

УДК 636.2:612.017.11:575.174.015.3:571.27  
DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.2.22-37

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ТОЛЛ - ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (обзор)

<sup>1</sup>Новак К., <sup>2</sup>Калашников А.Е., <sup>2</sup>Калашникова Л.А., <sup>3</sup>Ялуга В.Л.,  
<sup>3</sup>Селькова И.В., <sup>2</sup>Захаров В.М.

<sup>1</sup>Институт животноводства МСХ, Чешская Республика; <sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела, Москва; <sup>3</sup>Исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. ак. Н.П. Лаверова, УрО РАН, АрхНИИсх, Архангельск, Российская Федерация

Исследование генетических факторов, влияющих на состояние здоровья высокопродуктивных животных, может открыть новые пути решения в борьбе с болезнями, вызываемых микробными и вирусными патогенами. Структурное разнообразие толл-подобных рецепторов (TLR), как наиболее часто исследуемых факторов врождённого иммунитета, изучается у всех основных видов животных. Основные разделы обзора: генетическое разнообразие TLR; значение сведений о полиморфизме TLR для успешной борьбы с болезнями животных; перспективы изучения TLR в селекции животных. Выявленные частоты и группировки гаплотипов отдельных полиморфизмов TLR используются для отслеживания происхождения этих изменений как независимых индикаторов функциональных изменений. Выявлены варианты TLR, ассоциированные с маститом и микобактериальными инфекциями у крупного рогатого скота, поэтому применение данных генотипирования при разведении может быть использовано в программах селекции животных на устойчивость к болезням. Выявленные ассоциативные закономерности указывают на то, что повышение врождённой устойчивости возможно для большого числа видов животных. Поэтому традиционные породы и аборигенные популяции животных следует рассматривать как ресурсы генетического разнообразия, применимые для выведения новых пород животных, устойчивых к заболеваниям и влиянию производственных факторов.

*Ключевые слова:* крупный рогатый скот, врождённый иммунитет, толл-подобные рецепторы, полиморфизм ДНК, иммунный статус

*Проблемы биологии продуктивных животных. 2021, 2: 22-37*

### Введение

В настоящее время борьба с болезнями сельскохозяйственных животных представляет собой постоянную статью расходов на ветеринарное обслуживание хозяйств. Во всем мире обеспечение безопасного содержания животных и увеличение их устойчивости к болезням - предмет масштабных исследовательских программ, которые часто реализуются под эгидой международных организаций в области ветеринарии и селекции (GREP, Global Rinderpest Eradication Programme) (FAO, Final report, 2011). Несмотря на эффективность борьбы посредством вакцинации и терапии антибиотиками с патогенами, появление резистентных возбудителей сильно осложняет работу с животными (Phillips, 2004).

Использование потенциала врождённого иммунитета сельскохозяйственных животных позволяет внести решающий вклад в обеспечение здоровья при разведении, улучшить благополучие животных, совершенствовать селекционные программы. Поскольку на работу врождённого иммунитета меньше влияет индивидуальный иммунологический статус, чем адаптивный иммунитет, то сила ответа в значительной степени определяется полиморфизмом ключевых генов. Поиск полиморфизмов, в первую очередь, сосредоточен на генах, кодирующих основные компоненты врождённого иммунитета, особенно это касается семейства паттернов рецепторов распознавания (PRR, pattern-recognition receptors). PRR включают в себя NOD-подобные рецепторы (NLR), которые делятся на три подгруппы, так называемые RIG-подобные рецепторы (RLR), суперсемейство рецепторов

очистки клетки, богатых цистеином (SRCR), домен-содержащие рецепторы и толл-подобные рецепторы (TLR), которые наиболее часто исследованы (Kawai, Akira, 2010).

Цель обзора – систематизация имеющейся информации по методам исследований и результатам изучения связи полиморфизмов TLR со здоровьем сельскохозяйственных животных, а также оценка перспектив использования полиморфизма TLR в практической селекции на устойчивость животных к заболеваниям.

### Генетическое разнообразие TLR

*Происхождение, эволюция и сохранение TLR.* Изначально рецепторы врождённого иммунитета были открыты у беспозвоночных (*Drosophila*) (белок *toll*, который первоначально назывался рецептором) (Stein et al., 1991). В дальнейшем выяснили, что этот белок вносит свой вклад в устойчивость насекомых-хозяев к грибковым патогенам, таким как *Aspergillus fumigatus*. Толл-подобные рецепторы участвуют в начальных этапах распознавания основных микробных и вирусных структур и обеспечивают рецепторные взаимодействия с хитиноподобными молекулами – производными грибов, для активации отклика беспозвоночного хозяина (Nomura et al., 1994). В настоящее время считается, что основная роль системы толл-рецепторов заключается в регуляции устойчивости к бактериальным инфекциям, что реализуется посредством мутационной инактивации ключевых адаптерных молекул (Franzenburg et al., 2012).

Самая интересная особенность TLR – их высокая межвидовая гомология среди эукариот (White et al., 2003). Гомологичные рецепторы, участвующие в антимикробной защите организма, также были обнаружены в растениях (Zhou et al., 2012). У большинства видов животных гены TLR кодируют множество рецепторов естественного иммунитета, которые функционально дополняют друг друга. В процессе поиска генетического разнообразия TLR выявлено, что ген-предок выполнил свою функцию в иммунитете организма-хозяина примерно 500 миллионов лет назад. Ген TLR10 образовался из предшественников TLR1 и TLR6 приблизительно 300 миллионов лет назад, когда как TLR4 млекопитающих выделился 180 миллионов лет назад, а гены TLR3, 5, 7 и 8 подразделились 150 миллионов лет назад (Du et al., 2000). Как показано на примере гена TLR2, признаки положительного отбора обнаруживаются в разнообразии древних млекопитающих (Jann et al., 2008).

*Распределение TLR по степени их значимости.* Выявлена высокая степень гомологии последовательностей белков мышей и человеческих генов, что облегчает конструирование *in silico* специфических праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР) и генетическую идентификацию. Для серии TLR, распознающих бактерии, исследованы последовательности всех экзонов с помощью 30 различных фрагментов амплификации (Werling, Jungi, 2003; White et al., 2003; Seabury et al., 2007), и приблизительно такое же количество ампликонов потребовалось для изучения противовирусной серии TLR (Cargill, Womack, 2007).

В то же время, 9 генов Толл-подобных белков обнаружены в геноме дрозофилы (Tirumurugaan et al., 2010), тогда как количество генов у позвоночных варьирует от 10 до 17. У крупного рогатого скота (КРС) семейство TLR включает 10 генов, у мышей – 13 (Kaisho, Akira, 2006; Kawaim, Akira, 2010). Изначально гены TLR были сопоставлены с последовательностью генома КРС с использованием радиационного гибридного картирования (Werling, Jungi, 2003; White et al., 2003; McGuire et al., 2005) и обнаружены на семи хромосомах. Гены TLR10, TLR1 и TLR6 образуют кластер на 6-й хромосоме (Opsal et al., 2006), а TLR7 и TLR8 расположены на половой X хромосоме рядом друг с другом, вместе с псевдогеном TLR. По аналогии, картированы гены TLR свиней и овец (Jann et al., 2009) и локализации *in situ* гена TLR3 лошадей (Astakhova et al., 2009).

Типичную экзон/интрон структуру гена TLR млекопитающих можно увидеть на примере генов КРС. Гены TLR1, 2, 3, 4, 6, и 9 содержат 5, 2, 5, 3, 4 и 2 экзона, соответственно, а TLR5, 7, 8 и 10 являются моноэкзонными (Cargill, Womack, 2007; Seabury et al., 2007). Статистический анализ показал, что геномные последовательности генов TLR у КРС содержат множество мобильных элементов, включая SITE, LINE и последовательности ретротранспозонов (Seabury, Womack, 2008; Seabury et al., 2010). У овец описаны кодирующие последовательности TLR 1-10 и 3'-нетранслируемые последовательности в генах TLR1, 6 и 10 (Chang et al., 2009). В исследованиях отмечается что, у овец для TLR наблюдалось высокое сходство нуклеотидных последовательностей с генами КРС, свиней,

человека и мышей, за исключением противоположного соотношения между коротким и длинным вариантами сплайсинга для гена TLR6 по сравнению с KPC.

Наиболее заметное различие между генами TLR продемонстрировано у птиц. Для куриц выявлено отсутствие кластера, содержащего гены TLR1, 6 и 10, который заменяется дублированными парами генов TLR1LA и TLR1LB. Кроме того, обнаружено, что ген TLR2 дублируется, а гены TLR8 и 9 отсутствуют (Yang et al., 2012). Тем не менее, выявлены гены TLR15 (который часто встречается у рептилий) и TLR21 (часто встречается у рыб) (Boyd et al., 2012). Дальнейшая диверсификация TLR продемонстрирована у рыб, и показано, что виды рыб содержат до 17 генов членов семейства TLR (Rebl et al., 2010).

*Функции TLR.* Несмотря на то, что впервые для TLR, их роль описана для гибели насекомых от патогенов, они в первую очередь участвуют в распознавании молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular patterns (PAMP) у позвоночных. Родственные члены семейства таких рецепторов охватывают все характерные молекулярные структуры, происходящих от вирусных, бактериальных и грибковых патогенов (Kaisho, Akira, 2006). Тогда как TLR1, 5, 6 и 10 влияют на распознавание структур клеточной стенки бактерий (так называемые антибактериальные TLR), то TLR3, 7, 8 и 9, распознают структуры, специфичные для капсида и генома вирусов (противовирусные TLR). Следует заметить, что TLR2 и 4 распознают молекулярные структуры, специфичные для обеих групп патогенов.

По природе лиганда TLR можно разделить на группы, обладающие специфичностью для липидов, белков и нуклеиновых кислот (Kaisho, Akira, 2006). Специфика TLR4 наблюдается по отношению к бактериальным липополисахаридам (LPS). В опытах была отмечена мутация, которая подавляет способность организма мыши распознавать структуры бактерий и мутантные линии. Животные оказались восприимчивы к инфекциям грамм-отрицательными бактериями (Poltorak et al., 1998)]. Как и ожидалось, фенотип гомозиготных мутантов LPS (d/d) обладает приобретённой толерантностью к летальному воздействию бактериальных эндотоксинов, то есть бактериальных LPS в высоких дозах. Эта особенность в дальнейшем была использована для скрининга и выявления мутантов (Qureshi et al., 1999). Кроме того, образование комплекса {TLR4-лиганд} необходимо для формирования адаптивного иммунного ответа (Wiens, 2007).

Как у беспозвоночных, так и у позвоночных, TLR4 работает в паре с белком - дополнительным рецептором MD2 из семейства ML. Это семейство включает в себя белки MD-1, NPC2 (болезнь Ниманна-Пика, тип C2), и белки основных аллергенов клещей для животных, растений и грибов (Shi et al., 2012). В то же время, TLR5 участвует в распознавании бактериальных флагеллинов как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (Hayashi et al., 2001). Для работы TLR5, как и TLR4, также может потребоваться присутствие сопутствующего белка-рецептора или адапторной молекулы для обеспечения эффективного распознавания исходного лиганда и передачи сигналов (Tallant et al., 2004).

Вспомогательная роль TLR2 подчеркивается тем, что максимальный иммунный ответ на липопептиды микобактерий представлен при взаимодействии гетеродимеров TLR1/TLR2 (Krutzik, 2003). Следовательно, молекулы, распознаваемые TLR2, действуют как иммунные адъюванты (Wiens et al., 2007). Четыре белка из TLR, связанные с распознаванием вирусных структур, взаимодействовали с двухцепочечной (TLR3), одноцепочечной РНК (TLR 7 и 8) или обнаруживали CpG-мотивы ДНК (TLR9) как вирусов, так и бактерий (Kaisho, Akira, 2006). Специфичность связывания TLR10 остаётся в настоящее время неясной, т.к. этот рецептор отсутствует у каких-либо модельных животных, за исключением крыс (Hasan et al., 2005).

Молекулярная архитектура семейства TLR сложна и сравнительно едина. Гены TLR млекопитающих кодируют транс-мембранные белки 1-го типа, содержащие значительный внеклеточный домен (рис. 1). Исходя из их специфики, толл-подобные рецепторы в основном локализуются либо в плазмалемме (антибактериальные типы) или в эндоплазматическом ретикулууме (противовирусные типы) (Kaisho, Akira, 2006). Внешний (обычно внеклеточный), N-конец состоит примерно из 20 лейцин-богатых повторов (LRRs - leucine-rich repeats), каждый из которых включает 20-30 аминокислот, организованных в 3-5 консервативных доменах. Структура была получена путём моделирования гомологии с человеческим типом TLR1 (Q15399) (Wiens et al., 2007) и TLR5 (060902)

(Zhou et al., 2007) в качестве шаблонов с использованием программного обеспечения SWISS-Model на сервере ExPASy (Arnold et al., 2006).

Наличие LRR определяет пространственную форму консервативных участков внешней пептидной цепи. Лиганды, в зависимости от своего класса, связываются как с вогнутой, так и выпуклой сторонами внеклеточной области рецептора (Jin et al., 2007). Следовательно, изменчивость формирования паттернов LRR в TLR млекопитающих обуславливает специфичность связывания лиганда (Zhang et al., 2009). У КРС предполагаемые позиции аминокислот, которые в первую очередь влияют на распознавание патогенов, расположены в 9-ом аминокислотном мотиве LRR (TLR1 - LRR10), и 4-ом аминокислотным остатком ниже домена LRR (Mucha et al., 2009).

Внутренний (обычно внутриклеточный) С-концевой участок молекулы TLR отвечает за передачу патогенного триггера далее (Kaisho, Akira, 2006; Wang et al., 2008). Эта область содержит высоко консервативный домен, гомологичный рецептору интерлейкина-1 и генам устойчивости растений (Zhou et al., 2012). Акроним TIR, таким образом, обозначает ту часть толл-рецептора, которая подобна интерлейкину-1 и генам устойчивости растений. Следовательно, TLR и их гомологичные рецепторы образуют одно суперсемейство. Любопытно, что гомология между толл-рецепторами *Drosophila* и рецептором интерлейкина-1 млекопитающих была открыта до идентификации катионных толл-подобных рецепторов млекопитающих (Gay, Keith, 1991).

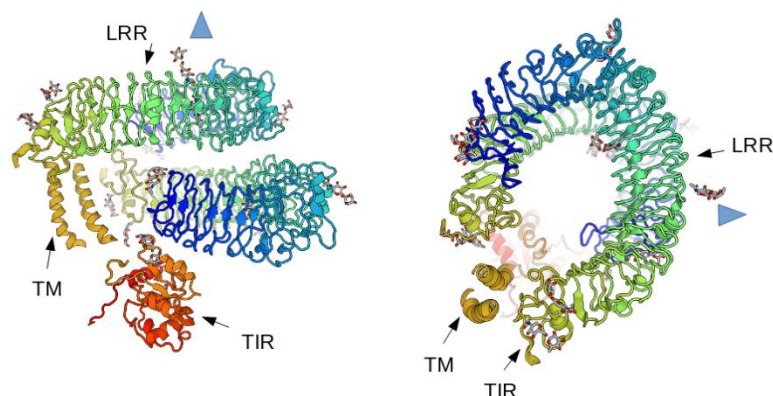


Рис. 1. Типичная структура толл-подобного рецептора TLR4 в цитоплазматической мембране. Представлены внеклеточная область, содержащая богатые лейцином повторы LRR, трансмембранный домен TM, и внутриклеточная область, содержащая домен TIR (Yang et al., 2012; Zhou et al., 2012).

Структура TIR-доменов высоко консервативна благодаря взаимодействиям с нижележащими компонентами сигнального каскада. Сайт-специфический мутагенез в мышинных генах TLR2 и TLR4 приводил к ослаблению иммунного ответа на грамм-положительные бактерии и LPS (Wiens et al., 2007). Наиболее консервативные области включают домены, участвующие в образовании гетеродимера TLR. В случае с TLR2, эти области включают домен TIR и домены LRR1, 12, 13, и 14 во внешней части молекулы (Gautam et al., 2006; Jann et al., 2008). Активация защитных механизмов в первом охарактеризованном TLR – противогрибковом рецепторе мух инициировалась в виде экспрессии конечных продуктов иммунной защиты – антимикробных белков дрозомидина и дефензина (Lemaitre et al., 1996). Таким образом, необходимо отдельно выделить важную роль нисходящей передачи сигналов в компонентах сигнальной цепи.

У дрозофилы и мышей цепь передачи сигнала расшифрована еще в 90-е годы. После активации TLR, домены TIR обычно связываются с цитоплазматическими адаптерными белками, образующими комплекс под названием миддосома (Gay et al., 2011), который опосредует передачу сигналов к нижестоящим NF $\kappa$ B-факторам транскрипции. Функция TLR тесно связана с их локализацией в определенных тканях и типах клеток (Menzies, Ingham, 2006; Jungi et al., 2011). Показано, что экспрессия белков TLR1-10 у КРС и овец происходит в разных клеточных системах организма. При

помощи qRT-PCR (ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией) у овец подтвердилось присутствие транскриптов TLR в мононуклеарных клетках крови, альвеолярных макрофагах, кератиноцитах и тканях лимфатических узлов (Chang et al., 2009). TLR4 хорошо изучен и экспрессируется в макрофагах и эпителиальных клетках нормального лёгкого, в тонком кишечнике, печени, селезенке, почках и роговице, что продемонстрировано для различных видов животных, включая свиней, собак и КРС (Tallant et al., 2004). Функция толл-подобных рецепторов в эпителиальных тканях состоит в их участии в формировании резистентности организма.

Примечательно, что на примере овец роль TLR2, 3, 4, 7, 8 и 9 в ответ на вирусную инфекцию согласуется с преимущественной локализацией этих рецепторов в лейкоцитах и эндотелиальных клетках (Mikula et al., 2010). В соответствии с предполагаемой ролью TLR, экспрессия отдельных членов семейства увеличивалась в ответ на инфекционное заболевание. В особенности, уровни мРНК TLR2 и TLR4 одновременно с  $\beta$ -дефензином 5, повышались в молочной железе коров при мастите бактериального происхождения (Goldammer et al., 2004). Несомненно, дальнейший прогресс в изучении экспрессии и активации TLR при особо значимых инфекциях, таких как мастит, будет достигнут на пути изучения методами высокопроизводительного секвенирования (next-generated sequencing, NGS) и исследования профилей транскриптомов (Gilbert et al., 2013).

*Степень полиморфизма генов толл-подобного рецепторов.* Методы NGS в настоящее время уже применяются для изучения генов TLR у КРС (Fisher et al., 2011); при этом продолжают использоваться и традиционные подходы в изучении полиморфизма. Обычно традиционные методы анализа основаны на ПЦР-амплификации выбранных фракций отдельных образцов ДНК с последующим их секвенированием по Сэнгеру (Astakhova et al., 2009). Недорогие методы основаны на образовании гетеродуплексов с дальнейшим их разделением с использованием методов электрофоретического разделения (DGGE, TGGE) или SSCP (Mroske et al., 2007). При этом стоимость капиллярного секвенирования можно снизить за счет одновременного считывания ампликонов из объединённых образцов ДНК с последующим их генотипированием (Sharma et al., 2006; Jann et al., 2008). Полученная информация о полиморфизмах генов TLR затем используется для разработки быстрых методов скрининга, например, аллель-специфичной ПЦР (Dubey et al., 2012) и ПЦР-ПДРФ (Zhang et al., 2004). Для большинства видов, в том числе КРС, накопленные знания о генетической изменчивости доступны в Интернете (<<http://bovinegenome.org/>>).

Изменчивость TLR, выявленных у изучаемых сельскохозяйственных видов, следует интерпретировать в контексте знаний, накопленных для модельных видов, например, мышей. Более того, наблюдается сохранение полиморфизмов на уровне гаплотипов у млекопитающих (Guryev et al., 2006). В случае гена TLR9 показано наличие того же SNP (rs352140), в таком же сайте, как у КРС и у человека (Cargill et al., 2007). Для КРС, как одного из самых известных видов сельскохозяйственных животных, накоплены обширные данные, которые в обобщённом виде представлены в табл. 1. Базовые знания полиморфизмах TLR были получены для группы из 9-ти пород, состоящей приблизительно из 40 особей. Исследованные породы, изначально произошедшие от *B. taurus taurus* и *B. taurus indicus*, а именно – ангус, шаролежская, голштинская, лимузинская, брахман, нелор, братфорд, пьемонтская и романьольская, были сравнены с эталонной последовательностью генов для герефордов, созданных в рамках проекта Bovine Genome Project.

Исследование полиморфизмов TLR было начато с определения 32 SNP в TLR4 (Werling et al., 2003; White et al., 2003). Скрининг экзонных областей TLR1, 5 и 10 выявил 98 дополнительных полиморфизмов (Seabury et al., 2007), большая часть из которых обнаружена впервые на момент публикации. Как и ожидалось, однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) преобладали над вставками-делениями (indels) при соотношении 92:6. Исследование TLR у крупного рогатого скота, распознающих вирусные PAMP (TLR3, 7, 8 и 9), выполнялись для той же группы пород крупного рогатого скота и той же выборки особей, что дало в итоге ещё 130 SNP (Cargill, Womack, 2007). Консервативный характер трансмембранного и функционального TIR-доменов в противовирусных рецепторах отмечен тем фактом, что только в трансмембранном домене выявлен лишь один несинонимичный SNP (nsSNP), и ни одного nsSNPs в TIR-домене.

В соответствии с гипотезой о связывании рецепторов с PAMP, аминокислотные замены при эволюции TLR у млекопитающих произошли преимущественно в области между LRR10 и LRR15

(Zhang et al., 2009). Внутригенное распределение известных SNP в TLR4 КРС и его белковом продукте, который взаимодействует с LPS бактерий, показано на рис 2. В областях цитоплазматического и трансмембранного доменов TLR полиморфизмы практически не встречаются, в то время как внешний домен LRR является наиболее вариабельной частью молекулы. Высокая вариабельность отражает разнообразие выбора вариантов, взаимодействующих с развивающимися микробными структурами. Диверсификационный отбор также можно обнаружить по отклонениям от равновесия по Харди–Вайнбергу (Werling et al., 2003; White et al., 2003). В качестве альтернативы, отбор может проявляться в виде более высокого соотношения между выявленными несинонимичными (nsSNP) и синонимичными мутациями (sSNP(cSNP)) ( $\omega$  или отношение  $Ka/Ks$ ). Сглаженное значение  $\omega$ , полученное после усреднения скользящего аминокислотного окна, можно использовать для разграничения различных доменов TLR млекопитающих (Wakchoure et al., 2012).

При расширении скрининга полиморфизмов TLR у КРС (Seabury et al., 2010) генотипировано 220 полиморфизмов во всех 10-ти генах TLR и одном дополнительном рецепторе врождённого иммунитета – в рецепторе распознавания пептидогликана-1 (PGLYRP1) в панели из 37 пород КРС. Оценены функциональные изменения для 54 nsSNP, 31% из которых, вероятно, влияют на функцию белка. В целом, опубликованные данные указывают на высокую вариабельность генов TLR у КРС с частотой полиморфизмов в пределах от 1 SNP/300 оснований для гена TLR1 (Russell et al., 2012) до 1 SNP/32 оснований для TLR3 (Cargill, Womack, 2007), а в среднем примерно с частотой 1 SNP/100 оснований (табл. 1).

Таким образом, гены TLR обладают более высокой вариабельностью, чем обычно наблюдается для кодирующих последовательностей генов КРС. Примечательно, что последующий скрининг выявил значительную долю новых полиморфизмов в генах TLR. Недавнее исследование, направленное на широкомасштабное выявление новых SNP в панели из 31 породы (Fisher et al., 2011), позволило выявлять примерно один новый полиморфизм на каждую породу и локус. Удивительно то, что подвиды *B. taurus taurus* и *B. taurus indicus* имеют общие гаплотипы во всех локусах TLR (Seabury et al., 2010). При этом отслеживание полиморфизмов можно упростить, используя информативные SNP (tagSNP, cSNP), характеризующиеся блоками гаплотипов. Только 12 из 32 SNP, локализованных в BtTLR4, оказались достаточны для выявления различий 20 гаплотипов, обнаруженных в группе пород (White et al., 2003).

Скрининг полиморфизмов TLR проводился и на других видах сельскохозяйственных животных. При исследовании выборки из 25 кабанов, 25 животных современных пород (Bergman et al., 2010, 2012), панели из 96 свиней 11 пород (Shinkai et al., 2006; Xu et al., 2000) достигнут результат в описании новых и обширных гаплотипов TLR свиней. Первая выборка животных позволила обнаружить 20, 27, 26 и 33 SNP в генах TLR1, 2, 6 и 10 соответственно, а в последней популяции выявили 21, 11, 7, 13, 11 и 33 SNP в генах TLR1-6 и TLR10 соответственно. У коз полиморфизм TLR7, был представлен 22 SNP, и был выявлен на выборке из 24 животных, представляющих 12 пород коз из разных регионов Индии (Goyal et al., 2012). Затем было заявлено об обнаружении первого функционального полиморфизма TLR4 у лошадей (Valanne et al., 2011). Последующий скрининг в кодирующих областях антивирусных генов TLR 3, 7 и 8 в популяции численностью 154 лошадей пяти пород выявил еще 13 (в том числе 12 новых) SNP (Astakhova et al., 2009). Изучение полиморфизма TLR у девяти пород кур обнаружило 14 nsSNP в копии TLR1 1-го типа и 13 nsSNP в копии гена 2-го типа (Ruan, Zheng, 2011). Точно так же TLR2 содержал шесть nsSNP в копии гена 1-го типа и 4 nsSNP в копии 2-го типа (Ruan et al., 2012).

Предполагаемый домен взаимодействия с лигандом во внеклеточной области TLR4 у КРС (позиции АК 274–368) характеризуется в 4 раза меньшей степенью консервативности аминокислот, чем в двух соседних доменах. Отсутствие такой консервативности может отражать взаимодействие с сопутствующими рецепторами MD-2 и CD104 или с эндогенными лигандами, такими как hsp60, гиалуроновым лигандом, олигосахаридами и дефензином (Werling, Jungi, 2003; White et al., 2003). Транс-специфическое сравнение показало высокую концентрацию быстро эволюционирующих кодонов в той части экзодомена TLR5, которая взаимодействует с флагеллином (Smith et al., 2012). В другом случае пределы области, взаимодействующей с лигандом, могут быть подтверждены с

помощью ослабления чувствительности к агонистам при мутации, поскольку такая ситуация наблюдается для двух аналогичных мутаций TLR4 человека (Arbour et al., 2000).

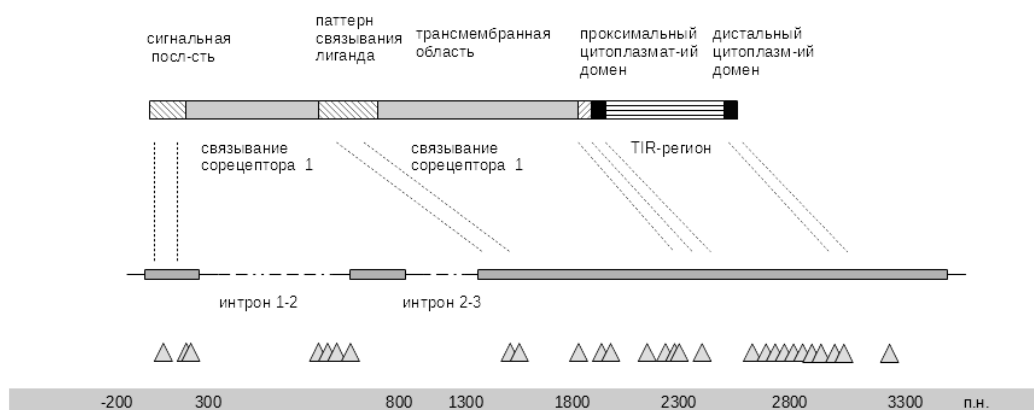


Рис. 2. Распределение выявленных SNP (обозначенных треугольниками) в гене антибактериального толл-подобного рецептора 4 (TLR4) крупного рогатого скота и его белковый продукт. Адаптировано по: (Werling, Jungi, 2003, White et al., 2003; Mariotti et al., 2009; Fisher et al., 2011; Ruiz-Larriaga et al., 2011).

### Значение данных по полиморфизму толл-подобных рецепторов для успешной борьбы с болезнями животных

Эмпирические доказательства различной эффективности геномных вариантов. Ожидаемый фенотипический эффект при естественной вариабельности генов TLR подтверждён во многих исследованиях популяций КРС (табл. 1). Поскольку гетеродимеры TLR1 и TLR1/2 распознают фрагменты микобактерий, то оба эти гена являются кандидатами в список генов устойчивости, контролирующего заболевание паратуберкулезом. Соответственно, несинонимичные мутации в TLR1 и TLR2 снижают влияние *Mycobacterium avium ssp.*, вызывающих паратуберкулез КРС (Mucha et al., 2009). Такие умозаключения подтверждены уровнем цитокинов в дендритных клетках, происходящих из моноцитов после воздействия лизата клеток *Mycobacterium* или их липополисахаридной фракции (Bhide et al., 2009).

С другой стороны, TLR4 участвует в реакции на респираторные заболевания КРС, связанные с инфицированием *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Это подтверждается восприимчивостью к родственной бактерии *Mannheimia (Pasteurella) pneumotropica* у мышей с нулевым мутантом TLR4 (Chapes et al., 2001). Единственная замена аминокислоты в TLR4 оказала благоприятный эффект при устойчивости к болезням вымени и сохранении интенсивности лактации, что было продемонстрировано в канадской популяции голштинского скота (Sharma et al., 2006). Эффект этого полиморфизма подтверждён на китайских популяциях КРС (симментальской, голштинской и саньхэ породах), и он выразился в изменении SCS (Wakchaure et al., 2012). Роль полиморфизма TLR4 в устойчивости к маститу дополнительно подтвердилась при анализе ассоциаций между полиморфизмом и частотой заболевания, а именно – *AluI* в TLR4 с заболеваемостью маститом у коров породы сахи (Vuchodilová-Křenková et al., 2005).

Эффект полиморфизма TLR4 выявлен при инфекционном кера-конъюнктивите у американской ангусской породы КРС (Kataria et al., 2011). Удивительно, но эта ассоциация связана с полиморфизмами в 1-ом интроне, что контрастирует с отсутствием какого-либо влияния полиморфизма в 3-ем экзоне, хотя последний кодирует большую часть белковой молекулы. У TLR4 свиней также обнаружено влияние вариации на устойчивость к инфекционным заболеваниям. Два SNP в кодирующей области (Thr611Ala и Gly962Ala) и комбинация генотипа трёх SNP оказалась связана с поражением легких. Более того, один cSNP и гаплотип контролировали экспрессию цитокинов (Xu et al., 2000). Это наблюдение позволило сделать выводы о том, что эффекты полиморфизмов TLR



опосредуются модуляцией уровня цитокинов таким же образом, как предполагается для TLR1 (Bhide et al., 2009).

**Таблица 1. Полиморфизм толл-подобных рецепторов у крупного рогатого скота и связанные с ним функциональные изменения**

Гены	Количество пород или особей (n)	Выявленная изменчивость	Функциональные изменения	№ Ref.
Антибактериальные TLR				
TLR1	9 пород <sup>1</sup> +стандарт герефорд <sup>2</sup> , n=40	14 SNP (5 nsSNP)	-	[62]
	-	2 nsSNP	Ser150Gly и Val220Met √ иммунный ответ	[6, 50]
	китайская голштинская, n=28 голландо-фризская, n=246	4 SNP (1 nsSNP) 11 SNP (5 новых, 8 экзонных, 6 cSNP, 1 nsSNP)	Ala1762Gly (1596 в трансмембранном регионе), [42] √ SCS Ala1762Gly √ заболеваемость маститом; Thr79Gly в 5'-UTR √ заболеваемость маститом	[61]
TLR2	10 пород (7 Вт, 3 Ви) <sup>3</sup> , n=90 <sup>3</sup>	20 nsSNP	Leu227Phe, His305Pro и His326Gln, His326Gln в сайте связывания лиганда	[30]
	9 пород <sup>4</sup> и кроссов, n=40	43 SNP (29 cSNP, 15 nsSNP)	Phe670Leu √ ответ на MAP цитокинов в дендритных клетках	[6, 50]
	3 породы (голландо-фризская, симментальская, санхэ) Панель 6 пород <sup>5</sup> , n=6	3 SNP во внеклеточной части рецептора 3 nsSNP	G/G в Thr385Gly и √SCS -	[87] -
TLR4	11 пород (6 Вт, 5 Ви), n=40 (27 Вт, 13 Ви)	32 SNP (28 cSNP)	12 SNP влияют на область связывания лиганда, Ile574Thr и Ala347Glu вероятно функционально значимы значимы для SCS, связь между аллелем С E3+2021, резистентность к маститу и устойчивость лактации	[80-81]
	быки голштинской породы, n=40	3 SNP (1 в промоторной области, 2 в 3-м экзоне)	-	[65]
	китайская симментальская, голштинская и санхэ, n=20	31 SNP (16 cSNP)	вариант gC8664 T (Thre> Ile) коррелировал с увеличением SCS	[78]
	6 пород <sup>6</sup> , n=6	2 некодирующих SNP, 1 sSNP	-	[44]
TLR5	панель 9 пород <sup>7</sup> и кроссов, n=40	52 полиморфизма (46 SNP, 6 вставок, 12 cSNP, 6 nsSNP), nsSNP только в Ви	Lys378Glu и Tyr442His повлияли на домен LRR	[62]
TLR6	9 пород <sup>8</sup> и кроссов, n=40	28 SNP (25 cSNP, 10 nsSNP)	Asp214Asn и Phe494Ile влияют на предсказание 2 LRR домены для Вт	[64]
	6 пород <sup>9</sup> , n=6	2 SNP (1 nsSNP)	nsSNP приводит к Asp214Asn	[44]
TLR10	9 пород <sup>10</sup> +стандарт герефорд, n=40	32 SNP (21 cSNP)	12 nsSNP в функциональных областях	[62]

Примечания:

1 ангус, шаролеизская, голштинская, лимузин, брахман, нелор, брэфорд, пьемонтская и романьола

2 по сравнению с эталонной геномной герефорда, Bovine Genome Project

<<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>>

3 Вт, *Bos taurus taurus*; Ви, *Bos taurus indicus*; MAP, *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, SCS, количество соматических клеток

4 ангус, шаролеизская, голштинская, лимузин, брахман, нелор, брэфорд, пьемонтская и романьола

5 мареммане, шаролеизская, джерсейская, голштинская, пиренейская, пьемонтская

6 мареммане, шаролеизская, джерсейская, голштинская, пиренейская, пьемонтская

7 ангус, шаролеизская, голштинская, лимузин, брахман, нелор, брэфорд, пьемонтская и романьола

8 ангус, шаролеизская, голштинская, лимузин, брахман, нелор, брэфорд, пьемонтская и романьола

9 мареммане, шаролеизская, джерсейская, голштинская, пиренейская, пьемонтская

10 ангус, шаролеизская, голштинская, лимузин, брахман, нелор, брэфорд, пьемонтская и романьола

11 ангус, шаролеизская, голштинская, лимузин, брахман, нелор, брэфорд, пьемонтская и романьола

12 ангус, шаролеизская, голштинская, лимузин, брахман, нелор, брэфорд, пьемонтская и романьола



Продолжение таблицы 1

Гены	Количество пород или особей (n)	Выявленная изменчивость	Функциональные изменения	№ Ref.
Противовирусные TLR				
TLR3	9 пород <sup>11</sup> + стандарт герефорд, 40 животных	96 полиморфизмов (88 SNP, 8 вставок, 3 nsSNP в CDS, 78 SNP в интронах и фланкирующих областях)	-	[8]
TLR7	9 пород <sup>12</sup> + стандарт герефорд, 40 животных	14 полиморфизмов (13 SNP, 1 вставка, 4 nsSNP, 2 sSNP, 3 uSNP, 4 в интронах или фланкирующих областях)	-	[8]
TLR8	10 пород	12 SNP (7 nsSNP, 4 sSNP, 1 ncSNP)	-	[8]
	породы речных и болотных буйволов	sSNP A1551G, специфичный для породы чилика	-	[13]
TLR9	10 пород	17 SNP (2 nsSNP, 7 sSNP, 8 в интронах или фланкирующей последовательности 5'-UTR)	-	[8]
все TLR	31 порода, 96 животных	212 известных SNP и 4 вставки, 258 новых SNP	6 SNP, связанные с восприимчивостью к MAP	[16]
все TLR	37 пород Bt, Vi и их гибридов, 101 животных	220 полиморфизмов (54 nsSNP), выявленных в 10 генах TLR	31% nsSNP вероятно окажут функциональное воздействие	[63]

Примечания: 11 – ангус, шароле́зская, голштинская, лимузин, брахман, нелор, брэфорд, пьемонтская и романьола; 12 – ангус, шароле́зская, голштинская, лимузин, брахман, нелор, брэфорд, пьемонтская и романьола

Также можно судить о значимости полиморфизмов TLR по многочисленным исследованиям на людях. В частности, три nsSNPs в TLR1 человека ослабляют ответ на микробные агонисты этого рецептора, включая фракцию мембран *Mycobacterium* (Omueti et al., 2007). Показано, что один nsSNP в TLR2 (Arg753Gln) увеличивает предрасположенность к стафилококковой инфекции, туберкулёзу, ревматической лихорадке и инфекции мочевыводящих путей (Lorenz et al., 2000; Tabel et al., 2007). Точно так же три миссенс-мутации в TLR5 человека блокируют сигналы, индуцируемые флагеллином – классическим бактериальным PAMP (Merx et al., 2006), и один из этих SNP связан с восприимчивостью к легионеллёзу (Hawn et al., 2007, Merx et al., 2006). Хотя TLR5 у КРС также является геном-кандидатом на устойчивость к тяжёлым бактериальным заболеваниям (Hayashi et al., 2001), то необходимые экспериментальные подтверждения этому отсутствуют.

*Совпадение положений в геноме TLR и выявленные ассоциации.* Гены врождённого иммунитета считаются причиной для поиска локусов количественных признаков (QTL), описанных при полногеномном картировании признаков устойчивости, перечисленных в общедоступных базах данных (например, <<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>>). При поиске локализованных совместно QTL, связанных со здоровьем КРС (табл. 1) выявлено перекрытие локуса клинического мастита на хромосоме ВТА6, содержащей кластеры генов TLR10-TLR1-TLR6 (Klungland et al., 2001). Следовательно, хотя бы один из этих генов может быть вовлечён в восприимчивость к маститу. Любопытно, что QTL для губчатой формы энцефалопатии у КРС связаны с одним и тем же кластером генов (Yilmaz et al., 2005). Антивирусные TLR3 и 9 КРС могут быть кандидатами на регистрацию новых QTL здоровья животных на хромосомах ВТА 27 и 22, соответственно (Cargill, Womack, 2007).

Ассоциация TLR4 с локусом чувствительности к *Salmonella enterica* sv. *typhimurium* выявлена у кур (Leveque et al., 2003). Многолетний сбор фенотипических данных о здоровье животных для ассоциативных исследований – это сложный подход, зависящий от различных факторов окружающей производственной среды. Требования по временным и трудовым затратам косвенно способствуют развитию альтернативного «сокращения пути» и созданию новых подходов к оценке вариантов генов врождённого иммунитета.

*Возможности прогнозирования последствий полиморфизма TLR.* Преимущества видны в том, что положение некоторых из обнаруженных полиморфизмов относительно функциональных доменов белковой молекулы облегчает предсказание фенотипического эффекта до момента проведения экспериментального исследования. Статистический анализ аллельных вариантов основывался на исследовании стандартной геномной последовательности для породы герефорд (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine>). Функционально релевантные участки гена могут быть идентифицированы с помощью программного обеспечения, такого как программа для исследования простой модульной архитектуры (SMART), которая была использована для предсказания доменной архитектуры белка в продуктах генов врождённого иммунитета (Letunic et al., 2006; Seabury et al., 2007).

Мутация T2021C в 3-ем экзоне TLR4 у КРС, ведущая к замене Ile674Thr, представляет собой пример предсказуемого функционального изменения. Об эффекте такого изменения можно судить по замене неполярного изолейцина полярным треонином на границе между высоко консервативного трансмембранного участка и TIR (White et al., 2003; Werling, Jungi, 2003; Sharma et al., 2006, Wakchaure et al., 2012). Исходя из изменения полярности, эта замена вряд ли может не повлиять на передачу сигнала (White et al., 2003; Werling, Jungi, 2003). Присвоение гаплотипу этой мутации указывает на её недавнее происхождение. Тем не менее, этот полиморфизм часто наблюдается у европейских популяций КРС (White et al., 2003; Werling, Jungi, 2003). Быстрое распространение такого аллеля предполагает положительный отбор через изменение функции генов. Прогнозируемый эффект этой мутации на восприимчивость к маститу подтверждена для голштинской, симментальской и санхэ пород КРС (Shinkai et al., 2006).

У свиней некоторые из nsSNP в гене TLR10 расположены в шарнире внешней части молекулы, что подразумевает ограничения при формировании макроструктуры рецептора (Bergman et al., 2012). Также может иметь значение расположение мутационных изменений рядом с известными функциональными доменами. Замена Ala347Gln на отрицательно заряженную глутаминовую кислоту на небольшом расстоянии от лиганд-связывающей области TLR4 КРС сигнализирует о вреде аллеля (White et al., 2003; Werling, Jungi, 2003). Точно так же положительно заряженные аминокислоты, встречающиеся в позиции 381 TLR4 КРС отличаются от серина, который присутствует у других видов жвачных. Учитывая близость к области связывания лиганда, это различие предполагает уникальные особенности TLR4 у КРС (White et al., 2003; Werling, Jungi, 2003).

Мутации могут изменять разграничение самих функциональных доменов рецепторов. Таким образом обнаружены два полиморфизма TLR5 у КРС, которые создают новый домен LRR во внеклеточной области (Seabury et al., 2007). Эти вариабельности проявляются лишь для эталонных пород КРС, в отличие от породы турин. Используя взаимоисключающий подход, данные о влиянии мутации на эффективность TLR могут быть получены из сигнатур очищающего или положительного отбора. Такая оценка была успешно применена к SNP TLR2 у млекопитающих (Jann et al., 2008), TLR3 и 8 (Fisher et al., 2011), и TLR10 у КРС (Fisher et al., 2011; Seabury et al., 2010).

*Функциональная проверка in vitro для прогнозирования свойств аллелей.* Проведение эмпирических исследований ассоциаций можно также заменить анализами *in vitro* на чувствительность по анализу крови (Bhide et al., 2009; Russell et al., 2012; Zipfel et al., 2004). Несмотря на то что в этих исследованиях используются препараты фракций убитых штаммов бактериальных и грибковых патогенов, в этих исследованиях обычно используются коммерчески доступные стандартные микробные и вирусные лиганды. Высокая воспроизводимость поддерживается благодаря наличию синтетических лигандов TLR, таких как Pam3csk4 (PAM3) для гетеродимеров TLR1/TLR2 (Jin et al., 2007; Russell et al., 2012). Лейкоцитарный ответ можно контролировать с помощью либо уровня специфических антител, либо ОТ-ПЦР. Оба подхода успешно применены для выявления лейкоцитов PMN, выделенных из образцов крови КРС с различными генотипами TLR1 (Russell et al., 2012; Li et al., 2012). Индикатор первого выбора или быстрого ответа – это маркер транскрипции CXCL8 (Farhat et al., 2008; Russell et al., 2012). Вместе с гибридными микрочипами (Gilbert et al., 2013), уровни TLR- и цитокин-специфической РНК удобно контролировать с помощью коммерческой платформы специально разработанных или стандартных наборов реагентов ПЦР в формате микропланшета,

нацеленных на изучение путей передачи сигнала TLR, таких как RT 2 Profiler PCR Array System (SABiosciences, США).

### **Перспективы изучения TLR в селекции животных**

Как ожидается, исследования полиморфизма TLR у сельскохозяйственных животных, приведут к результатам их прямого применения в селекционной работе, направленной на улучшение состояния здоровья животных. Желаемые аллели могут быть введены реципиенту с помощью доступных методов редактирования генома, а также технологий, позволяющих отслеживать сегрегацию потомства посредством межпородных обратных скрещиваний для создания новых линий. Полученную гомозиготную популяцию по переданному аллелю можно впоследствии оценить на предмет предполагаемых фенотипических различий. В случае внутривидового полиморфизма, метод генотипирования гарантирует включение у носителей предпочтительного аллеля в коммерческие схемы спаривания.

Изучение и потенциальное использование компонентов врождённого иммунитета в селекции в первую очередь ограничивается естественной изменчивостью современных популяций домашних животных. Тем не менее, полиморфизм TLR, вероятно, связан с различиями географических и микробных сред, как продемонстрировано в исследовании полиморфизма TLR2 у КРС и млекопитающих. Эти факторы управляют адаптивным выбором сайтов связывания лиганда с соответствующими патогенами. Следовательно, роль консервативных традиционных пород, как источника генов, трудно переоценить. Будущие исследования должны быть, в первую очередь, сосредоточены на обнаружении генетических вариантов в системе естественного иммунитета у традиционных пород и функциональной значимости этих вариантов. Примером может служить недавняя успешная идентификация гена устойчивости к болезням традиционной породы - овец масаи, у которых был выявлен локус устойчивости к нематодам. Популяция аут-кроссов будет служить для интрогрессии признака устойчивости к паразитам в современной породе овец дорпер посредством селекции с помощью маркеров. Недостаточно используемый в настоящее время источник аллельных вариантов генов, связанных со здоровьем, скрыт в диких популяциях домашних видов или их предков. Тем не менее, аллельное разнообразие диких видов не обязательно выше, чем разнообразие сохранившихся или эволюционировавших в одомашненные виды, как было показано для генов TLR в паре кабан-домашняя свинья.

Случайный мутагенез неприемлем при разведении животных. Тем не менее, в настоящее время предполагается ряд проектов, касающихся изменения функций TLR за счёт целевого мутагенеза у модельных и коммерческих видов (в России). О получении таких мутантов для участников пути передачи сигналов интерлейкина, общих для большинства TLR, сообщали в ходе международной программы исследования мутагенеза у мышей. В частности, линия мышей с условным нокаутом в линии Msd88 проявляла предсказуемую чувствительность к бактериальной инфекции. Применение набора методов трансформации клеток зародышевой линии облегчил перенос желаемых вариантов генов TLR в основные сельскохозяйственные виды. Источником перенесённых последовательностей могут быть как далёкие, архивные, не подлежащие скрещиванию существующие генотипы, так и архивный материал вымерших пород.

Если применяется принцип риска, адекватный получению прибыли от результата, то генетическая передача детерминант врождённого иммунитета между близкими организмами может быть оправдана с точки зрения состояния здоровья и должна приниматься во внимание.

Работа выполнена в рамках исследования MZE0002701404 МСХ ЧР и внебюджетного финансирования ФИЦ животноводства - ВИЖ им. Л.К. Эрнста.

## References

1. Arbour N.C., Lorenz E., Schutte B.C., Zabner J., Kline J.N., Jones M., Frees K., Watt J.L., Schwartz D.A. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genetics*. 2000. 25: 187-191.
2. Arnold K., Bordol, L., Kopp J., Schwede T.. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006. 22: 195-201.
3. Astakhova N.M., Perelygin A.A., Zharkikh A.A., Lear T.L., Coleman S.J., MacLeod J.N., Brinton M.A.,. Characterization of equine and other vertebrate TLR3TLR7, and TLR8 genes. *Immunogenetics*. 2009. 61: 529-539.
4. Bergman I.M., Edman K., Ekdahl K.N., Rosengren K.J., Edfors I. Extensive polymorphism in the porcine Toll-like receptor 10 gene. *Int. J. Immunogen.* 2012. 39: 68-76.
5. Bergman I.M., Rosengren J.K., Edman K., Edfors I. European wild boars and domestic pigs display different polymorphic patterns in the Toll-like receptor (TLR) 1, TLR2, and TLR6 genes. *Immunogenetics*. 2010. 62: 49-58.
6. Bhide M.R., Mucha R., Mikula Jr, I., Kišová L., Škrabana R., Novák M., Mikula Sr. I. Novel mutations in TLR genes cause hyporesponsiveness to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection. *BMC Genetics*. 2009. 10: 1-11.
7. Boyd A.C., Peroval M.Y., Hammond J.A., Prickett M.D., Young J.R., Smith A.L. TLR15 is unique to avian and reptilian lineages and recognizes a yeast-derived agonist. *J. Immunol*. 2012. 189: 4930-4938.
8. Cargill E.J., Womack J.E. Detection of polymorphisms in bovine toll-like receptors 3, 7, 8, and 9. *Genomics*. 2007. 89: 745-755.
9. Chang J.S., Russell G.C., Jann O., Glass E.J., Werling D., Haig D.M. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1–10 in sheep. *Vet. Immunol. Immunopath.* 2009. 127: 94-105.
10. Chapes S.K., Mosier D.A., Wright A.D., Hart M.L. MHCII, Tlr4 and Nramp1 genes control host pulmonary resistance against the opportunistic bacterium Pasteurella pneumotropica. *J. Leuk. Biology*. 2001. 69: 381-386.
11. Chen S.H., Vaught T.D., Monahan J.A., Boone J., Emslie E., Jobst P.M., Lamborn A.E., Schnieke A., Robertson L., Colman A., Dai Y.F., Polejaeva I.A., Ayares D.L. Efficient production of transgenic cloned calves using preimplantation screening. *Biol. Reproductivity*. 2002. 67: 1488-1492.
12. Du X., Poltorak A., Wei Y., Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Network*. 2000. 11: 362-371.
13. Dubey P.K., Goyal S., Aggarwal J., Gahlawat S.K., Kathiravan P., Mishra B.P., Kataria R.S. Development of tetra-primers ARMS-PCR assay for the detection of A1551G polymorphism in TLR8 gene of riverine buffalo. *J. Appl. Anim. Resistance*. 2012. 40: 17-19.
14. Farhat K., Sauter K.S., Brcic M., Frey J., Ulmer A.J., Jungi T.W. The response of HEK293 cells transfected with bovine TLR2 to established pathogen associated molecular patterns and to bacteria causing mastitis in cattle. *Vet. Immunol. Immunopath.* 2008. 125: 326-336.
15. Final report of Joint Committee on Global Rinderpest Eradication. FAO/OIE, Rome/Paris. 2011
16. Fisher C.A., Bhattarai E.K., Osterstock J.B., Dowd S.E., Seabury P.M. et al. Evolution of the bovine TLR gene family and member associations with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection. *PLoS ONE*. 2011. 6: 11.
17. Franzenburg S., Fraune S., Künzel S., Baines J.F., Domazet-Lošo T., Bosch T.C.G., MyD88-deficient Hydra reveal an ancient function of TLR signaling in sensing bacterial colonizers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. 109: 19374-19379.
18. Gautam J.K., Ashish Comeau L.D., Krueger J.K., Smith Jr. M.F.. Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerisation and signaling. *J. Biol. Chemistry*. 2006. 281: 30132-30142.
19. Gay N.J., Gangloff M., O'Neil, L.A.J. What the myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunology*. 2011. 32: P. 104-109.
20. Gay N.J., Keith F.J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991. 351: 355-356.
21. Gilbert F.B., Cunha P., Jensen K., Glass E.J., Foucras G., Robert-Granié C., Rupp, R., Rainard P.. Differential response of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus or Escherichia coli agonists of the innate immune system. *Vet. Research*. 2013. 44: 40.
22. Goldammer T., Zerbe H., Molenaar A., Schuberth H.J., Brunner R.M., Kata S.R., Seyfert H.M. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004. 11: 174-185.
23. Goyal S., Dubey P.K., Tripathy K., Mahajan R., Pan S., Dixit S.P., Kathiravan P., Mishra B.P., Niranjana S.K., Kataria R.S.,. Detection of polymorphism and sequence characterization of Toll-like receptor 7 gene of Indian goat revealing close relationship between ruminant species. *Anim. Biotechnol.* 2012. 23: 194-203.
24. Groeneveld L.F., Lenstra J.A., Eding H., Toro M.A., Scherf B., Pilling D., Negrini R., Finlay E.K., Jianlin H., Groeneveld E., Weigend S. Genetic diversity in farm animals – a review. *Anim. Genetics*. 2010. V.41(1): 6-31.
25. Guryev V., Smits B.M.G., van de Belt J., Verheul M., Hubner N., Cuppen E. Haplotype block structure is conserved across mammals. *PLoS. Genetics*. 2006. 2: 121.

26. Hasan U., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., Guiet C., Briere F., Vlach J., Lebecque S., Trinchieri G., Bates E.E.M. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol.* 2005. 174: 2942-2950.
27. Hawn T.R., Wu H., Grossman J.M., Hahn B.H., Tsao B.P., Aderem A. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolished flag-ellin signaling and is associated with susceptibility to Legionnaire's disease. *J. Exp. Medicine.* 2003. 198: 1563-1572.
28. Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., David R., Goodlett D.R., Eng J.K., Akira S., Underhill D.M., Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001. 410: 1099-1103.
29. Jann O.C., King A., Corrales N.L., Anderson S.I., Jensen K., Ait-ali T., Tang H., Wu C., Cockett N.E., Archibald A.L., Glass E.J. Comparative genomics of Toll-like receptor signalling in five species. *BMC Genomics.* 2009. 10: 216.
30. Jann O.C., Werling D., Chang J.S., Haig D., Glass E.J. Molecular evolution of bovine Toll-like receptor 2 suggests substitutions of functional relevance. *BMC Evol. Biology.* 2008. 8: 288.
31. Jin M.S., Kim S.E., Heo J.Y., Lee M.E., Kim H.M., Paik S.G., Lee, H., Lee, J.O. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell.* 2007. 130: 1071-1082.
32. Joost S., Colli L., Bonin A., Biebach I., Allendorf F.W., Hoffmann I., Hanotte O., Taberlet P., Bruford M.W. Promoting collaboration between livestock and wildlife conservation genetics communities. *Conserv. Genet. Resources.* 2011. 3: 785-788.
33. Jungi T.W., Farhat K., Burgener I.A., Werling D. Toll-like receptors in domestic animals. *Cell Tissue Resources.* 2011. 343: 107-120.
34. Kaisho T., Akira S. Toll-like receptor function and signalling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006. 117: 979-987.
35. Kataria R.S., Tait Jr R.G., Kumar D., Ortega M.A., Rodriguez J., Reecy J.M. Association of toll-like receptor four single nucleotide polymorphisms with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in cattle. *Immunogenetics.* 2011. 63: 115-119.
36. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunology.* 2010. 11: 373-384.
37. Klungland H., Sabry A., Heringstad B., Olsen H.G., Gomez-Raya L., Vage D.I., Olsaker I., Odegard J., Klemetsdal G., Schulman N., Vilkki J., Ruane J., Aasland M., Ronningen K., Lien S. Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. *Mamm. Genome.* 2001. 12: 837-842.
38. Krutzik S.R., Ochoa M.T., Siebling P.A., Uematsu S., Ng Y.W., Legaspi A., Liu P.T., Cole S.T., Godowski P.J., Maeda Y., Sarno E.N., Norgard M.V., Brennan P.J., Akira S., Rea T.H., Modlin R.L. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat. Medicine.* 2003. 9: 525-532.
39. Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffman J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell.* 1996. 86: 973-983.
40. Letunic I., Copley R.R., Pils B., Pinkert S., Schultz J., Bork P. SMART 5: domains in the contexts of genomes and networks. *Nucleic Acids Research.* 2006. 34: D257-D260.
41. Leveque G., Forgetta V., Morroll S., Smith A.L., Bumstead N., Barrow P., Loredó-Ostí J.C., Morgan K., Malo D. Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to Salmonella enterica serovar typhimurium infection in chickens. *Infect. Immunology.* 2003.71: 1116-1124.
42. Li C.M., Shi W.H., Chu M.X., An Y.F., Chen H.Q., Di R., Fang L. Polymorphisms of TLR1 gene and their relationship with somatic cell score in Holstein cows. *Sci. Agric. Singapore.* 2009: 2118-2125.
43. Lorenz E., Mira J.P., Cornish K.L., Arbour N.C., Schwartz D.A. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect. Immunology.* 2000. 68: 6398-6401.
44. Mariotti M., Williams J.L., Dunner S., Valentini A., Pariset L. Polymorphisms within the Toll-like receptor (TLR)-2, -4, and -6 genes in cattle. *Diversity.* 2009. 1: 7-18.
45. McGuire K., Jones M., Werling D., Williams J.L., Glass E.J., Jann O. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Anim. Genetics.* 2005. 37: 47-50.
46. Menzies M., Ingham A. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet. Immunol. Immunopath.* 2006. 109: 23-30.
47. Merx S., Zimmer W., Neumaier M., Nejad P.A. Characterization and functional investigation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human TLR5 gene. *Hum. Mutations.* 2006. 27: 293.
48. Mikula Jr., J., Pastoreková S., Mikula Sr. I. Toll-like receptors in immune response to the viral infections. *Acta Virology.* 2010. 54: 231-245.
49. Mroske C., Muci J., Wang J., Li K., Song W., Yan J., Feng J., Liu Q., Sommer S.S., Toward a fluorescent SSCP technique that detects all mutations: F-DOVAM-S. *Anal. Biochem.* 2007. 368: 250-257.

50. Mucha R., Bhide M.R., Charkurkar E.B., Novak M., Mikula Sr. I. Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle. *Vet. Immunol. Immunopath.* 2009. 128: 381-388.
51. Nomura N., Miyajima N., Sazuka T., Tanaka A., Kawarabayasi Y., Sato S., Nagase T., Seki N., Ishikawa K.I., Tabata S., Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001–KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Research.* 1994. 1: 27-35.
52. Omueti K.O., Mazur D.J., Thompson K.S., Lyle E.A., Tapping R.I. The polymorphism P315L of human Toll-like receptor 1 impairs innate immune sensing of microbial cell wall components. *J. Immunology.* 2007. 178: 6387-6394.
53. Opsal M.A., Vage D.I., Hays B., Berget I., Lien S. Genomic organization and transcript profiling of the bovine toll-like receptor gene cluster TLR6-TLR1-TLR10. *Gene.* 2006. 384: 45-50.
54. Phillips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R., Waddell J., Antibiotic use in animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004. 53: 885.
55. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998. 282: 2085-2088.
56. Qureshi S.T., Lariviere L., Leveque G., Clermont S., Moore K.J., Gros P., Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Medicine.* 1999. 189: 615-625.
57. Rebl A., Goldammer T., Seyfert H.M. Toll-like receptor signaling in bony fish. *Vet. Immunol. Immunopathology.* 2010. 134: 139-150.
58. Ruan W.K., Wu Y.H., An J., Cui D.F., Li H.R., Zheng S.J. Toll-like receptor 2 type 1 and type 2 polymorphisms in different chicken breeds. *Poult. Sciences.* 2012. 91: 101-106.
59. Ruan W.K., Zheng S.J. Polymorphisms of chicken toll-like receptor 1 type 1 and type 2 in different breeds. *Poult. Sciences.* 2011. 90: 1941-1947.
60. Ruiz-Larrañaga O., Manzano C., Iriondo M., Garrido J.M., Molina E., Vazquez P., Juste R.A., Estonba A. Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle. *J. Dairy Sci.* 2011. 94: 3635-3641.
61. Russell C.D., Widdison S., Leigh J.A., Coffey T.J. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine Toll-like receptor 1 gene and association with health traits in cattle. *Vet. Research.* 2012. 43: 17.
62. Seabury C.M., Cargill E.J., Womack J.E. Sequence variability and protein domain architectures for bovine Toll-like receptors 1, 5, and 10. *Genomics.* 2007. 90: 502-515.
63. Seabury C.M., Seabury P.M., Decker J.E., Schnabel R.D., Taylor J.F., Womack J.E. Diversity and evolution of 11 innate immune genes in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. 107: 151-156.
64. Seabury C.M., Womack J.E. Analysis of sequence variability and protein domain architectures for bovine peptidoglycan recognition protein 1 and Toll-like receptors 2 and 6. *Genomics.* 2008. 92: 235-245.
65. Sharma B.S., Leyva I., Schenkel F., Karrow N.A. Association of Toll-Like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 2006. 89: 3626-3635.
66. Shi X.Z., Zhong X., Yu X.Q. Drosophila melanogaster NPC2 proteins bind bacterial cell wall components and may function in immune signal pathways. *Insect Biochem. Mol. Biology.* 2012. 42: 545-556.
67. Shinkai H., Tanaka M., Morozumi T., Eguchi-Ogawa T., Okumura N., Muneta Y., Awata T., Uenishi H. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. *Immunogenetics.* 2006. 58: 324-330.
68. Silva M.V.B., Sonstegard T.S., Hanotte O., Mugambi J.M., Garcia J.F., Nagda S., Gibson J.P., Iraqi F.A., McClintock A.E., Kemp S.J., Boettcher P.J., Malek M., Van Tassell C.P., Baker R.L. Identification of quantitative trait loci affecting resistance to gastrointestinal parasites in a double backcross population of Red Maasai and Dorper sheep. *Anim. Genetics.* 2012. 43: 63-71.
69. Skarnes W.C., Rosen B., West A.P., Koutsourakis M., Bushell W. et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature.* 2011. 474: 337-342.
70. Smith S.A., Jann O.C., Haig D., Russell G.C., Werling D., Glass E.J., Emes R.D. Adaptive evolution of Toll-like receptor 5 in domesticated mammals. *BMC Evol. Biology.* 2012. 12: 1.
71. Stein D., Roth S., Vogelsang E., Nüsslein-Volhard C. The polarity of the dorsoventral axis in the Drosophila embryo is defined by an extracellular signal. *Cell.* 1991. 65: 725-735.
72. Tabel Y., Berdeli A., Mir S. Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children. *Int. J. Immunogenetics.* 2007. 34: 399-405.

73. Tallant T., Deb A., Kar N., Lupica J., de Veer M.J., DiDonato J.A. Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiology*. 2004. 4: 33.
74. Tirumurugaan K.G., Dhanasekaran S., Raj G.D., Raja A., Kumanan K., Ramaswamy V. Differential expression of toll-like receptor mRNA in selected tissues of goat, *Capra hircus*. *Vet. Immunol. Immunopath.* 2010. 133: 296-301.
75. Valanne S., Wang J.H., Rämetsä M., The Drosophila Toll signaling pathway. *J. Immunology*. 2011. 186: 649-656.
76. Vychodilová-Křenková L., Matiašovič J., Hořín P. Single nucleotide polymorphisms in four functionally related immune response genes in the horse: CD14, TLR4, C, and Fc R1 alpha. *Int. J. Immunogenetics*. 2005. 32: 277-283.
77. Wakchaure R.S., Gupta I.D., Verma A., Kumar D., Sonawane G.S. Association of genetic variants of partial exon 3 region of TLR4 gene with mastitis in Sahiwal cattle. *Indian J. Anim. Research*. 2012. 46: 2.
78. Wang X.P., Xu S.Z., Gao X., Li J.Y., Ren H.Y., Luoren Z.M. Cloning and SNP screening of the TLR4 gene and the association between its polymorphism and somatic cell score in dairy cattle. *S. Afr. J. Anim. Sciences*. 2008. 38: 101-109.
79. Werling D., Jungi T.W. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathology*. 2003. 91: 1-12.
80. White S.N., Kata S.R., Womack J.E. Comparative fine maps of bovine toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 regions. *Mamm. Genome*. 2003. 14: 149-155.
81. White S.N., Taylor K.H., Abbey C.A. Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003. 100: 10364-10369.
82. Wiens M., Korzhhev M., Perović-Ottstadt S., Luthringer B., Brandt D., Klein S., Müller W.E. Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (Demospongiae: Porifera). *Mol. Biol. Evolution*. 2007. 24: 792-804.
83. Xu Y.W., Tao X., Shen B., Horng T., Medzhitov R., Manley J.L., Tong L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*. 2000. 408: 111-115.
84. Yang X.Q., Murani E., Ponsuksili S., Wimmers K. Association of TLR4 polymorphism with cytokine expression level and pulmonary lesion score in pigs. *Mol. Biol. Reproduction*. 2012. 39: 7003-7009.
85. Yilmaz A., Shen S., Adelson D.L., Xavier S., Zhu J.J. Identification and sequence analysis of chicken Toll-like receptors. *Immunogenetics*. 2005. 56: 743-753.
86. Zhang C., de Koning D.-J., Hernandez-Sanchez J., Haley C.S., Williams J.L., Wiener P. Mapping of multiple quantitative trait loci affecting bovine spongiform encephalopathy. *Genetics*. 2004. 167: 1863-1872.
87. Zhang L.P., Gan Q.F., Ma T.H., Li H.D., Wang X.P., Li J.Y., Gao X., Chen J.B., Ren H.Y., Xu S.Z. Toll-like receptor 2 gene polymorphism and its relationship with SCS in dairy cattle. *Anim. Biotechnology*. 2009. 20: 87-95.
88. Zhou H., Gu J., Lamont S.J., Gu X. Evolutionary analysis for functional divergence of the toll-like receptor gene family and altered functional constraints. *J. Mol. Evolution*. 2007. 65: 119-123.
89. Zhou K.F., Kanai R., Lee P., Wang H.W., Modis Y. Toll-like receptor 5 forms asymmetric dimers in the absence of flagellin. *J. Struct. Biology*. 2012. 177: 402-409.
90. Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D.G., Felix G., Boller T. Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*. 2004. 428: 764-767.



DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.2.22-37

### Genetic differentiation and functional divergence of Toll-like receptors

<sup>1</sup>Novak K., <sup>2</sup>Kalashnikov A.E., <sup>2</sup>Kalashnikova L.A., <sup>3</sup>Yaluge V.L.,  
<sup>3</sup>Selkova I.V., <sup>2</sup>Zakharov V.M.

<sup>1</sup>*Institute of Animal Sciences, Prague, Czech Republic;* <sup>2</sup>*Institute of Animal Breeding, Moscow;* <sup>3</sup>*Lavrov State Research Centre of Complex Investigation of Arctic Region, Arkhangelsk, Russian Federation*

**ABSTRACT.** The exploitation of the genetic factors affecting the health status of farm animals represents an alternative approach to controlling the diseases caused by microbial pathogens. The determination of innate immunity based on the genotype of the germplasm cells is a constraint for specificity but becomes an advantage in breeding schemes. The structural deviations among Toll-like receptors (TLRs), as the most frequently studied innate immunity components, have been documented at all levels, i.e., interspecific, inter- and intravarietal, in the main farm species. The current computational methods facilitate the prediction of the functional consequences of the observed mutations. Subsequently, these predictions can be verified through immunological responsiveness and population-wide association studies. The frequency and haplotype grouping of individual polymorphisms are used to track the origin and selection coefficient as independent indicators of functional changes. The Toll-like receptor variants associated with mastitis and mycobacterial infection have been identified in cattle, consequently, the targeting of these proteins in breeding could contribute to disease control. The range of infections affected by TLR polymorphisms suggests that the improvement of innate resistance is feasible in more species. Thus, the traditional breeds and wild populations should be regarded as the resources of genetic variability accessible for these purposes.

*Keywords: cattle, innate immunity, Toll-like receptors, DNA polymorphisms, immune status*

**Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology**, 2021, 2: 22-37

Поступило в редакцию: 11.03.2021

Получено после доработки: 16.06.2021

**Новак Карел.**, к.б.н., с.н.с., тел. 8(42026)700 -96-50; vuzv@vuzv.cz;

**Калашников Александр Евгеньевич**, к.б.н., с.н.с.; aekalashnikov@yandex.ru;

**Калашникова Любовь Александровна**, д.б.н., проф;

**Захаров Василий Михайлович**, д.б.н., проф., зав. лаб.; тел. 8 (495) 515-95-57;

**Ялуга Владимир Леонтьевич**, к.в.н., с.н.с.;

**Селькова Ия Витальевна**, зав. лаб., тел. 7(818)221-15-97; pvp.29@mail.ru