia di Viterbo e nella provincia di Roma. I soggetti malati presentano patologie sia di origine batterica, sia di origine virale.

1.4.1 IBR

L'IBR (Infectious Bovine Rhinotracheitis) è una delle manifestazioni cliniche del BoHV-1 (*Bovine Herpesvirus 1*) che rappresenta uno dei maggiori patogeni del bestiame. Le altre manifestazioni cliniche sono: l'aborto, un'infezione sistemica nei vitelli e l'IPV (Infectious Pustular Vulvovaginitis).

Diversi paesi europei, tra cui l'Italia, hanno iniziato dei piani di eradicazione del virus a causa delle elevate perdite economiche causate dalla malattia e dalle restrizioni commerciali che ne derivano. L'uso del vaccino contro il BoVH-1 e l'abbattimento dei capi infetti sono, per ora, le uniche due vie fondamentali da seguire (Muylkens et al., 2007).

1.4.2 Mastite

La mastite è una delle malattie più importanti tra quelle che determinano un'elevata incidenza economica sulla produzione di latte bovino. Consiste nell'infiammazione della ghiandola mammaria quasi sempre causata da batteri sia Gram-positivi sia Gram-negativi, che colonizzano la ghiandola penetrando attraverso il canale della mammella. I casi più studiati di mastite sono quelli provocati dallo *Stafilococcus aureus* e dall'*Escherichia coli*. Le infezioni

provocate da *Escherichia coli* avvengono con elevata frequenza nelle vacche da latte nei periodi in cui i meccanismi di difesa legati all'immunità innata sono indeboliti: in particolare durante il periodo precedente al parto e durante la prima lattazione. Oggi la prevenzione della mastite risulta essere più importante del trattamento post-infezione (De Schepper et al., 2008).

1.4.3 Enterite

L'enterite è una malattia dovuta all'infiammazione acuta o cronica della mucosa dell'intestino, può presentare una distribuzione segmentaria o diffusa, coinvolgendo anche altri tratti del tubo digerente. Le forme acute sono solitamente sostenute da infezioni virali, batteriche, micotiche o parassitarie. Le forme croniche possono essere infettive, tossiche, dovute ad allergia o intolleranza alimentare, a patologie immunitarie oppure a patologie la cui origine non è stata ancora individuata con certezza (morbo di Crohn nell'uomo). I sintomi sono costituiti da diarrea, febbre, disidratazione, astenia e dolori addominali. Le enteriti spesso si associano a gastrite e a colite. La terapia si basa sull'uso di antibiotici sistemici e in alcuni casi sono utili i cortisonici.

1.4.4 Para-tubercolosi

La paratubercolosi è una malattia infettiva e contagiosa caratteristica dei ruminanti, descritta e studiata per la prima volta nel 1895 da Johne e Frothingham. L'agente eziologico è stato recentemente classificato come *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP), viste le sue comunanze

antigeniche con *M. avium*. La via più comune di introduzione dell'infezione in allevamento risiede nell'acquisto di animali infetti in forma subclinica, ma l'infezione è possibile anche attraverso la contaminazione dei pascoli, poiché è dimostrata la presenza di MAP anche nei ruminanti selvatici.

La malattia compare generalmente in animali di 3-5 anni di età, più frequentemente in prossimità del parto, i sintomi iniziali sono generalmente vaghi (pelo ruvido opaco, cute secca e anelastica), in seguito compare diarrea cronica o intermittente.

Le strategie di controllo si basano sull'adozione contemporanea di misure tendenti ad eliminare i soggetti infetti, evitare l'introduzione in allevamento di animali infetti e proteggere i vitelli dall'infezione. In Europa l'interesse scientifico è elevato anche a fronte delle ipotesi di coinvolgimento di MAP nel morbo di Crohn dell'uomo (Arrigoni, 2001).

2. SCOPO DELLA TESI

Numerosi studi sperimentali, effettuati sull'uomo, hanno messo in evidenza l'importanza del *TLR* nella risposta immunitaria e nella patogenesi delle malattie (Fig. 4) (Pandey et al., 2006).

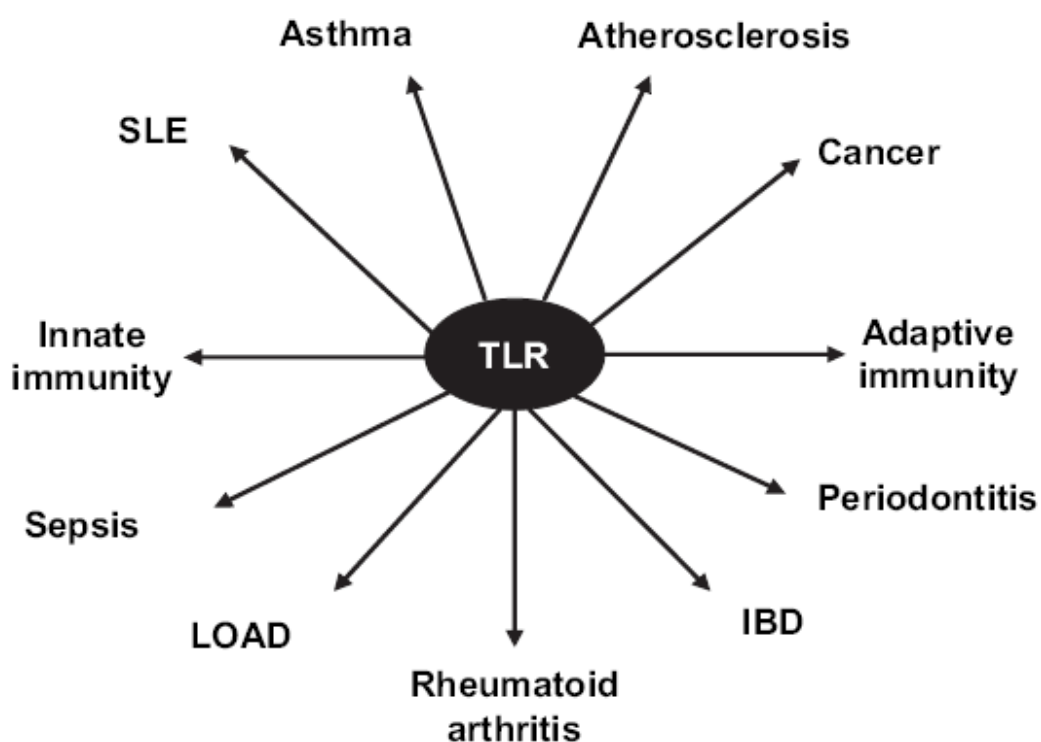


Figura 4: Ruolo patofisiologico del TLR (SLE, sistemic lupus erythematosus; LOAD, late onset Alzheimer's disease; IBD, inflammatory bowel disease) (Saumya et al., 2006).

I polimorfismi nei *TLR* possono influenzare l'efficienza dei recettori nel riconoscimento delle molecole derivanti dagli agenti patogeni. In particolare nel bestiame, la scoperta di una variazione genetica in questi loci, associata ad una

resistenza nei confronti di una malattia, può essere utile per effettuare una accurata selezione.

Il presente studio ha i seguenti scopi:

- Individuare eventuali SNPs che siano in qualche modo correlati con le malattie più frequenti nel bovino, in modo da sottolineare una possibile predisposizione genetica.
- Caratterizzare gli SNPs individuati analizzandone frequenza e diversità genetica in popolazioni appartenenti a 16 razze bovine europee.
- Verificare se alcune razze presentano peculiari polimorfismi nei *TLR* e se questo possa essere associato alle caratteristiche della razza.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Per quanto riguarda l'identificazione e l'analisi di polimorfismi nei geni *TLR*, sono stati presi in considerazione animali malati provenienti sia dalla provincia di Roma che dalla provincia di Viterbo; ad ogni malato è stato poi associato un campione sano, proveniente dallo stesso allevamento, da utilizzare come controllo (Tab. 2).

Tabella 2: Provenienza, razza e patologia degli animali analizzati.

CAMPIONE	PROVENIENZA	RAZZA	PATOLOGIA
1	Vulci	Maremmana	Attinomicosi
2	Tormancina	Frisona	Mastite
3	Tormancina	Frisona	Mastite
4	Tormancina	Frisona	Mastite
5	Tormancina	Frisona	Mastite
6	Tormancina	Frisona	Controllo Mastite
7	Tormancina	Frisona	Controllo Mastite
8	Castelporziano	Maremmana	Controllo Attinom.
9	Castelporziano	Maremmana	Controllo Attinom.
10	Tormancina	Frisona	Positiva para-tbc
11	Tormancina	Frisona	Controllo para-tbc
12	Tormancina	Frisona	Mastite
13	Tormancina	Frisona	Controllo para-tbc
14	Tormancina	Frisona	Controllo para-tbc

15	Tormancina	Frisona	Positiva para-tbc
22	Tuscania	Chianina	Controllo para-tbc
23	Tuscania	Chianina	Positiva para-tbc
24	Tormancina	Maremmiana	IBR
25	Tormancina	Maremmiana	IBR
26	Tormancina	Maremmiana	IBR
27	Tormancina	Maremmiana	IBR
28	Tormancina	Maremmiana	IBR
29	Tormancina	Maremmiana	Controllo IBR
30	Tormancina	Maremmiana	IBR
31	Tormancina	Maremmiana	Controllo IBR
32	Tormancina	Maremmiana	IBR
33	Tormancina	Maremmiana	Controllo IBR
34	Tormancina	Maremmiana	IBR
35	Tormancina	Maremmiana	IBR
36	Tormancina	Maremmiana	Controllo IBR
37	Tormancina	Maremmiana	IBR
38	Tormancina	Maremmiana	IBR
39	Tormancina	Maremmiana	Controllo IBR
40	Tormancina	Maremmiana	IBR
41	Viterbo	Chianina	Controllo Enterite
42	Viterbo	Chianina	Enterite
45	Viterbo	Chianina	Controllo Enterite
46	Viterbo	Chianina	Enterite
47	Viterbo	Chianina	Broncopolmonite
48	Viterbo	Chianina	Controllo Broncop.
49	Viterbo	Chianina	Enterite
50	Viterbo	Chianina	Controllo Enterite
51	Viterbo	Chianina	Controllo Broncop.
52	Viterbo	Chianina	Broncopolmonite
53	Viterbo	Chianina	Controllo Enterite
54	Viterbo	Chianina	Enterite
55	Tormancina	Frisona	Controllo Mastite
56	Tormancina	Frisona	Mastite
57	Tormancina	Frisona	Controllo Mastite

Per indagare la frequenza dei polimorfismi in varie razze bovine europee, gli SNPs sono stati analizzati in 951 campioni (Tab. 3). Gli individui erano stati precedentemente campionati nell'ambito del progetto europeo GemQual (Genetics of Meat Quality, <http://www.gemqual.org>).

Tabella 3: Provenienza, razza e numero degli individui analizzati.

CAMPIONE	INDIVIDUI	PROVENIENZA
Piemontese	67	Italia
Maremmana	91	Italia
Marchigiana	36	Italia
Limousine	72	Francia
Charolais	80	Francia
Jersey	50	Gran Bretagna
South Devon	43	Gran Bretagna
Aberdeen Angus	45	Gran Bretagna
Highlands	48	Gran Bretagna
Holstein	60	Danimarca
Danish Red	59	Danimarca
Simmental	30	Danimarca
Asturiana Valles	66	Spagna
Casina	66	Spagna
Avilena	65	Spagna
Pirenaica	73	Spagna

3.2 Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA da sangue si è utilizzato il kit "Wizard DNA genomic" (Promega). Il protocollo di estrazione è il seguente:

1. Aliquotare 300 μ l di sangue in un tubo eppendorf da 1.5 ml e aggiungere 900 μ l di cell lysis solution. Mescolare per inversione (5/6 volte). Lasciare 10 minuti a temperatura ambiente invertendo ogni tanto.
2. Centrifugare 1 minuto a 14000 rpm. Scartare il sovrinatante e vortexare il pellet.
3. Aggiungere 300 μ l di Nuclei Lysis Solution, pipettare per risospendere il pellet.
4. Unire 100 μ l di Protein Precipitation Solution vortexando vigorosamente per 20 secondi.
5. Centrifugare per 4 minuti a 14000 rpm.
6. Trasferire il supernatante con il DNA in un nuovo tubo da 1.5 ml contenente 300 μ l di isopropanolo a 4°C, mescolare per inversione.
7. Centrifugare a 14000 rpm per 3 minuti. Scartare il sovrinatante e aggiungere 300 μ l di etanolo al 70% per lavare il pellet.
8. Centrifugare a 14000 rpm per 3 minuti e scartare il sovrinatante. Asciugare a temperatura ambiente.
9. Reidratare il pellet di DNA con 50 μ l di TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM pH 8).
10. I campioni vengono conservati a 4°C.

3.3 Elettroforesi su gel di agarosio

La concentrazione del DNA estratto viene verificata mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% in presenza di bromuro di etidio.

La corsa elettroforetica si effettua a 80 V per tre ore in tampone TBE 1X (Tris-HCl 0,45 M, acido borico 0,45 M, EDTA 2,5 mM); la visualizzazione del DNA avviene tramite un transilluminatore UV. La quantificazione viene fatta in base ad uno standard (λ Dna 50 ng/ μ l) che viene caricato sul gel parallelamente ai campioni.

3.4 Disegno dei primers

I primers per i geni *TLR* sono stati progettati attraverso il programma PolyPrimers (Valentini, 2006 <http://www.unitus.it/SAG/primers.zip>) partendo dalle sequenze bovine presenti nelle banche dati con i seguenti “accession numbers” (Tab. 4):

Tabella 4: Accession number dei geni utilizzati.

GENE	ACCESSION NUMBER
<i>TLR2</i>	AY634629
<i>TLR4</i>	AY634630
<i>TRL6</i>	AJ618974

I primers sono stati disegnati in modo da riuscire ad avere il gene *TLR2* suddiviso in 6 frammenti, il gene *TLR4* in 3 frammenti e il gene *TLR6* in 4 frammenti, ottenendo sequenze di lunghezza di circa 500 - 700 paia di basi (Tab. 5).

Tabella 5: Sequenza primers Forward (Fw) e Reverse (Rw), temperatura PCR e lunghezza amplificato in paia di basi (bp).

Locus	Sequenza (5'→3')	T.A. PCR (°C)	Amplificato (bp)
TLR2	Fw: GTGGTAGTTTGAGCATTCTTAA Rw: GTCTTGGCCCTCTCGATATTC	47	701
TLR2	Fw: CTGTCCAACAATGAGATCACCT Rw: AATTCTGTCCAAACTGTATATTC	49	733
TLR2	Fw: CTGTCCAACAATGAGATCACCT Rw: AATTCTGTCCAAACTCAGTGCT	49	733
TLR2	Fw: GTTCAGGTCCCTTTATGTCTTG Rw: ATGGGTACAGTCATCAAACCTCT	47	509
TLR2	Fw: ACTACCGCTGTGACTCTCCCTC Rw: GACCACCACCAGACCAAGACT	55	711
TLR2	Fw: CTCCCTTTCTGAATGCCACA Rw: AAAGTATTGGAGCTTCAGCA	47	754
TLR4	Fw: GTGTGGAGACCTAGATGACTGG Rw: GTACGCTATCCGGAATTGTTCA	50	705
TLR4	Fw: CTACCAAGCCTTCAGTATCTAG Rw: GGCATGTCCTCCATATCTAAAG	47	741
TLR4	Fw: TCAGGAACGCCACTTGTCAGCT Rw: TGAACACGCCCTGCATCCATCT	55	710
TLR6	Fw: AAAGAATCTCCCATCAGAAGCT Rw: GAAGGATACAACCTTAGGTGCAA	46	515
TLR6	Fw: CTGCCCATCTGTAAGGAATTTG Rw: GATAAGTGTCTCCAATCTAGCT	47	739
TLR6	Fw: TTGGAAACACTGGATGTTAGCT Rw: ACTGGAGAGTTCTTTGGAGTTC	49	710
TLR6	Fw: CTGCCTGGGTGAAGAATGAATT Rw: TGTAGTTGCACTTCCGGGCT	50	715

3.5 Polymerase chain reaction (PCR)

Le amplificazioni sono state condotte in un termociclatore PCR express (Hybaid).

Condizioni di reazione (30 µl):

- Acqua sterile 12,6 µl
- 5X PCR buffer 6 µl
- dNTPs (2 mM) 3 µl
- Oligonucleotide primer Fw 10 pM/ µl 2,4 µl
- Oligonucleotide primer Rw 10 pM/ µl 2,4 µl
- Taq Polymerase 5 unità/µl 0.6 µl
- DNA genomico (20 ng/ µl) 3 µl
- Olio minerale

Le condizioni di PCR sono le seguenti:

Stage 1 → 95°C per 5 minuti (1 ciclo)

Stage 2 → 95°C per 30 secondi / TA + 7°C per 30 secondi / 72°C per 2 minuti (14 cicli)

Stage 3 → 95°C per 30 secondi / TA per 30 secondi / 72°C per 2 minuti (19 cicli)

Stage 4 → 72°C per 5 minuti (1 ciclo)

L'amplificato è stato, poi, controllato mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% in presenza di bromuro di etidio.

La corsa elettroforetica è stata effettuata a 90 V per un'ora in tampone TBE 1X (Tris-HCl 0,45 M, acido borico 0,45 M, EDTA 2,5 mM); la visualizzazione del DNA avviene tramite un transilluminatore UV, controllando la lunghezza delle

bande in base ad un marker (GeneRuler™ 50 bp Dna Ladder - Fermentas) caricato sul gel parallelamente ai campioni.

3.6 Purificazione dei prodotti PCR

I frammenti amplificati sono stati purificati mediante ExoSap-IT (USB Corporation), per rimuovere i primers e i dNTPs residui. L'ExoSap, infatti, è composto da due enzimi idrolitici: l'Esonucleasi I che degrada i primers a singolo filamento ed altri singoli filamenti prodotti dalla PCR, la SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) che defosforila i dNTPs residui. Il protocollo di purificazione è il seguente:

1. Unire 1 µl di ExoSap-IT a 2,5 µl di reazione PCR.
2. Incubare a 37°C per 15 minuti.
3. Incubare a 80°C per 15 minuti per inattivare gli enzimi.

3.7 Reazione di sequenziamento

Le reazioni di sequenza sono state eseguite usando il kit DTCS (QuickStart Kit Beckman Coulter), seguendo le istruzioni della casa produttrice, il protocollo di sequenza è il seguente:

1. Preparare la reazione di sequenza in 20 µl:
 - 0.5 µl buffer
 - 5 µl (DNA + Acqua sterile)
 - 1 µl di primer Fw/Rw
 - 4 µl DTCS (QuickStart Kit Beckman Coulter)
 - 9.5 µl di Acqua sterile

2. Pipettare e aggiungere una goccia di olio minerale.
3. Caricare nel termociclatore PCR express (Hybaid).

Le condizioni di reazione sono le seguenti:

Stage 1 → 96°C per 20 secondi / 50°C per 20 secondi / 60°C per 4 minuti (40 cicli)

Stage 2 → 72°C per 10 minuti (1 ciclo)

3.8 Purificazione dei prodotti di sequenziamento

La purificazione è stata effettuata con Agencourt CleanSEQ 96 per Beckman CEQ DTCS, che si basa sull'adesione del DNA a palline magnetiche.

Il protocollo è il seguente:

1. Vortexare la soluzione CleanSEQ, contenente le palline magnetiche.
2. Aggiungere 1 volume di reazione CleanSEQ a ciascun campione.
3. Aggiungere 5.5 volumi di reazione di isopropanolo al 73% a ciascun campione.
4. Mixare pipettando, fino a quando la soluzione non appare completamente omogenea.
5. Incubare la piastra per un minimo di 10 minuti.
6. Posizionare la piastra sul supporto magnetico (SPRIplate), attendere 3 minuti e quindi rimuovere il sovrantante.
7. Aggiungere 200 µl di Isopropanolo al 73% a ciascuna reazione (questa operazione deve essere condotta sul supporto magnetico – SPRIplate).
8. Attendere 3 minuti e quindi rimuovere il sovrantante.
9. Ripetere i punti 7 e 8.
10. Rimuovere la piastra dal supporto e lasciare asciugare per 10 – 20 minuti.

11. Aggiungere 40 μ l di SLS (sample loading solution, contenente 0.1 μ l di 400 bp marker - Beckman Coulter) a ciascuna reazione, mixare e lasciare 10 minuti in incubazione.
12. Posizionare la piastra sul supporto magnetico, attendere 3 minuti e quindi trasferire 35 μ l / 40 μ l in una nuova micropiastra (questa operazione deve essere condotta sul supporto magnetico – SPRIplate).
13. Aggiungere una goccia di olio minerale.
14. Caricare nel sequenziatore .

3.9 Caricamento e corsa su sequenziatore automatico

Il sequenziamento è stato effettuato utilizzando il sequenziatore CEQ 8800 – Beckman Coulter, che utilizza l'elettroforesi capillare e che elabora i dati tramite un software specifico.

3.10 Analisi ed allineamento delle sequenze

Le sequenze sono state esaminate utilizzando il software Bioedit (Hall,1999) e sono state allineate in modo da evidenziare la presenza di eventuali SNPs.

3.11 Analisi statistica

L'analisi statistica dei polimorfismi, in campioni malati e rispettivi controlli, è stata eseguita utilizzando il “test esatto di Fisher”, un test per la verifica d'ipotesi utilizzato in situazioni con due variabili nominali e campioni piccoli. Il fine è

quello di verificare se i dati dicotomici di due campioni riassunti in una tabella di contingenza 2x2 siano compatibili con l'ipotesi nulla (H_0), che le popolazioni d'origine dei due campioni abbiano la stessa suddivisione dicotomica e che le differenze osservate con i dati campionari siano dovute semplicemente al caso. Il test di Fisher è, come dice il nome, sempre esatto.

La frequenza allelica, l'eterozigosità attesa (H_e), l'eterozigosità osservata (H_o) e il PIC (polymorphism information content) di 951 individui di 16 razze europee sono stati calcolati utilizzando il software POWERMARKER (Liu and Muse, 2005).

Il Test per l'equilibrio di Hardy – Weinberg è stato fatto sempre attraverso il software POWERMARKER (considerando significativo un p-value < 0.01).

Inoltre, è stata calcolata la statistica F (Wright, 1965), molto utile per analisi di popolazioni, che permette di misurare la correlazione degli alleli tra gli individui all'interno e tra le popolazioni. Il parametro F_{ST} , è un indice di distanza genetica fra le popolazioni (più le popolazioni sono differenziate, maggiore sarà l' F_{ST}) e di flusso genico (maggior flusso genico implica un più basso F_{ST}). F_{IS} viene usato per misurare l'eventuale eccesso di omozigoti all'interno delle popolazioni, causato per esempio da inbreeding e F_{IT} è la misura di eterozigosità nella popolazione globale.

Nel caso specifico, F_{ST} descrive i valori di differenza genetica tra le razze che compongono la popolazione e F_{IS} la differenza genetica all'interno di una singola razza.

I genotipi delle 16 razze europee sono stati analizzati utilizzando il software FDIST (Beaumont and Nichols, 1996).

La distanza genetica di Nei (1983) tra coppie di popolazioni è stata calcolata attraverso il software POWERMARKER. Utilizzando l'algoritmo UPGMA è stato costruito l'albero filogenetico tra le razze, visualizzato con il software TREEVIEW (Page, 1996).

4. RISULTATI

Per la prima parte del lavoro, sono stati esaminati 57 individui per un totale di circa 740 sequenze, dopo essere state confrontate con le sequenze presenti nelle banche dati, sono state allineate per evidenziare eventuali polimorfismi.

In seguito, i tratti di sequenza che presentavano i possibili polimorfismi, sono stati ulteriormente analizzati per accertarne le loro caratteristiche.

Nella seconda e terza parte del lavoro, di tipo statistico, sono stati analizzati tutti i dati di polimorfismi disponibili, prima nei campioni malati e relativi controlli e poi nelle 16 razze europee.

4.1 Identificazione di SNP nei *TLR*

Dall'analisi effettuata nei bovini, sono stati identificati e caratterizzati 3 SNPs nel gene *TLR2*, 3 SNPs nel gene *TLR4* e 2 nel gene *TLR6* (Tab. 6).

Tabella 6: SNPs identificati, posizione e relativo amminoacido codificato.

<i>GENE</i>	<i>NUCLEOTIDE</i>		<i>AMMINOACIDO</i>
	<i>Allele</i>	<i>Sito</i>	
<i>TLR2</i>	G/A	591	Non codificante
	A/G	738	Non codificante
	G/A	767	Non codificante
<i>TLR4</i>	G/A	254	Non codificante
	C/T	1678	Serina
	T/C	2043	Non codificante
<i>TLR6</i>	G/A	855	Ac. Aspartico / Istidina
	T/C	2315	Fenilalanina

I tre SNPs identificati nel gene *TLR2* (*TLR2_591*, *TLR2_738*, *TLR2_767*) sono presenti nella sequenza non codificante del gene, così come due del *TLR4* (*TLR4_254*, *TLR4_2043*). Il *TLR4_1678* è presente, invece, nella sequenza codificante del gene. Tale SNPs cadendo sulla terza base del codone, è uno SNP sinonimo (synonymous) l'amminoacido codificato rimane sempre Serina. Anche il *TLR6_2315* è uno SNP sinonimo (synonymous) in quanto l'amminoacido codificato non viene modificato e rimane sempre Fenilalanina. Al contrario, lo SNP *TLR6_855* è uno SNP non sinonimo (non synonymous), è presente nella sequenza codificante del gene e in particolare cade sulla prima base del codone, ciò sta a significare che nel caso in cui si abbia la base G, l'amminoacido inserito nella proteina sarà Acido Aspartico (GAC), nel caso in cui si abbia la base A, l'amminoacido inserito nella proteina sarà l'Istidina (CAC).

4.2 Frequenza degli SNPs negli animali malati

Per poter individuare una eventuale correlazione tra la variazione genetica nei loci dei *TLR* e la resistenza o suscettibilità ad una malattia nel bovino, i dati che sono stati ottenuti, sono stati raccolti in tabelle e analizzati anche da un punto di vista statistico, prima considerando le singole malattie e poi considerando tutti i malati con i rispettivi controlli.

4.2.1 Analisi campioni con IBR

Dall'analisi effettuata su 17 campioni, di cui 12 malati e 5 sani, si sono ottenuti i seguenti risultati (Tab. 7):

Tabella 7: SNPs identificati in individui affetti da IBR (24⁺-25⁺-26⁺-27⁺-28⁺-30⁺-32⁺-34⁺-35⁺-37⁺-38⁺-40⁺) e controlli (29-31-33-36-39) (Codici IUPAC-IUB: R = A o G, Y = C o T M = A o C, K = G o T, S = G o C, W = A o T).

<i>TLR</i>	24 ⁺	25 ⁺	26 ⁺	27 ⁺	28 ⁺	29	30 ⁺	31	32 ⁺	33	34 ⁺	35 ⁺	36	37 ⁺	38 ⁺	39	40 ⁺
<i>4_254</i>	A	A	A	R	R	A	R	A	A	A	A	A	A	R	R	A	A
<i>4_1678</i>	Y	Y	Y	C	C	Y	C	T	T	Y	C	Y	Y	C	Y	Y	Y
<i>4_2043</i>	T	T	T	T	T	Y	Y	C	C	Y	T	C	C	C	C	Y	Y

È stato preso in considerazione solo il gene *TLR4* in quanto l'IBR è una patologia di tipo virale (*BoHV-1 Bovine Herpesvirus 1*) e il gene risulta essere coinvolto oltre che nel riconoscimento dei patogeni batterici, anche nel riconoscimento dei patogeni virali.

Tabella 8: Test di Fisher dati IBR TLR4_254 (Mal. = malati, Cont. = controlli).

4_254	A	R
Mal.	7	5
Cont.	5	0

p-value = 0.12798

Tabella 9: Test di Fisher dati IBR TLR4_1678.

4_1678	C + T	Y
Mal.	6	6
Cont.	1	4

p-value = 0.27828

4_1678	C + Y	T
Mal.	11	1
Cont.	4	1

p-value = 0.51470

4_1678	T + Y	C
Mal.	7	5
Cont.	5	0

p-value = 0.12798

Tabella 10: Test di Fisher dati IBR TLR4_2043.

4_2043	C + T	Y
Mal.	10	2
Cont.	2	3

p-value = 0.11651

4_2043	C + Y	T
Mal.	6	6
Cont.	5	0

p-value = 0.07466

4_2043	T + Y	C
Mal.	8	4
Cont.	3	2

p-value = 0.60536

Il test mostra che le variazioni su singole basi sono casuali perchè non si hanno valori di p-value inferiori a 0,05. L'unico dato che può essere considerato parzialmente significativo è il p-value = 0,07466 calcolato sul locus 4_2043 (Tab. 10).

Nel locus 4_254 nei sani si riscontra un'assenza dell'eterozigote A/G. Nel locus 4_1678 nei sani si riscontra un'assenza della base C. Nel locus 4_2043 nei sani si riscontra un'assenza della base T. Inoltre nel locus 4_254 si osserva un'assenza di G/G sia nei malati che nei sani.

4.2.2 Analisi campioni con mastite

Dall'analisi effettuata su 13 campioni di cui 6 malati e 7 sani, si sono ottenuti i seguenti risultati (Tab. 11):

Tabella 11: SNPs identificati in individui affetti da mastite(2⁺-3⁺-4⁺-5⁺-12⁺-56⁺) e controlli (6-7-11-13-14-55-57).

<i>TLR</i>	2 ⁺	3 ⁺	4 ⁺	5 ⁺	6	7	11	12 ⁺	13	14	55	56 ⁺	57
<i>2_591</i>	G	R	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
<i>2_738</i>	G	R	A	G	G	G	A	G	G	R	G	A	G
<i>2_767</i>	A	G	G	A	A	A	G	G	R	A	G	G	G
<i>4_254</i>	G	G	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	G
<i>4_1678</i>	C	C	Y	C	T	C	C	T	T	C	C	C	C
<i>4_2043</i>	C	C	C	C	C	Y	Y	C	C	C	C	C	C
<i>6_855</i>	G	R	A	R	A	G	R	R	G	R	R	A	A
<i>6_2315</i>	T	Y	C	Y	C	T	Y	C	Y	Y	Y	C	C

Tabella 12: Test di Fisher dati mastite TLR2.

<i>2_591</i>	A + G	R
Mal.	5	1
Cont.	7	0

p-value = 0.4615

<i>2_591</i>	A + R	G
Mal.	2	4
Cont.	0	7

p-value = 0.1923

<i>2_591</i>	A	R + G
Mal.	1	5
Cont.	0	7

p-value = 0.4615

<i>2_738</i>	A + G	R
Mal.	5	1
Cont.	6	1

p-value = 0.7307

<i>2_738</i>	A + R	G
Mal.	3	3
Cont.	2	5

p-value = 0.4125

<i>2_738</i>	A	R + G
Mal.	2	4
Cont.	1	6

p-value = 0.4370

<i>2_767</i>	A + G	R
Mal.	6	0
Cont.	6	1

p-value = 0.5384

<i>2_767</i>	A + R	G
Mal.	2	4
Cont.	4	3

p-value = 0.3834

<i>2_767</i>	A	R + G
Mal.	2	4
Cont.	3	4

p-value = 0.5874

Tabella 13: Test di Fisher dati mastite TLR4.

4_254	A + G	R
Mal.	6	0
Cont.	7	0

p-value = 1

4_254	A + R	G
Mal.	0	6
Cont.	2	5

p-value = 0.2692

4_254	A	R + G
Mal.	0	6
Cont.	2	5

p-value = 0.2692

4_1678	T + C	Y
Mal.	5	1
Cont.	7	0

p-value = 0.4615

4_1678	T + Y	C
Mal.	2	4
Cont.	2	5

p-value = 0.6573

4_1678	T	Y + C
Mal.	1	5
Cont.	2	5

p-value = 0.5629

4_2043	T + C	Y
Mal.	6	0
Cont.	5	2

p-value = 0.2692

4_2043	T + Y	C
Mal.	0	6
Cont.	2	5

p-value = 0.2692

4_2043	T	Y + C
Mal.	0	6
Cont.	0	7

p-value = 1

Tabella 14: Test di Fisher dati mastite TLR6.

6_855	A + G	R
Mal.	3	3
Cont.	4	3

p-value = 0.6165

6_855	A + R	G
Mal.	5	1
Cont.	5	2

p-value = 0.5629

6_855	A	R + G
Mal.	2	4
Cont.	2	5

p-value = 0.6573

6_2315	T + C	Y
Mal.	4	2
Cont.	3	4

p-value = 0.3834

6_2315	T + Y	C
Mal.	3	3
Cont.	5	2

p-value = 0.4125

6_2315	T	Y + C
Mal.	1	5
Cont.	1	6

p-value = 0.7307

I dati, come fatto precedentemente, sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il test di Fisher. In tutti i casi non si hanno valori di p-value inferiori a 0,05, quindi, le variazioni su singole basi possono essere definite casuali dal punto di vista statistico.

Inoltre nel locus 4_2043 si osserva un'assenza di G/G sia nei sani che nei malati.

4.2.3 Analisi campioni con enterite

Dall'analisi effettuata su 8 campioni di cui 4 malati e 4 sani, si sono ottenuti i seguenti risultati:

Tabella 15: SNPs identificati in individui affetti da enterite (42⁺-46⁺-49⁺-54⁺) e controlli (41-45-50-53).

TLR	41	42⁺	45	46⁺	49⁺	50	53	54⁺
4_254	R	A	A	R	R	R	A	A
4_2043	C	Y	C	C	C	Y	Y	C
6_855	G	G	R	G	G	G	R	A
6_2315	T	T	C	T	T	T	Y	C

Tabella 16: Test di Fisher dati Enterite TLR4_254.

4_254	A + G	R
Mal.	2	2
Cont.	2	2

p-value = 0.7571

4_254	A + R	G
Mal.	4	0
Cont.	4	0

p-value = 1

4_254	A	R + G
Mal.	2	2
Cont.	2	2

p-value = 0.7571

Tabella 17: Test di Fisher dati Enterite TLR4_2043.

4_2043	T + C	Y
Mal.	3	1
Cont.	2	2

p-value = 0.4999

4_2043	T + Y	C
Mal.	1	3
Cont.	2	2

p-value = 0.5000

4_2043	T	Y + C
Mal.	0	4
Cont.	0	4

p-value = 1

Tabella 18: Test di Fisher dati Enterite TLR6_855.

6_855	A + G	R
Mal.	4	0
Cont.	2	2

p-value = 0.2142

6_855	A + R	G
Mal.	1	3
Cont.	2	2

p-value = 0.5000

6_855	A	R + G
Mal.	1	3
Cont.	0	4

p-value = 0.5000

Tabella 19: Test di Fisher dati Enterite TLR6_2315.

6_2315	T + C	Y
Mal.	4	0
Cont.	3	1

p-value = 0.5000

6_2315	T + Y	C
Mal.	3	1
Cont.	3	1

p-value = 0.7857

6_2315	T	Y + C
Mal.	3	1
Cont.	2	2

p-value = 0.4999

I dati, come fatto precedentemente, sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il test di Fisher. In tutti i casi non si hanno valori di p-value inferiori a 0,05, quindi, le variazioni su singole basi possono essere definite casuali dal punto di vista statistico.

Inoltre nel locus 4_254 si osserva un'assenza di G/G sia nei sani che nei malati e nel locus 4_2043 si osserva un'assenza di T/T sia nei sani che nei malati.

4.2.4 Analisi campioni con malattie batteriche

Un'analisi è stata eseguita considerando tutti i dati relativi alle malattie batteriche: mastite, enterite, para-tubercolosi, polmonite e attinomicosi. Lo scopo è quello di evidenziare relazioni tra la suscettibilità alle malattie batteriche e i polimorfismi riscontrati.

Dall'analisi effettuata su 21 campioni, di cui 11 malati e 10 sani, si sono ottenuti i seguenti risultati (Tab. 20):

Tabella 20: SNPs identificati in individui affetti da malattie batteriche (1⁺-2⁺-3⁺-4⁺-5⁺-10⁺-12⁺-15⁺-47⁺-52⁺-56⁺) e controlli (6-7-9-11-13-14-48-51-55-57) (* non analizzato).

TLR	2_591	2_738	2_767	4_254	4_1678	4_2043	6_855	6_2315
1⁺	G	G	A	G	C	T	A	T
2⁺	G	G	A	G	C	C	G	T
3⁺	R	R	G	G	C	C	R	Y
4⁺	A	A	G	G	Y	C	A	C
5⁺	G	G	A	G	C	C	R	Y
6	G	G	A	A	T	C	A	C
7	G	G	A	A	C	Y	G	T
9	R	G	G	G	C	T	G	T
10⁺	G	G	A	A	C	C	R	C
11	G	A	G	G	C	Y	R	Y
12⁺	G	G	G	G	T	C	R	C
13	G	G	R	G	T	C	G	Y
14	G	R	A	G	C	C	R	Y
15⁺	G	G	A	G	C	C	G	T
47⁺	*	*	*	A	T	C	A	C
48	G	G	G	A	C	C	G	T
51	G	G	G	R	Y	C	R	Y
52⁺	*	*	*	R	Y	C	R	Y
55	G	G	G	G	C	C	R	Y
56⁺	G	A	G	G	C	C	A	C
57	G	G	G	G	C	C	A	C

Tabella 21: Test di Fisher dati malattie batteriche TLR2.

2_591	A + G	R
Mal.	8	1
Cont.	9	1

p-value = 0.7368

2_591	A + R	G
Mal.	2	7
Cont.	1	9

p-value = 0.4582

2_591	A	R + G
Mal.	1	8
Cont.	0	10

p-value = 0.4736

2_738	A + G	R
Mal.	8	1
Cont.	9	1

p-value = 0.7368

2_738	A + R	G
Mal.	3	6
Cont.	2	8

p-value = 0.4442

2_738	A	R + G
Mal.	2	7
Cont.	1	9

p-value = 0.4582

2_767	A + G	R
Mal.	9	0
Cont.	9	1

p-value = 0.5263

2_767	A + R	G
Mal.	5	4
Cont.	4	6

p-value = 0.4140

2_767	A	R + G
Mal.	5	4
Cont.	3	7

p-value = 0.2549

Tabella 22: Test di Fisher dati malattie batteriche TLR4.

4_254	A + G	R
Mal.	10	1
Cont.	9	1

p-value = 0.7380

4_254	A + R	G
Mal.	3	8
Cont.	4	6

p-value = 0.4380

4_254	A	R + G
Mal.	2	9
Cont.	3	7

p-value = 0.4502

4_1678	T + C	Y
Mal.	9	2
Cont.	9	1

p-value = 0.5375

4_1678	T + Y	C
Mal.	4	7
Cont.	3	7

p-value = 0.5619

4_1678	T	Y + C
Mal.	2	9
Cont.	2	8

p-value = 0.6691

4_2043	T + C	Y
Mal.	11	0
Cont.	8	2

p-value = 0.2142

4_2043	T + Y	C
Mal.	1	10
Cont.	3	7

p-value = 0.2556

4_2043	T	Y + C
Mal.	1	10
Cont.	1	9

p-value = 0.7380

Tabella 23: Test di Fisher dati malattie batteriche TLR6.

6_2	A + G	R
Mal.	6	5
Cont.	6	4

p-value = 0.5750

6_2	A + R	G
Mal.	9	2
Cont.	6	4

p-value = 0.2678

6_2	A	R + G
Mal.	4	7
Cont.	2	8

p-value = 0.3673

6_4	T + C	Y
Mal.	8	3
Cont.	5	5

p-value = 0.2678

6_4	T + Y	C
Mal.	6	5
Cont.	8	2

p-value = 0.2213

6_4	T	Y + C
Mal.	3	8
Cont.	3	7

p-value = 0.6326

I dati sono stati sottoposti all'analisi statistica mediante test di Fisher considerando gli SNPs dei geni *TLR2*, *TLR4* e *TLR6*, tutti coinvolti nella risposta immunitaria antibatterica. I risultati del test non evidenziano relazioni tra patologia e carattere genetico. Tutti i polimorfismi individuati possono, al momento, essere definiti casuali.

4.3 Frequenza dei polimorfismi in razze bovine europee

Gli otto SNPs individuati (Tab. 6) sono stati analizzati in 951 individui di 16 razze bovine europee sia da latte, Jersey e Holstein; sia da carne: South Devon, Aberdeen Angus, Highlands, Danish Red, Simmental, Asturiana Valles, Casina, Avilena, Pirenaica, Piemontese, Marchigiana, Maremmana, Limousine e Charolais.

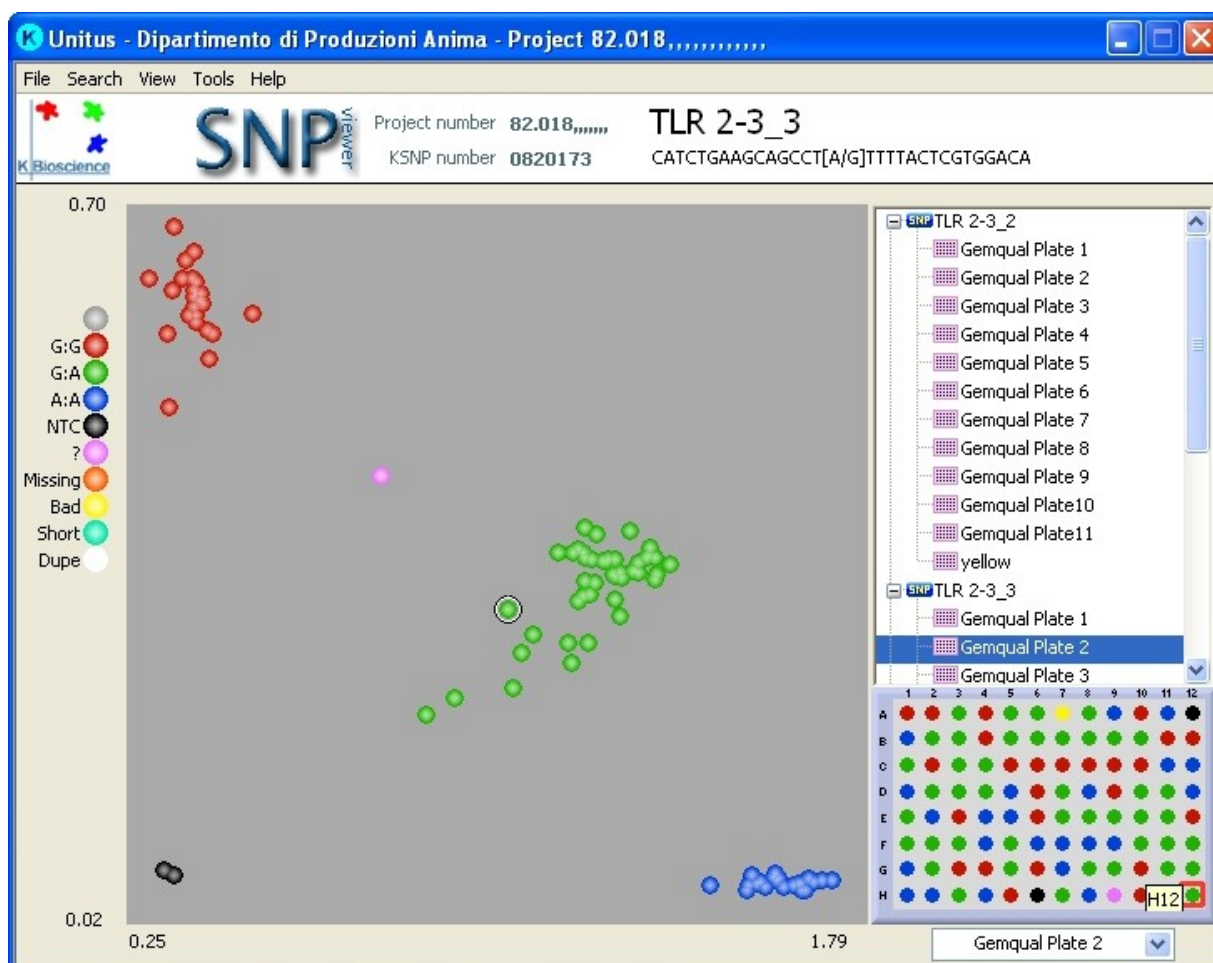


Figura 5: Distribuzione degli alleli G/G, G/A e A/A per lo SNP TLR2_767.

La tipizzazione degli individui è stata commissionata alla ditta KBiosciences (Herts, UK, <http://www.kbioscience.co.uk>) che per l'analisi utilizza Amplifluor™ (Serologicals™) e Taqman™ (Applied Biosystem™).

La percentuale di successo dell'analisi risulta superiore al 97%. Vengono fatti dei controlli negativi su acqua e delle repliche intra e inter-piastra. I risultati dell'analisi, riportati in una tabella excel, sono visualizzati con il programma SNPviewer (Fig. 5).

Sono stati calcolati con POWERMARKER: la frequenza allelica, l'eterozigosità attesa (He), l'eterozigosità osservata (Ho) e il PIC (polymorphism information content) (Tab. 24).

Tabella 24: Frequenza dell'allele maggiore (F.A.M.), numero di individui analizzati (N.i.), numero di analisi effettuate (N.a.), eterozigosità attesa (He), eterozigosità osservata (Ho), contenuto dell'informazione polimorfica (PIC).

Locus	F.A.M.	N.i.	N. a.	He	Ho	PIC
<i>TLR2_591</i>	0,866	951	908	0,233	0,205	0,206
<i>TLR2_738</i>	0,969	951	906	0,060	0,051	0,058
<i>TLR2_767</i>	0,557	951	906	0,493	0,461	0,372
<i>TLR4_254</i>	0,595	951	877	0,482	0,466	0,366
<i>TLR4_1678</i>	0,655	951	896	0,452	0,421	0,350
<i>TLR4_2043</i>	0,843	951	883	0,264	0,234	0,230
<i>TLR6_855</i>	0,608	951	916	0,477	0,444	0,363
<i>TLR6_2315</i>	0,688	951	878	0,429	0,425	0,337

Il calcolo delle frequenze alleliche mostra che sette delle razze analizzate risultano monomorfe nel *locus TLR2_738* (Highlands, Jersey, Limousine, Marchigiana, Maremmana, Simmenthal e South Devon); inoltre la South Devon risulta monomorfa nel *locus TLR2_591* e la Highlands risulta monomorfa nel *locus TLR4_2043* (Tab. 25).

Tabella 25: Frequenze alleliche nelle razze.

LOCUS	TLR2_591		TLR2_738		TLR2_767		TLR4_254		TLR4_1678		TLR4_2043		TLR6_855		TLR6_2315	
ALLELE	A	G	A	G	A	G	A	G	C	T	C	T	A	G	C	T
A. Angus	0,011	0,989	0,012	0,988	0,693	0,307	0,837	0,163	0,683	0,317	0,989	0,011	0,581	0,419	0,349	0,651
A. Valles	0,086	0,914	0,016	0,984	0,548	0,452	0,581	0,419	0,635	0,365	0,898	0,102	0,373	0,627	0,234	0,766
Avilena	0,250	0,750	0,031	0,969	0,317	0,683	0,712	0,288	0,533	0,467	0,913	0,087	0,437	0,563	0,353	0,647
Casina	0,327	0,673	0,152	0,848	0,432	0,568	0,538	0,462	0,649	0,351	0,848	0,152	0,302	0,698	0,196	0,804
Charolais	0,114	0,886	0,044	0,956	0,487	0,513	0,545	0,455	0,671	0,329	0,840	0,160	0,353	0,647	0,336	0,664
Danish Red	0,035	0,965	0,017	0,983	0,595	0,405	0,632	0,368	0,582	0,418	0,796	0,204	0,500	0,500	0,324	0,676
Highlands	0,011	0,989	0	1	0,932	0,068	0,415	0,585	0,564	0,436	1	0	0,260	0,740	0,239	0,761
Holstein	0,147	0,853	0,154	0,846	0,759	0,241	0,417	0,583	0,740	0,260	0,855	0,145	0,366	0,634	0,364	0,636
Jersey	0,170	0,830	0	1	0,372	0,628	0,707	0,293	0,888	0,112	0,413	0,587	0,776	0,224	0,582	0,418
Limousine	0,271	0,729	0	1	0,479	0,521	0,583	0,417	0,616	0,384	0,819	0,181	0,340	0,660	0,326	0,674
Marchigiana	0,030	0,970	0	1	0,529	0,471	0,894	0,106	0,338	0,662	0,833	0,167	0,557	0,443	0,559	0,441
Maremmana	0,093	0,907	0	1	0,517	0,483	0,572	0,428	0,742	0,258	0,884	0,116	0,330	0,670	0,331	0,669
Piemontese	0,215	0,785	0,038	0,962	0,405	0,595	0,675	0,325	0,538	0,462	0,817	0,183	0,500	0,500	0,281	0,719
Pirenaica	0,132	0,868	0,014	0,986	0,650	0,350	0,418	0,582	0,690	0,310	0,963	0,037	0,215	0,785	0,174	0,826
Simmenthal	0,096	0,904	0	1	0,717	0,283	0,522	0,478	0,591	0,409	0,875	0,125	0,519	0,481	0,395	0,605
S. Devon	0	1	0	1	0,838	0,163	0,638	0,363	0,907	0,093	0,643	0,357	0,116	0,884	0,085	0,915

I campioni hanno presentato una frequenza dell'allele maggiore compresa tra 0,557 e 0,969; un'eterozigosità attesa tra 0,060 e 0,493; un'eterozigosità osservata tra 0,051 e 0,466 e un contenuto dell'informazione polimorfica tra 0,058 e 0,372.

Tabella 26: Test di equilibrio di Hardy - Weinberg, *F_{ST}*, *F_{IT}* e *F_{IS}* (*significativi, *p-value* <0.01).

Locus	<i>F_{ST}</i>	<i>F_{IT}</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>Hw Test</i>
<i>TLR2_591</i>	0,074	0,124	0,055	0,0007*
<i>TLR2_738</i>	0,070	0,157	0,093	0,0011*
<i>TLR2_767</i>	0,099	0,072	-0,030	0,0542
<i>TLR4_254</i>	0,058	0,037	-0,022	0,2693
<i>TLR4_1678</i>	0,058	0,074	0,016	0,0345
<i>TLR4_2043</i>	0,120	0,121	0,001	0,0012*
<i>TLR6_855</i>	0,086	0,074	-0,013	0,0303
<i>TLR6_2315</i>	0,054	0,014	-0,043	0,7460

Usando lo stesso software è stato eseguito il test per l'equilibrio di Hardy – Weinberg. Gli SNPs *TLR2_591*, *TLR2_738* e *TLR4_2043* non risultano essere in equilibrio, mentre lo sono gli SNPs *TLR2_767*, *TLR4_254*, *TLR4_1678*, *TLR6_855* e *TLR6_2315* (considerando significativo *p-value* < 0.01).

I campioni hanno presentato valori di *F_{ST}* tra 0,120 e 0,054; valori di *F_{IT}* tra 0,157 e 0,124; e valori di *F_{IS}* tra 0,093 e -0,043.

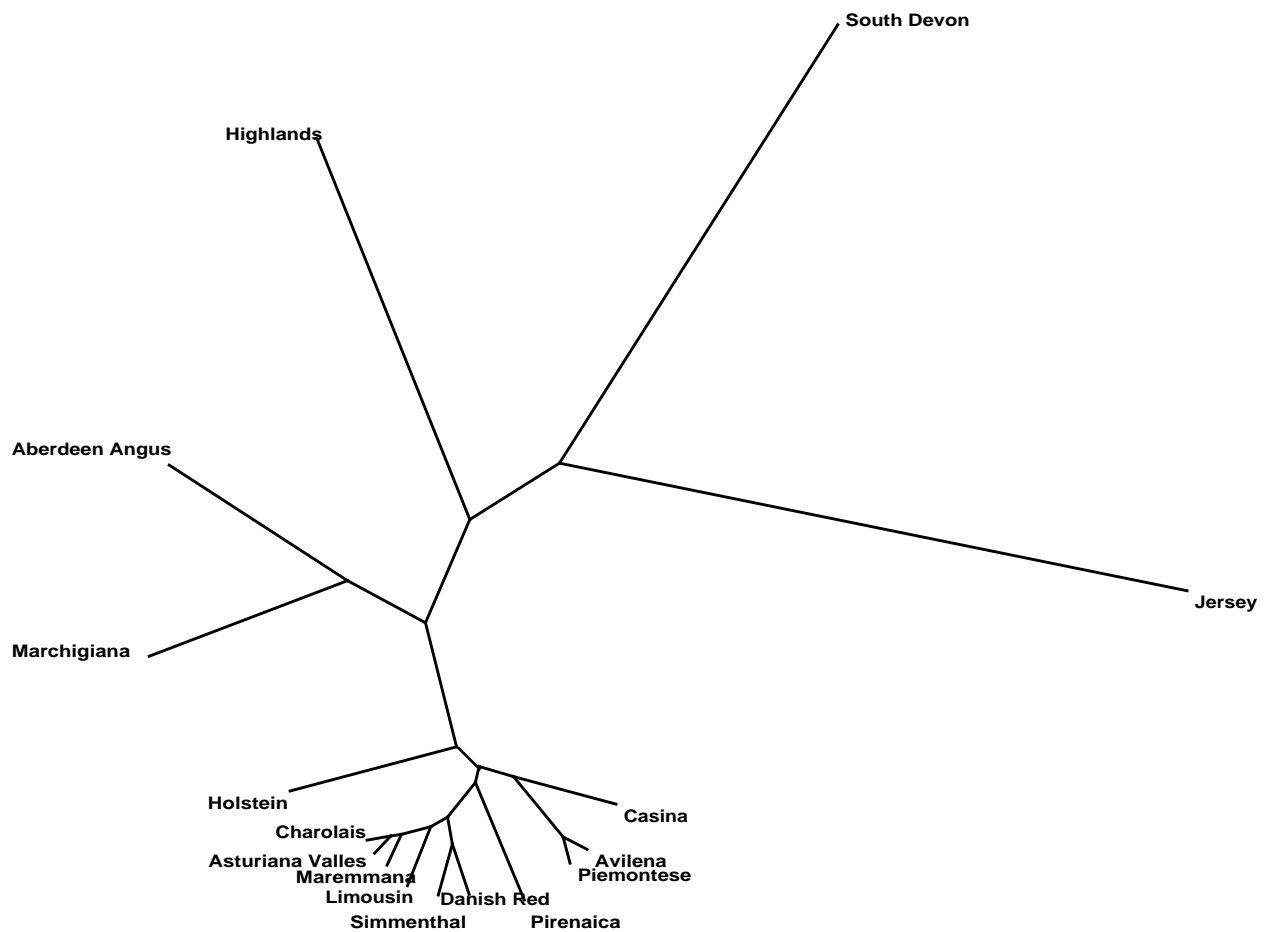
È stata calcolata la distanza genetica utilizzando l'indice di Nei (1983).

Tabella 27: Distanze genetiche (Nei, 1983).

	Aberdeen Angus	Asturiana Valles	Avilena	Casina	Charolais	Danish Red	Highlands	Holstein	Jersey	Limousin	Marchigiana	Maremmana	Piemontese	Pirenaica	Simmenthal	South Devon
Aberdeen Angus	0															
Asturiana Valles	0.016	0														
Avilena	0.027	0.010	0													
Casina	0.044	0.012	0.011	0												
Charolais	0.023	0.002	0.008	0.009	0											
Danish Red	0.014	0.004	0.015	0.022	0.005	0										
Highlands	0.029	0.027	0.057	0.058	0.037	0.034	0									
Holstein	0.032	0.013	0.027	0.014	0.009	0.015	0.033	0								
Jersey	0.061	0.048	0.044	0.058	0.039	0.036	0.117	0.056	0							
Limousin	0.032	0.007	0.007	0.012	0.006	0.012	0.045	0.020	0.038	0						
Marchigiana	0.020	0.026	0.023	0.052	0.028	0.015	0.060	0.050	0.048	0.029	0					
Maremmana	0.019	0.003	0.013	0.018	0.004	0.007	0.030	0.016	0.040	0.005	0.028	0				
Piemontese	0.026	0.007	0.003	0.009	0.006	0.008	0.055	0.020	0.035	0.006	0.022	0.011	0			
Pirenaica	0.029	0.006	0.023	0.016	0.010	0.018	0.018	0.013	0.076	0.014	0.052	0.009	0.021	0		
Simmenthal	0.016	0.007	0.019	0.027	0.009	0.005	0.023	0.014	0.041	0.010	0.021	0.007	0.014	0.015	0	
South Devon	0.053	0.035	0.073	0.060	0.040	0.037	0.046	0.044	0.082	0.049	0.076	0.033	0.060	0.035	0.044	0

Dall'analisi dei dati mostrati in Tab. 27 si riscontra che Highlands e Jersey presentano la distanza maggiore (0,117), mentre il valore minimo si osserva tra Charolais e Asturiana Valles (0,002).

Figura 6: Relazione filogenetica tra le 16 razze analizzate. Le distanze genetiche sono state calcolate a partire dalle frequenze alleliche usando la distanza di Nei (83). La ricostruzione è stata fatta con UPGMA (Sneath PHA & Sokal RR 1973).



I genotipi, inoltre, sono stati analizzati utilizzando il software FDist (Beaumont and Nichols, 1996), per individuare i *loci* che potrebbero essere sotto selezione nelle popolazioni campionate. I dati sono stati costruiti con 200,00 repliche di bootstrap su dei dati reali usando un modello coalescente (Fig. 7).

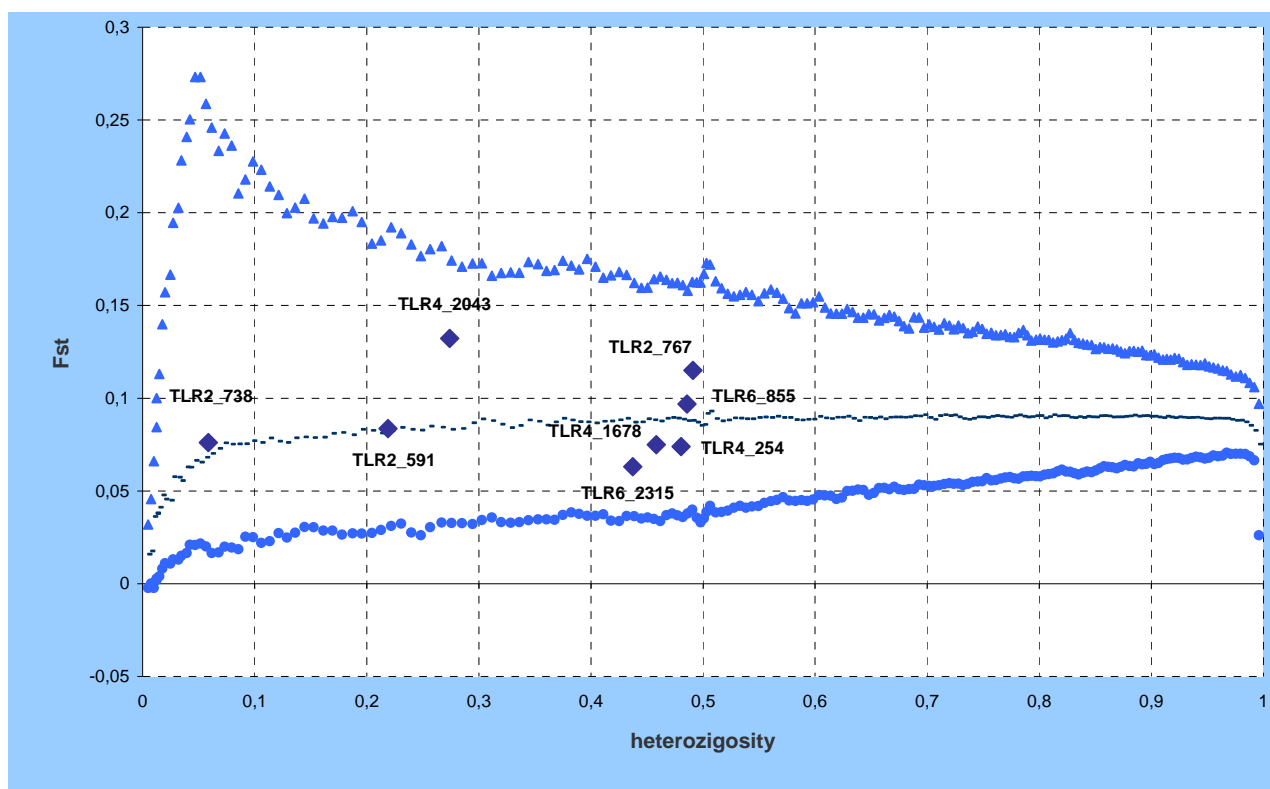


Figura 7: Distribuzione degli SNPs analizzati in base a valori di *FST* e eterozigosità. Mediana (-), limite superiore (▲) e inferiore (●) nell'intervallo di confidenza del 95%.

5. DISCUSSIONE

5.1 Associazione tra polimorfismi e malattie

L'analisi effettuata nei geni bovini *TLR2*, *TLR4* e *TLR6* ha permesso di individuare 8 nuovi SNPs (*TLR2_591*, *TLR2_738*, *TLR2_767*, *TLR4_254*, *TLR4_1678*, *TLR4_2043*, *TLR6_855* e *TLR6_2315*) non presenti in banca dati. I polimorfismi su singoli nucleotidi rappresentano un eccellente marcatore genetico per vari studi di popolazione e per individuare, ad esempio, le tracce della selezione naturale.

Inoltre, è ormai noto che attraverso la comparazione delle differenze genetiche interindividuali può essere possibile determinare il contributo dei geni ad incidenza o predisposizione alle malattie.

Ogni individuo, geneticamente, è più o meno suscettibile a sviluppare alcune patologie. La suscettibilità ad una certa patologia naturalmente non coincide con la certezza di ammalarsi, bensì indica un aumentato rischio rispetto alla popolazione generale. In questo caso i geni, di per se, non sono sufficienti a scatenare la malattia: la comparsa dei sintomi è dovuta, infatti, ad un'interazione tra fattori genetici e fattori ambientali (stress, alimentazione, ecc.).

La quasi totalità delle patologie che interessano l'uomo mostra questo carattere di multifattorialità, essendo determinata dalla concomitante interazione tra più geni e l'ambiente. Ad oggi, sono già stati identificati circa 3 milioni di SNPs nell'uomo, ma si calcola che ve ne siano almeno 10 milioni.

Una volta identificate tutte queste variazioni sarà possibile condurre, con maggiore velocità e sensibilità rispetto a quanto fatto fino ad ora, studi di “associazione”. Con tale termine si indica uno studio volto a determinare le differenze genetiche tra due popolazioni distinte di soggetti: una caratterizzata dalla presenza di una data malattia, l'altra caratterizzata dalla sua assenza. SNPs maggiormente presenti in una popolazione (ad es. quella dei malati) rispetto all'altra, possono considerarsi con buona approssimazione coinvolti nel processo patogenetico che conduce allo sviluppo della malattia in esame.

L'identificazione dei geni responsabili della suscettibilità garantirebbe una migliore comprensione della patogenesi della malattia, evidenziando meccanismi molecolari non noti. Conseguentemente si potrebbe disporre di nuovi “bersagli” contro i quali sviluppare farmaci e terapie più efficaci e valutare e controllare il grado individuale di “risposta” alle varie terapie. Occorre, inoltre, considerare il grande vantaggio dato dalla possibilità di identificare precocemente gli individui con più alto rischio di sviluppare una data patologia. Evitando l'esposizione ai fattori ambientali scatenanti questi soggetti potrebbero ridurre sensibilmente il proprio rischio di sviluppare la malattia. Nel caso di animali in produzione questo potrebbe essere utilizzato negli schemi di allevamento, eliminando dalla riproduzione i soggetti portatori di alleli non favorevoli.

Nell'analisi effettuata confrontando gli 8 SNPs su 57 bovini, malati e rispettivi controlli, si è cercato di individuare una qualche differenza che potesse indicare una suscettibilità o resistenza verso le 4 malattie prese in considerazione (IBR, mastite, paratubercolosi e enterite). I risultati statistici non hanno evidenziato correlazione; questo, però, potrebbe essere dovuto al numero ancora limitato di campioni analizzati, data la difficoltà nel reperirli.

Nel caso dei bovini affetti da IBR è interessante l'osservazione che in tre casi (Tab. 8, Tab. 9 e Tab. 10) si ha un valore zero per gli individui sani: nel locus

4_254 si riscontra un'assenza dell'eterozigote A/G, nel locus 4_1678 si riscontra un'assenza della base C e nel locus 4_2043 si riscontra un'assenza della base T. Questi tre casi, dunque, potrebbero rappresentare un'ipotesi di sensibilità alla malattia dovuta alla specifica caratteristica genetica. Ovviamente questo primo passo dovrà essere accuratamente investigato in studi successivi, in relazione al fatto che l'IBR è una delle patologie più diffuse nei bovini e al momento le uniche vie da seguire contro l'infezione del *Bovine Herpesvirus 1* sono la vaccinazione o l'abbattimento dei capi.

5.2 Frequenza dei polimorfismi nelle razze bovine europee

Nell'analisi degli 8 SNPs, effettuata su 951 individui di 16 razze europee, è interessante notare che il locus *TLR2_738* è fissato in tre razze britanniche, Highlands, Jersey e South Devon. Inoltre, le uniche due razze ad avere 2 alleli fissati sono proprio South Devon e Highlands.

In generale, il locus *TLR2_738* risulta monomorfo in un totale di 7 razze: Highlands, Jersey, Limousine, Marchigiana, Maremmana, Simmenthal e South Devon. Inoltre il locus *TLR2_738* ha frequenza minore di 0,05% in altre sette razze (Aberdeen Angus, Asturiana Valles, Avilena, Charolais, Danish Red, Piemontese e Pirenaica) ed ha, invece, frequenza maggiore di 0,05% solamente in Holstein e Casina (Tab. 25). Si potrebbe ipotizzare un qualche ruolo importante del gene che ne sfavorisce il polimorfismo.

Nessuno degli SNPs analizzati è risultato essere al di fuori del limite di confidenza fissato al 95% per la distribuzione congiunta di *F_{ST}* ed eterozigosi media (Fig. 7). Gli SNPs identificati non sembrano quindi essere compresi in loci sotto selezione, almeno secondo il modello applicato (Beaumont and

Nichols, 1996). Quindi gli SNPs possono essere considerati come marcatori neutrali ed impiegati per studi di popolazione nelle popolazioni bovine.

È da notare, tuttavia, che non tutti i polimorfismi sono in equilibrio di Hardy - Weinberg. Si potrebbe ipotizzare che i polimorfismi siano fissati nelle razze esaminate da numerose generazioni e che il modello coalescente utilizzato non sia sufficientemente potente da evidenziare eventi di selezione avvenuti in tempi così remoti.

Le distanze di Nei mostrano che le razze maggiormente diverse dal punto di vista genetico sono quelle isolate geograficamente. In particolare è interessante notare (Fig. 6) che le razze britanniche Aberdeen Angus, Highlands, South Devon e Jersey, sulla base dei polimorfismi analizzati si distribuiscono in accordo con la loro provenienza geografica.

6. CONCLUSIONI

Sono stati identificati 8 nuovi SNPs in geni di grande importanza nella risposta ai patogeni. Di questi uno (*TLR6_855*) risulta essere uno SNP non sinonimo, e conseguentemente meriterebbe di essere studiato in dettaglio.

Gli SNPs sono stati caratterizzati su quasi 500 individui appartenenti a 16 delle principali razze bovine europee. Le informazioni, unite al fatto che gli 8 SNPs sono risultati marcatori neutrali in base all'analisi con FDIST, ne possono permettere l'utilizzo in studi di genetica di popolazione nei bovini.

Per quanto riguarda l'associazione dei polimorfismi ad alcune malattie bovine, i dati sono ancora preliminari. Uno dei maggiori problemi riscontrati è stato, infatti, reperire non tanto gli individui malati quanto i relativi controlli, ovvero prelievi di sangue di individui sani allevati nella stessa stalla alle medesime condizioni. Tuttavia, in particolare per quanto riguarda l'IBR, le analisi saranno condotte su un maggior numero di individui per confermare l'assenza nei sani dell'eterozigote A/G nel *locus TLR4_254*, l'assenza della base C nel *locus 4_1678* e l'assenza della base T nel *locus TLR4_2043*.

7. BIBLIOGRAFIA

- Akira S., Takeda K., Kaisho T. (2001) *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat. Immunol. 2, 675-680.*
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Keith R., Peter W. (2004) *Biologia Molecolare della cellula.*
- Arrigoni N. (2001) *Paratuberculosis bovina: malattia antica d'attualità.*
- Beaumont and Nichols, 1996, *Proc. Roy. Soc. Lond. B. 263: 1619-1626.*
- Beutler B., Rehli M., (2002) *Evolution of the TIR, tolls and TLRs: functional inferences from computational biology. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 270, 1-21.*
- Dabbagh K., Dahl M.E., Stepick-Biek P., Lewis D.B. (2002) *TOLL-like receptor 4 is required for optimal development of T_H2 immune responses: role of dendritic cells. J. Immunol. 168, 4524-4530.*
- De Schepper S., De Ketelaere A., Bannerman D.D., Paape M.J., Peelman L., Burvenich C. (2008) *The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of Escherichia coli mastitis in dairy cattle. Vet. Res. 39:05.*
- Franceschi A., Cassini P., Scalabrini D., Botti S., Bandi C.M., Giuffra E. (2004) *Radiation hybrid mapping of two members of the toll-like receptor gene family in pigs. Animal Genetics 35, 245-64.*

- Goldammer T., Zerbe H., Molenaar A., Schuberth H.J., Brunner R.M., Kata S.R., Seyfert H.M. (2004) Mastitis increases mammary mRNA abundance of β -defensin 5, toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clinical and Diagnostic laboratory Immunology* 11, 174-85.
- Haig D.M., Hopkins J., Miller H.R. (1999) Local immune responses in afferent and efferent lymph. *Immunology* 96, 155-163.
- Hall, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41 (1999) 95.
- Horng T., Medzhitov R. (2001) *Drosophila* MyD88 is an adapter in the TOLL signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12654-12658.
- Ingalls R.R., Heine H., Lien E., Yoshimura A., Golenbock D. (1999) Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 13 (vii), 341-353.
- Jones B.W., Heldwein K.A., Means T.K., Saukkonen J.J., Fenton M.J. (2001) Differential roles of TOLL-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macro-phages. *Ann. Rheum. Dis.* 60 (Suppl 3), iii6-12.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffman J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Liu K. and Muse SV, *Bioinformatics.* 2005 May 1;21 (9): 2128-9.
- McGuire K., M. Jones, D. Werling, J. L. Williams, E. J. Glass and O. Jann (2005) Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Animal Genetics*, 37, 47-50.

- Medzhitov R., Janeway Jr., C.A. (1997) *Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition. Cell 91, 295-298.*
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway Jr., C.A. (1997) *A human homologue of the Drosophila TOLL protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388, 394-397.*
- Muneta Y., Uenishi H., Kikuma R., Yoshihara K., Shimoji Y., Yamamoto R., Hamashima N., Yokomizo Y., Mori Y. (2003) *Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in Mycoplasma hyopneumoniae infection. Journal of Interferon and Cytokine Research 23, 583-90.*
- Muylkens B., Thiry J., Kirten P., Schynts F., Thiry E. (2007) *Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. Vet. Res. 38, 181-209.*
- Omura N., Myajima N., Sazuka T., Tanaka A., Kawarabayasi Y., Sato S., Nagase T., Seki N., Ishikawa K., Tabata S. (1994) *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. Part I. The coding sequences of 40 new genes deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. DNA Res. 1, 27-35.*
- Opsal M.A., Vage D.I., Hayes B., Berget I., 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., 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. U.S.A. 97, 13766-13771.*
- *Page, R. D. M. 1996 TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.*
 - *Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Huffel C.V., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. Science 282, 2085-2088.*
 - *Polyprimers. <http://www.unitus.it/SAG/primers.zip>*
 - *Rescigno M., Granucci F., Citterio S., Foti M., Ricciardi-Castagnoli P. (1999) Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. Immunol. Today 20, 200-203.*
 - *Sallusto F., Palermo B., Lenig D., Miettinen M., Matikainen S., Julkunen I., Forster R., Burgstahler R., Lipp M., Lanzavecchia A. (1999) Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. Eur J. Immunol. 29, 1617-1625.*
 - *Saunja Pandey and Devendra K Agrawal (2006) Immunobiology of Toll-like receptors: Emerging trends. Immunology and Cell Biology 84, 333-341.*
 - *Sneath PHA & Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.*

- Stein D., Roth S., Vogelsang E., Nusslein-Volhard C. (1991) *The polarity of the dorsoventral axis in the Drosophila embryo is defined by an extracellular signal. Cell 65, 725-735.*
- Takeuchi O., Akira S. (2001) *TOLL-like receptors; their physiological role and signal transduction system. Int. Immunopharmacol. 1, 625-635.*
- Takeuchi O., et al. (1999) *TLR6: a novel member of an expanding toll-like receptor family. Gene 231, 59-65.*
- Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S. (1999) *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacteria cell wall components. Immunity 11, 443-451.*
- Takeuchi O., Kauffmann A., Grote K., Kawai T., Hoshino K., Morr M., Muhlradt P.F., Akira S. (2000) *Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a TOLL-like receptor 2-and MyD88-dependent signaling pathway. J. Immunol. 164, 554-557.*
- Tauszig S., Jouanguy E., Hoffmann J.A., Imler J.L. (2000) *Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 10520-10525.*
- Uwiera R.R., Gerds V., Pontarollo R.A., Babiuk L.A., Middleton D.M., Griebel P.J. (2001) *Plasmid DNA induces increased lymphocyte trafficking: a specific role for CpG motifs. Cell Immunol. 214, 155-164.*
- Werling D. & Jungi T.W. (2003) *Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. Veterinary Immunology and Immunopathology 91, 1-12.*

- White A.N., Kata S.R., Womack J.E. (2003) *Comparative fine maps of bovine toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 regions. Mammalian Genome 14, 149-55.*
- Yilmaz A., Shen S.X., Adelson D.L., Xavier S., Zhu J.J. (2005) *Identification and sequence analysis of chicken toll-like receptors. Immunogenetics 56, 743-753.*
- Zarembek K.A., Godowski P.J. (2002) *Tissue expression of human TOLL-like receptors and differential regulation of TOLL-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. J. Immunol. 168, 554-561.*

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.