

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Diverzita vybraných složek Toll signální dráhy v systému  
přirozené imunity u českého strakatého skotu**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Ladislav Tichý**

**Obor studia: Biotechnologie a šlechtění zvířat**

**Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl**

**Konzultant práce: prom. biol. Karel Novák, CSc.**

© 2018/2019 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Diverzita vybraných složek Toll signální dráhy v systému přirozené imunity u českého strakatého skotu" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4.2019

\_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi, Karlu Novákovi, prom. biol., CSc. za odporné vedení a pomoc při psaní diplomové práce, která mi přinesla mnoho důležitých zkušeností a znalostí.

# Diverzita vybraných složek Toll signální dráhy v systému přirozené imunity u českého strakatého skotu

## Souhrn

Diverzita ve vybraných genech systému přirozené imunity u českého strakatého skotu (ČESTR) byla dokumentována pomocí resekvenování populačního vzorku DNA. Vzorek zahrnoval DNA ze souboru 164 býků, kteří reprezentují genofond plemene. Byly vybrány geny *IRAK1* a *IRAK4* jako klíčové geny signální dráhy od Toll-like receptorů a pro porovnání gen *MAL*, který se podílí na vývoji T buněk v systému adaptivní imunity. Směs ampliconů o délce 1500 bp pokrývajících celé geny či jen exonovou oblast v případě *MAL* byla resekvenována technologií PacBio. Porovnáním s referenční sekvencí skotu UMD\_3.1.1, statistickým vyhodnocením a případně i shodou s veřejnou databází polymorfismů bylo určeno 17 (z toho 12 nových), 15 (z toho 3 delece, 7 nových) a 2 polymorfismy pro *IRAK1*, *IRAK4* a *MAL* v populaci ČESTR. Pro sledování u jednotlivých zvířat bylo navrženo 18 genotypovacích reakcí typu extenze primeru ve třech sadách – multiplexech pro souběžné provedení. U sledovaných býků byly určeny genotypy pro polymorfismy 5431G>A a 5452G>A v *IRAK1* a 23687del-4 v *IRAK4* jako předpoklad pro plánovanou asociační studii. Bioinformatické hodnocení funkčních dopadů polymorfismů v populaci ČESTR identifikovalo pouze jednu nesynonymní mutaci 5131A>G u *IRAK1* (40,132,145 na chromozomu X) vedoucí k záměně Val252Ala s předpokládaným přímým účinkem na funkci proteinového produktu. Pro případné efektivní využití těchto genů v rezistenčním šlechtění by musela být diverzita v populaci ČESTR zvýšena introgresí z celkového genofondu tura domácího.

**Klíčová slova:** skot, přirozená imunita, Toll-like receptory, diverzita, sekvenování

# Diversity of the selected components of Toll signalling pathway in the innate immunity system of Czech Red Pied cattle

## Summary

Diversity in the selected genes of the innate immunity system of the Czech Red Pied cattle (CRP) was documented with resequencing of a population DNA sample. The population sample comprised DNA from a set of 164 bulls that represent the gene pool of the breed. Genes *IRAK1* and *IRAK4* were chosen as the key genes for the signalling pathway of Toll-like receptors. For comparison, gene *MAL* was included into the study. *MAL* participates in the development of T-cells of the adaptive immunity system. The mixture of amplicons with average length 1500 bp and covering the whole genes or only exon regions in the case of *MAL* was resequenced with PacBio technology. Comparison of reads with the bovine reference sequence UMD\_3.1.1, statistical evaluation and potential match with public polymorphism database determined 17 (including 12 novel), 15 (3 deletions, 7 novel) and 2 polymorphisms for *IRAK1*, *IRAK4* and *MAL*, respectively. For genotyping of individual animals, 18 reactions of primer extension type in three multiplexes for a simultaneous set up were designed. In the studied set of bulls, the genotypes for the polymorphisms 5431G>A and 5452G>A in *IRAK1* and 23687del-4 in *IRAK4* were determined as a part of the planned association study. Bioinformatic evaluation of the functional impacts of the polymorphisms found in the CRP population identified only one non-synonymous mutation 5131A>G in *IRAK1* (40,132,145 in chromosome X) that leads to a substitution Val252Ala with an assumed direct effect on the protein product function. The potential effective exploitation of the studied genes in the breeding for infection resistance would require increase in the diversity of the CRP population by introgression from the global gene pool of cattle.

**Keywords:** Cattle, innate immunity, Toll-like receptor, diversity, sequencing

## Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce a vědecké hypotézy	2
3. Literární rešerše	3
3.1 Český strakatý skot	3
3.1.1 Plemenitba českého strakatého skotu	3
3.2 Imunitní systém	5
3.2.1 Specifičnost získané imunity	5
3.2.2 Vrozená imunita	6
3.2.2.1 PRRs	6
3.3 Toll-like receptory	7
3.3.1 Toll-like receptory u skotu	9
3.4 Signální dráhy Toll-like receptorů	10
3.5 Negativní regulace Toll signálních drah	12
3.6 IRAK1	13
3.7 IRAK4	15
3.8 MAL	17
4 Materiál a metody	19
4.1 Sada vzorků DNA z populace ČESTR	19
4.2 Upřesnění kódujících oblastí vybraných genů a jejich amplifikace pomocí PCR	19
4.2.1 Upřesnění kódujících oblastí a výběr amplifikačních primerů	19
4.2.2 Amplifikace fragmentů genů pomocí PCR	20
4.2.3 Kontrola fragmentů pomocí elektroforézy	23
4.2.4 Příprava vzorků pro NGS	25
4.3 Využití vysokokapacitní metody pro screening polymorfismů ve vybraných genech	25
4.4 Identifikace variant a porovnání s databázovými údaji o variabilitě skotu	26
4.5 Návrh sady genotypovacích reakcí pro nalezené varianty a jejich ověření	26
4.5.1 Navržení extenzních primerů	27
4.5.2 Amplifikace fragmentů obsahující polymorfismy	27
4.5.3 Čištění amplifikačních fragmentů	28
4.5.4 Provedení genotypovacích reakcí	28

4.6 Určení genotypů ve vybraných genech přirozené imunity u modelové skupiny zvířat	29
4.7 Předpověď funkčních změn v důsledku nalezených mutací.	29
5 výsledky	30
5.1 Upřesnění kódujících oblastí a výběr amplifikačních primerů	30
5.1.1 Upřesnění kódujících oblastí a výběr amplifikačních primerů pro IRAK1	30
5.1.2 Upřesnění kódujících oblastí a výběr amplifikačních primerů pro gen IRAK4	31
5.1.3 Upřesnění kódujících oblastí a výběr amplifikačních primerů pro MAL	32
5.2 Amplifikace fragmentů genů pomocí PCR a kontrola pomocí elektroforézy	33
5.2.1 Amplifikace genu IRAK1	33
5.2.2 Amplifikace genů IRAK1, IRAK4 a MAL	35
5.3 Výsledky NGS a identifikace genových variant	38
5.3.1 Identifikace variant a porovnání s databázovými údaji u genu IRAK1	39
5.3.2 Identifikace variant a porovnání s databázovými údaji genu IRAK4	41
5.3.3 Identifikace variant a porovnání s databázovými údaji genu MAL	43
5.4 Návrh sady genotypovacích reakcí pro nalezené varianty a jejich ověření	44
5.5 Určení genotypů ve vybraných genech přirozené imunity u modelové skupiny zvířat	48
5.6 Předpověď funkčních změn v důsledku nalezených mutací.	52
6. Diskuze	56
6.1 Rekapitulace	56
6.2 Amplifikace fragmentů genů	56
6.3 Významné výsledky	57
6.4 Využitelnost pro šlechtění	58
6.5 Publikované výsledky u skotu	59
6.6 Publikované výsledky u jiných druhů	60
7. Závěr	62
8. Seznam použité literatury	63
9. Samostatné přílohy	70

## 1. Úvod

Ve šlechtění skotu je kladen větší důraz na znaky funkční než zdravotní, především ve vazbě na mléčnou užitkovost. S nárůstem mléčné užitkovosti však dochází k zhoršení reprodukčních vlastností, zhoršení zdravotního stavu a snížení délky produkčního života. Za cenu vyšší produkce je tedy snižována odolnost zvířat. V případě dřívějších ztrát zvířat z důvodu nevýhodné genetické výbavy přichází vysoké funkční znaky vniveč. Pokud by existovaly genové varianty, které by prokazatelně zvýhodňovaly jejich nositele, mělo by jistě smysl tyto varianty zařadit do šlechtitelských programů.

Imunitní systém savců je složen z vrozené a antigen specifické složky. Antigen specifické mechanismy (lymfocyty B a T) jsou oproti vrozené imunitě, založené převážně na fagocytech, mnohem přesnější, ale daleko pomalejší, přičemž jejich rozvoj trvá několik dní. Mechanismy vrozené imunity jsou proto první linií obrany proti patogenům. Na povrchu leukocytů se nachází 10 členů rodiny Toll-like receptorů, které fungují jako čidla rozeznávající makromolekuly charakteristické pro potenciální patogeny. Jakmile se cizorodá molekula váže na receptor, dostává bílá krvinka signál a začne vylučovat látky (např. cytokininy), které do místa signálu přivolávají další buňky a vyvolávají zánět.

Pro diplomovou práci byly vybrány dva geny, nacházející se v signální dráze Toll-like receptorů. Jedná se o geny IRAK1 a IRAK4. Tyto geny, jak již bylo zmíněno v literární rešerši, hrají klíčovou roli v signalizaci a funkci. Lze tedy předpokládat, že se v těchto genech populace českého strakatého skotu bude vyskytovat polymorfismus, který by mohl mít vliv na zdravotní stav jedinců. Na druhou stranu se jedná o evolučně starou dráhu a příslušné geny mohou být konzervované s malou diverzitou. Jako třetí gen byl vybrán gen MAL jako zástupce genů ze systému adaptivní imunity. Důvodem byla jak jeho známá úloha v infekční rezistenci, tak i možná jiná úroveň diverzity než u genů konzervované Toll dráhy.

Bezprostředním cílem diplomové práce bylo určit diverzitu v těchto genech, charakterizovat nalezené varianty, navrhnout genotypovací reakce pro jednotlivé polymorfismy a zjistit jejich zastoupení u jednotlivých zvířat ze sledovaného souboru.



## **2. Cíl práce a vědecké hypotézy**

Přirozená (vrozená) imunita využívá receptory, které se podílejí na rozpoznávání struktur patogenních mikroorganismů, a navazující signální dráhy. Příslušné geny tvoří varianty v průběhu vývoje jedince, takže pro adaptaci na změny prostředí je nezbytná jejich dostatečná variabilita v populaci. Proto bude proveden screening polymorfismů ve vybraných genech Toll signální dráhy ve zvolené populaci skotu. Následně budou potvrzeny předpokládané alelické varianty pomocí genotypovacích metod. Třetí oblastí diplomové práce bude aplikace bioinformatických metod pro funkční charakterizaci nalezených variant receptorů přirozené imunity. Cílem vývoje laboratorních postupů pro hledání a funkční hodnocení genových variant je doplnění informací z populačních studií. Kromě návaznosti na šlechtitelské projekty zaměřené na zdravotní znaky poskytuje variabilita receptorů přirozené imunity náhled do jejich funkce a mechanismu patogeneze.

### **Vědecké hypotézy:**

1. Geny, které kódují články Toll signálního řetězce přirozené imunity, jsou významně polymorfní v populaci českého strakatého skotu.
2. Část tohoto polymorfismu má potenciál pro využití ve šlechtění na zdravotní znaky.

### **3. Literární rešerše**

#### **3.1 Český strakatý skot**

Český strakatý skot, zkráceně ČESTR, náleží do skupiny plemen horského strakatého skotu. Jedná se o původní plemeno skotu na území České republiky. Z kraniologického hlediska spadá do skupiny skotu čelnatého. Hlavním požadavkem pro český strakatý skot je kombinované produkční zaměření se zvýrazněnými znaky pro dobré osvalení, střední až větší tělesný rámec, vyšší znaky mléčnosti a harmonický zevnějšek. Vysoká produkce kvalitního mléka a masa jsou hlavní chovné cíle plemene, přičemž cílový požadavek by se měl, pro mléčnou užitkovost, pohybovat kolem 6000 až 7500 kg mléka. Obsah bílkovin by měl být nad 3,5 %. Průměrný denní přírůstek v intenzivním výkrmu by měl dosahovat více než 1300 g s jatečnou výtěžností nad 58 % (CESTR 2008; Skládanka et al. 2014).

Český strakatý skot je, hlavně díky vynikajícím vlastnostem, mezi které patří dobrý zdravotní stav (zejména mléčné žlázy), pravidelná plodnost, snadné porody, vitalita telat, bezproblémový odchov, oceňován jak chovateli, tak i zpracovatelským průmyslem. Mléko se vyznačuje žádoucím obsahem mléčných složek v nejvyšších třídách jakosti a vysokou jatečnou výtěžností chuťově výrazného masa (CESTR 2008).

Český strakatý skot je pro svoje dobré vlastnosti a široké využití součástí celosvětové populace strakatých plemen. Tvoří přibližně jednu polovinu současného stavu skotu v České republice. Pro rok 2015 bylo registrováno deset chovů uznaných jako genová rezerva (ČESTR 2018).

##### **3.1.1 Plemenitba českého strakatého skotu**

Hřeben (2015) uvádí, že moderní český strakatý skot vznikl ve 30. letech. V této době byla snaha sloučit všechny rázy strakatého skotu v Čechách a na Moravě. Po 2. světové válce došlo k přechodu od trojstranné užitkovosti (mléko-maso-tah) k užitkovosti dvojstranné (mléko-maso). Plemenitba v České republice byla zajišťována, až na výjimky (ojedinělého importu strakatého skotu z Německa), výhradně uvnitř plemene. Docházelo tak k formování samostatného plemene ČESTR. Původem se tedy jedná o plemeno izolované od ostatních evropských strakatých plemen. Odlišný chovný

cíl a směr šlechtění přizpůsobený naším podmínkám se projevil na výlučnosti tohoto plemene, ale také na mnoha morfologických znacích, jako je nižší stupeň osvalení, střední rámec, celková ušlechtilost a příznivější utváření vemene. Za účelem zlepšení hlavně mléčné užitkovosti byly využívány různé formy křížení. Nejvhodnějším plemenem pro tento účel bylo zvoleno plemeno ayrshire, v roce 1949 byla uskutečněna první inseminace býkem Elsted Buffon H4078 v Rokytnici. Následně se do křížení zapojily i další zemědělské podniky.

V letech 1959 bylo do České republiky dovezeno 10 čistokrevných býků, přičemž si kříženci plemena ayrshire s červenostrakatým skotem získali u chovatelů oblibu. Současný název „české strakaté plemeno“ se začalo používat v roce 1967, krom čistokrevné plemenitby se začalo využívat také zušlechťovací křížení za účelem zvýšení mléčné užitkovosti a zlepšení vlastností vemene.

V 60. letech se pro plemenitbu nadále využívalo ayshirské plemeno, které převážně zlepšovalo produkci mléka, utváření končetin, funkční a tvarové vlastnosti vemene a pastevní schopnosti. V tomto období se také začala běžně používat inseminace a praktikovat prakticky na všech kravách i jalovicích. Od 80. let se také začala běžně využívat synchronizace říje.

Křížení plemen vždy nemělo pozitivní výsledky, proto se postupně od křížení s plemenem ayrshire upustilo (Urban 1997; Skládanka et al. 2014).

V roce 1990 byl založen svaz chovatelů, který realizuje šlechtitelský program a vedení plemenné knihy. Od poloviny 90. let jsou v ČR do plemenitby upřednostňováni čistokrevní býci, nebo býci s vysokým podílem českého strakatého skotu.

Komplexní selekční indexy využívá většina populací kombinovaného skotu. Tím je umožněna efektivní selekce zvířat v souvislosti s měnícími se ekonomickými podmínkami. Větší důraz je kladen na znaky funkční na úkor znaků související se zdravotním stavem (Skládanka et al. 2014).

## **3.2 Imunitní systém**

Cílem diplomové práce je dokumentovat využitelnou variabilitu v imunitním systému českého strakatého skotu. Imunitní systém je organizace buněk a molekul se specializovanou rolí při obraně před infekcí. Imunitní systém se vyvinul pod obrovským selekčním tlakem, který byl způsobený patogeny. V důsledku toho si mnohobuněčné organismy vyvinuly schopnost rozpoznat a eliminovat mikroby, které organismus napadají. Problémem je obrovská variabilita patogenů, která je způsobena vysokou frekvencí mutací DNA u mikroorganismů (Medzhitov & Janeway 1997; Litman et al. 2005).

Existují dva zásadně odlišné typy reakcí na napadení cizorodými organismy. Vrozená imunita reaguje při každém kontaktu s antigenem stejnou odpovědí a mechanismy. Přenáší se v genetické informaci z generace na generaci. Zůstává tedy neměnná a je pevně určena genetickou informací, kterou zdědil jedinec po předcích, zatímco získaná (specifická) imunita se zlepšuje při opakované expozici dané infekci. Vrozená imunita využívá fagocyty (neutrofilů, monocytů a makrofágů), buňky, které uvolňují mediátory zánětu (bazofily, žírné buňky a eozinofily) a NK (natural killers) (Delves & Roitt 2000; Schroder & Tschopp 2010).

Vrozená imunita reaguje na antigeny okamžitě, ale s menší přesností než imunita získaná. Ta je vývojově novější než imunita vrozená a vyskytuje se pouze u obratlovců. Získaná imunita je tvořena buněčnou a humorální složkou. Reakce získané imunity je pomalá a její rozvoj může trvat několik dnů. Hlavními složkami této imunity jsou, buněčné faktory, tj. T-lymfocyty a B-lymfocyty. Humorální složku tvoří protilátky a cytokiny.

### **3.2.1 Specifičnost získané imunity**

Získaná imunita je charakterizována specificitou a vyvíjí se pomocí klonální selekce, tj. výběru z obrovského repertoáru lymfocytů nesoucích antigen-specifické receptory. Ty jsou získávány mechanismem V(D)J rekombinace, kterým je náhodné spojování segmentů genů kódující specifické proteiny s úzkým vztahem pro imunitní reakce (Akira et al. 2006). Buňky, které zprostředkovávají získanou imunitu vznikají

z lymfoidních progenitorů v kostní dřeni. Molekuly rozpoznávané receptory na lymfocytech jsou obecně označovány jako antigeny (Pancer & Cooper 2006). Organismus může potenciálně reagovat na téměř jakýkoliv antigen, který je vázán na receptor. Mohou to být malé jednoduché chemické struktury, ale i vysoce komplexní molekuly. Receptor a protilátka je vložena v membráně B-lymfocytů (Novotny et al. 1983; Garcia et al. 1999). Po aktivaci se množí a mění na paměťové B-lymfocyty, velká část poté dozrává v plazmatické buňky. Tyto buňky začínají produkovat protilátky a přesouvají se do kostní dřeni (Parker 1993; Grewal & Flavell 1998).

### **3.2.2 Vrozená imunita**

Na rozdíl od získané imunity, vrozený imunitní systém se skládá z těchto imunitních reakcí, které postrádají imunologickou paměť. Tím pádem charakteristika vrozených reakcí zůstává v průběhu vývoje jednotlivce nezměněná. Tento systém vznikl a vyvíjel se dříve než systém získané imunity. Nicméně vady v těchto evolučně primitivních vrozených mechanismech, jako jsou například ty, které se vyskytují u chronických granulomatózních onemocnění, mohou být pro organismus fatální (Fraser et al. 1998).

Vrozená imunitní odpověď není úplně nespecifická, jak se původně předpokládalo, ale spíše schopna rozlišovat mezi vlastními antigeny organismu a širokou škálou patogenů. Vrozený imunitní systém rozpoznává mikroorganismy pomocí omezeného počtu vzorů rozpoznávajících receptorů (pattern recognition receptors, PRRs). Jedná se o receptory kódované v zárodečné linii, které mohou rozpoznávat patogeny na základě konzervovaných molekul typických pro daný patogen. Tyto receptory se nacházejí v buňkách přirozeného imunitního systému (makrofágy, dendritické buňky, monocyty, neutrofilové, epitelální buňky). Jedná se o protiklad systému získané imunity, který využívá velkého množství přeskupených receptorů (Akira et al. 2006; Schroder & Tschopp 2010).

#### **3.2.2.1 PRRs**

PRRs rozpoznávají mikrobiální složky známé jako patogeny asociované molekulární vzory (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), které jsou nezbytné

pro přežití mikroorganismu a organismy je mohou jen obtížně měnit. PRRs jsou neustále exprimovány v hostiteli a detekují patogeny nezávisle na životním cyklu. Jsou kódovány v zárodečné linii a nezávisle na imunologické paměti exprimované ve všech buňkách daného typu. Různé PRRs reagují se specifickými PAMPs, vykazují odlišné expresní vzory, aktivují specifické signální dráhy a vedou ke zřetelným antipatogenním odpovědím (Akira et al. 2006; Schaut et al. 2016).

### 3.3 Toll-like receptory

Toll, zakládající člen rodiny TLR, byl původně označen jako genový produkt nezbytný pro vývoj embryonální dorzoventrální polarity v octomilce. Později bylo také prokázáno, že hraje rozhodující roli v antifungální odpovědi much. Dnes je identifikováno 12 členů rodiny TLR u savců (Akira et al. 2006).

Toll-like receptory zajišťují identifikaci extracelulárních a endosomálních PAMPs, která vede ke spuštění syntézy a sekrece cytokinů a aktivování obranných mechanismů hostitele (Davies et al. 2008).

Na základě primárních sekvencí mohou být TLR dále rozděleny do několika podrodin, z nichž každá rozpoznává specifické PAMPs. Podskupina TLR1, LTR2 a TLR6 rozpoznává lipoproteiny, TLR4 bakteriální lipopolysacharidy a TLR5 protein flagelin, zatímco TLR7, LTR8 a TLR9 rozpoznávají nukleové kyseliny virového původu (Tabeta et al. 2004). Nicméně TLR jsou neobvyklé v tom, že některé dokážou rozpoznat velmi odlišnou škálu ligandů, jako je rostlinný diterpen paclitaxel, fúzní protein respiračního syncyriálního viru, fibronektin a proteiny tepelného šoku, které se výrazně liší svojí strukturou. TLR jsou exprimovány na různých imunitních buňkách, včetně makrofágů, dendritických buněk a B-lymfocytů i na neimunitních buňkách, jako jsou fibroblasty a epiteliální buňky (Akira et al. 2006).

Bowie & O'Neill (2000) uvádějí, že TLR2 je exprimován v lymfatické tkáni, monocytech a zvláště silně v lymfocytech periferní krve. Exprese TLR3 je zřejmá v mozku, srdci, ve svalech a plicích. Exprese TLR4 převládá ve slezině, lymfocytech a také v srdci. TLR5 byl detekován ve vaječniku, v monocytech v periferní krvi, v leukocytech a v prostatě. TLR6 se vyskytuje převážně ve slezině, thymu, vaječniku a v plicích.

Podle Akira et al. (2006) není exprese statická, ale spíše je charakteristická v reakci na patogeny, různé cytokiny a environmentální stres. TLR mohou být exprimovány extracelulárně, nebo intracelulárně. Zatímco TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 jsou exprimovány na povrchu buňky, TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9 jsou téměř výhradně v intracelulárních kompartmentech, jako jsou endosomy a jejich ligandy (Novák 2014). V tabulce 1 lze vidět rozdělení jednotlivých Toll-like receptorů podle rozeznávání mikrobiálních komponentů a druhu patogenu.

Table 1. TLR Recognition of Microbial Components		
Microbial Components	Species	TLR Usage
<b>Bacteria</b>		
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4
Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11
<b>Fungus</b>		
Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 and TLR4
<b>Parasites</b>		
tGPI-mucin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
<b>Viruses</b>		
DNA	Viruses	TLR9
dsRNA	Viruses	TLR3
ssRNA	RNA viruses	TLR7 and TLR8
Envelope proteins	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinin protein	Measles virus	TLR2
ND	HCMV, HSV1	TLR2
<b>Host</b>		
Heat-shock protein 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

ND = not determined. See text for references.

Obrázek 1: Specifita TLR produktů v rozpoznávání mikrobiálních patogenů (Akira et al 2006).

Z obrázku 1 lze usuzovat, že velká část receptorů rozpoznává široké spektrum patogenů i mikrobiálních komponentů. Např. receptor TLR4 rozpoznává bakteriální a fungální patogeny, dále ale také částice virů, prvků, fibrinogen a proteiny teplotního šoku.

### 3.3.1 Toll-like receptory u skotu

V genomu skotu je známo 10 TLR genů, které se nachází na 7 chromozomech (Sharma et al. 2006; Novák 2014). Z nich pro geny TLR2, TLR4, TLR6 a TLR9 byla prokázána asociace s rezistencí na mastitidu u skotu. Konkrétně TLR2 a TLR4 rozpoznávají složky bakteriálních buněk a jsou důležité při imunitní reakci na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Bovinní TLR2 může přenášet signály z bakterií *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* (Yang et al. 2008; Botos et al. 2011).

Buwitt-Beckmann uvádí, že TLR2 ve spojení s TLR6 rozpoznává širokou škálu složek bakteriální stěny včetně lipopolysacharidů, lipoproteinů a kyseliny teichoové. Rovněž peptidoglykan a kyselina lipoteichoová ze *Staphylococcus aureus* a další grampozitivní bakterie jsou rozpoznávány pomocí TLR2.

Úloha TLR v přenosu signálu o infekci je podpořena údaji o jejich expresi v závislosti na infekčních podnětech. Goldammer et al. (2004) uvádí, že geny TLR2 a TLR4 jsou vysoce exprimovány během mastitidy způsobené bakteriemi *S. aureus* a *Staphylococcus uberis*. Rovněž koncentrace CD14 a sMD2 jako facilitátorů TLR2 a TLR4 jsou zvýšeny v mléce během mastitidy způsobené *E. coli* a *S. aureus* (Bannerman et al. 2004).

Davies et al. (2008) ve své práci uvádí, že endokrinní buňky hrají důležitou mechanickou úlohu v obraně endometria proti bakteriím. Purifikované populace endometriálních epiteliálních buněk exprimovaly TLR1 až TLR7 a TLR9, zatímco stromální buňky exprimovaly TLR1 až TLR4, TLR6, TLR7, TLR9 a TLR10. Exprese těchto TLR je velmi důležitá, protože detekují bakteriální PAMPs. Vrozený imunitní systém v epiteliálních buňkách hraje klíčovou roli v prevenci infekce endometria bakteriemi a ovlivňuje změny endokrinních funkcí.



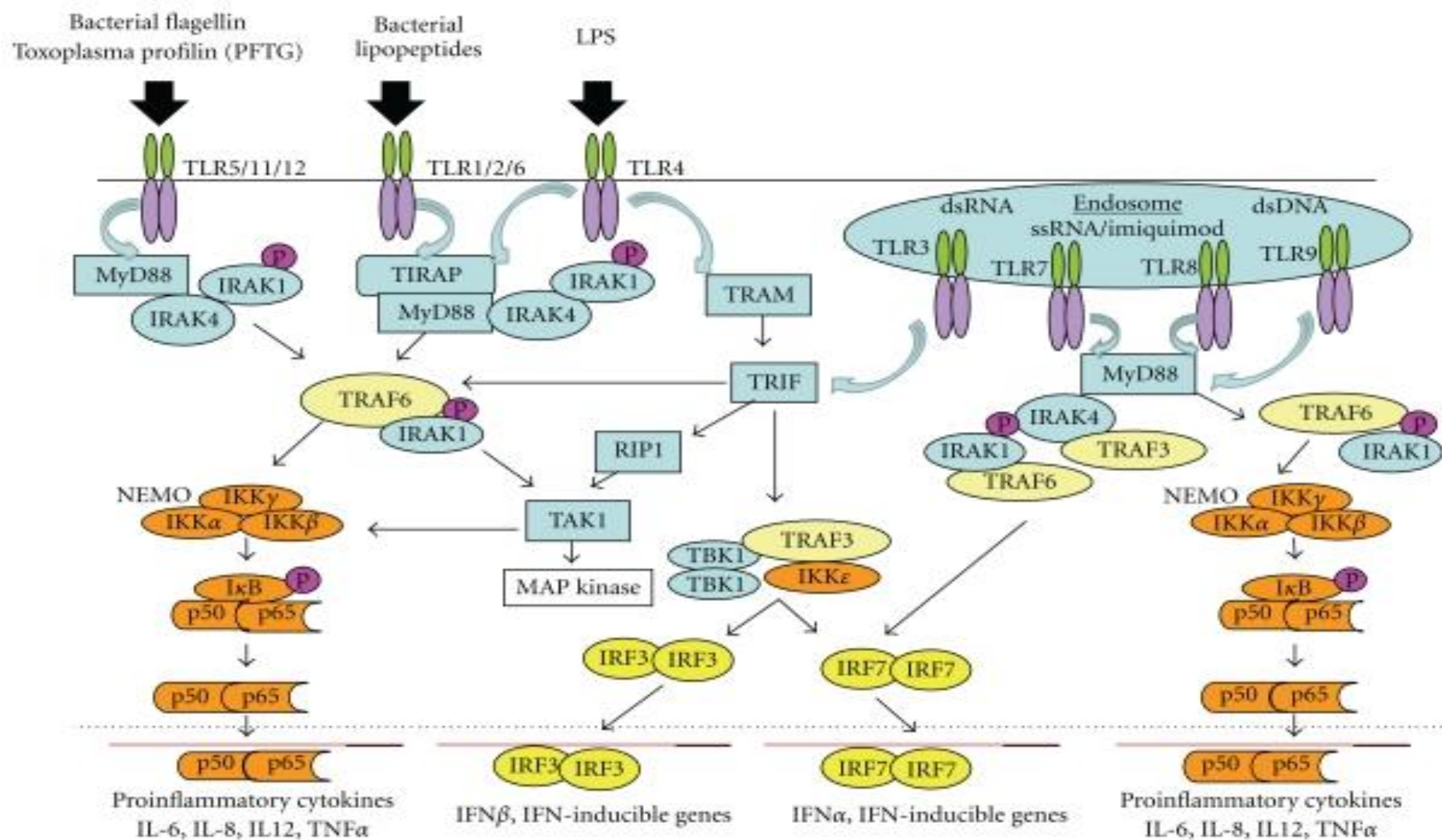
### 3.4 Signální dráhy Toll-like receptorů

Toll-like receptory aktivují několik typů signálních drah. Vždy záleží na kombinaci čtyř adaptorových molekul obsahujících tzv. TIR doménu. Jedná se o vysoce konzervovanou oblast společnou pro Toll-like receptory, receptor interleukinu 1 a rostlinné R geny. Do této skupiny patří protein TIRAP (toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein), adaptorový protein indukující tvorbu interferonu (toll-like receptor domain containing adapter inducing interferon  $\beta$ , TRIF/TICAM1), protein Myd88 (myeloid differentiation primary response 88) a protein TRAM/TICAM2 (TRIF related adaptor molecul 2) (Horng et al. 2001, Yamamoto et al. 2003; Conejeros et al. 2015). Interakce mezi doménami receptorů a adaptorů této skupiny jsou nutné pro spuštění signálních drah. Poté, co se ligand naváže na TLR, dochází k aktivaci signální kaskády. S navázáním ligandu TLR dimerizuje a dochází zde ke konfiguračním změnám a zapojení TIR domény TLR (Akira et al. 2006; Hosseini et al. 2015).

Následně jsou aktivovány transkripční faktory NF- $\kappa$ B (jaderný faktor  $\kappa$ B) a AP1 (aktivátorový protein 1), které vyvolávají syntézu zánětlivých cytokinů, např. interleukinu 6, interleukinu 8 a interleukinu 12 (Kawai & Akira 2007).

Myd88 a TRIF jsou zodpovědné za aktivaci různých signálních drah, vedoucí k produkci protizánětlivých cytokinů, interferonů typu I a chemokinů. Poté se aktivuje IRAK4 a IRAK1 přes homofilní interakce s death domain tzv. smrtících receptorů. Myd88 je nezbytný pro signalizaci všech TLR s výjimkou TLR3 (Takeda & Akira 2004; Russell et al. 2012). Tyto dráhy také spouštějí antigen-specifické odpovědi pomocí regulace kostimulačních molekul v dendritických buňkách. Dle molekuly Myd88 můžeme rozlišovat dva typy signálních drah. Dráhu obsahující Myd88 a dráhu bez Myd88, neboť Myd88 je, kromě TLR3, univerzálním adaptorem a aktivátorem signalizace pro všechny Toll-like receptory (Kawai & Akira 2007; Yin et al. 2015).

TLR3 využívá místo Myd88 molekulu TRIF, přičemž TRIF je také využíván jako alternativní cesta pro TLR4. V tomto případě nastává interakce TIR domény receptoru a molekul adaptoru. TLR4 navíc využívá k vazbě s TRIF adaptorem TICAM2/TRAM, na rozdíl od TLR3, který přímo interaguje s TRIF adaptorem (Ob. 2) (Bhaladhare et al. 2016).



Obrázek 2: Schéma signální dráhy TLR (Zhu & Mohan 2010)

Následně je signál zaznamenán molekulami TRAF3, IKK a TBK1. Poté jsou aktivovány transkripční faktory IRF3 a IRF7 a dochází k jejich translokaci do jádra (Oshiumi et al. 2003). Honda & Taniguchi (2006) uvádí, že existuje 9 členů rodiny IRF (IFR1-IFR9) a několik IRFs, přičemž IRF3 je nezbytný v signalizaci TLR. IRF7, který je také přítomen v cytoplazmě a translokuje se do jádra po fosforylaci, je strukturálně nejpodobnější IRF3. Exprese IRF7 je slabá v nestimulovaném stavu, ale v reakci na virovou infekci rapidně vzrůstá.

V případě anti-bakteriální skupiny TLR1, TLR2 TLR4 a TLR6 se MyD88 váže na adaptor Mal (obr. 2). Spojení Toll-like receptorů s adaptorovými molekulami stimuluje IRAK4 jako další článek řetězce. Následně dochází k fosforylaci molekuly IRAK4, která aktivuje IRAK1 (obr. 2). Poté se obě molekuly odštěpí od MyD88 a dochází k interakci s dalším článkem TRAF6 (Kawai & Akira 2007; Chen 2005).

Jedna z možných drah TLR3 může vést přes protein RIP1, který posléze také reaguje s molekulou TRAF6. E3 ligáza TRAF6 tvoří komplex s Ubc13 a Uev1A na podporu syntézy ubikvitinových řetězců přes lysin 63, které následně aktivují TAK1 a MAP kinázy (Chen et al. 2005).

Kináza TAK1 (mitogen-activated protein kinase 7, MAP3K7) v kombinaci s TAB1, TAB2 a TAB3 aktivuje dvě dráhy zahrnující komplex IKK a rodinu MAPK. Komplex IKK obsahuje podjednotky IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  a IKK $\gamma$  a katalyzuje fosforylaci I $\kappa$ B bílkovin. Tato fosforylace je nezbytná pro degradaci I $\kappa$ Bs a následnou jadernou translokaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, který již přímo kontroluje expresi genů pro zánětlivé cytokiny (Kawai & Akira 2007).

Druhá dráha se odděluje potom, co TAK1 aktivuje MAPK dráhu. Ta zprostředkovává aktivaci AP-1. Tento transkripční faktor, stejně jako NF- $\kappa$ B, reguluje expresi genů pro zánětlivé cytokiny (Kawai & Akira 2007).

### **3.5 Negativní regulace Toll signálních drah**

Řada molekul slouží naopak k negativní regulaci signálních drah TLR a jsou proto nezbytné k omezení zánětlivých reakcí, které mohou v praxi vést až k septickému šoku. Některé molekuly negativně regulují expresi TLR, zatímco jiné negativně regulují

signalizaci od TLR pomocí sekvestrace, degradace a inhibicí transkripce molekul vyskytujících se v signalizačních drahách (Miyake et al. 1995).

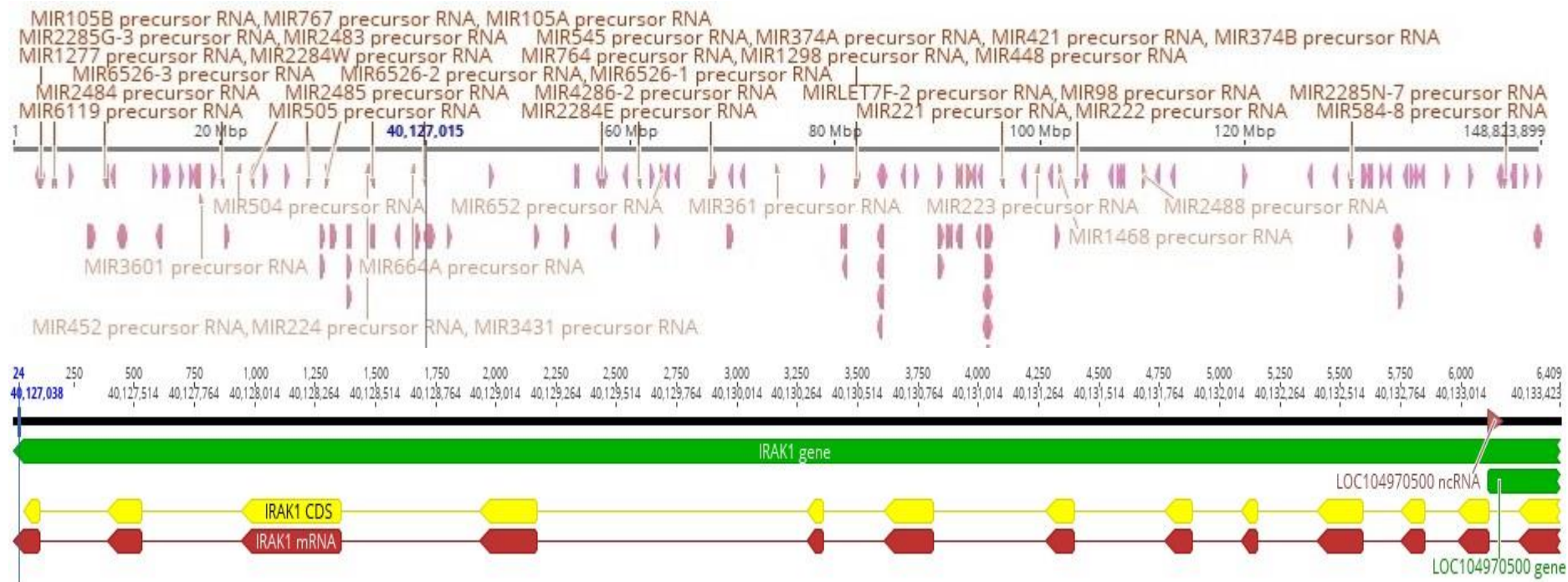
Je identifikováno několik intracelulárních proteinů, které negativně regulují funkci adaptérů obsahující TIR doménu (Kawai & Akira 2007).

Inhibiční efekt na signalizaci vykazují například tyrosinkinázové receptory TAM (Rothlin et al. 2007). O'Neill (2008) uvádí, že glukokortikoidy také inhibují aktivaci MAP kináz a transkripčních faktorů IRF3 a IRF7, čímž zabraňují tvorbě zánětlivých cytokinů. Pokud jsou polyubikvitinové řetězce vázány přes lysin 63, poté jsou proteiny aktivovány. Jestliže jsou vázány přes lysin 48, jsou tyto proteiny degradovány (Chen 2005).

### 3.6 IRAK1

Interleukin-1-receptor asociovaná kináza 1 ( Interleukin-1 receptor –associated kinase 1) je serin/treonin-proteinová kináza, která hraje důležitou roli v iniciaci vrozené imunitní reakce proti patogenům. Podílí se na signálních drahách Toll-like receptorů a IL-1R signálních drahách. IRAK1 je připojen pomocí Myd88 do receptor-signálního komplexu po aktivaci TLR. Asociace s molekulou Myd88 vede u IRAK1 k fosforylaci pomocí IRAK4 a poté k autofosforylaci a aktivaci kinázy. Fosforylace E3 ubikvitinových ligáz PELI1, PELI2 a PELI3 bílkovinami podporuje polyubikvitinaci IRAK 1 řízenou těmito Pellino proteiny. Poté se ubikvitin vázající doména NEMO váže na polyubikvitinovaný IRAK1, který spojuje komplex IRAK1-MAP3K7/TAK1-TRAF6 a komplex NEMO-IKKA-IKKB. MAP3K7/TAK1 aktivuje IKK, což následně vede k NF- $\kappa$ B jaderné translokaci a aktivaci (obr. 2). Při alternativní cestě fosforyluje TIRAP na podporu ubikvitinace a následné degradace. Fosforyluje IRF7, aby došlo k jeho aktivování a translokaci do jádra (Hacker et al. 2006; Uniprot 2007).

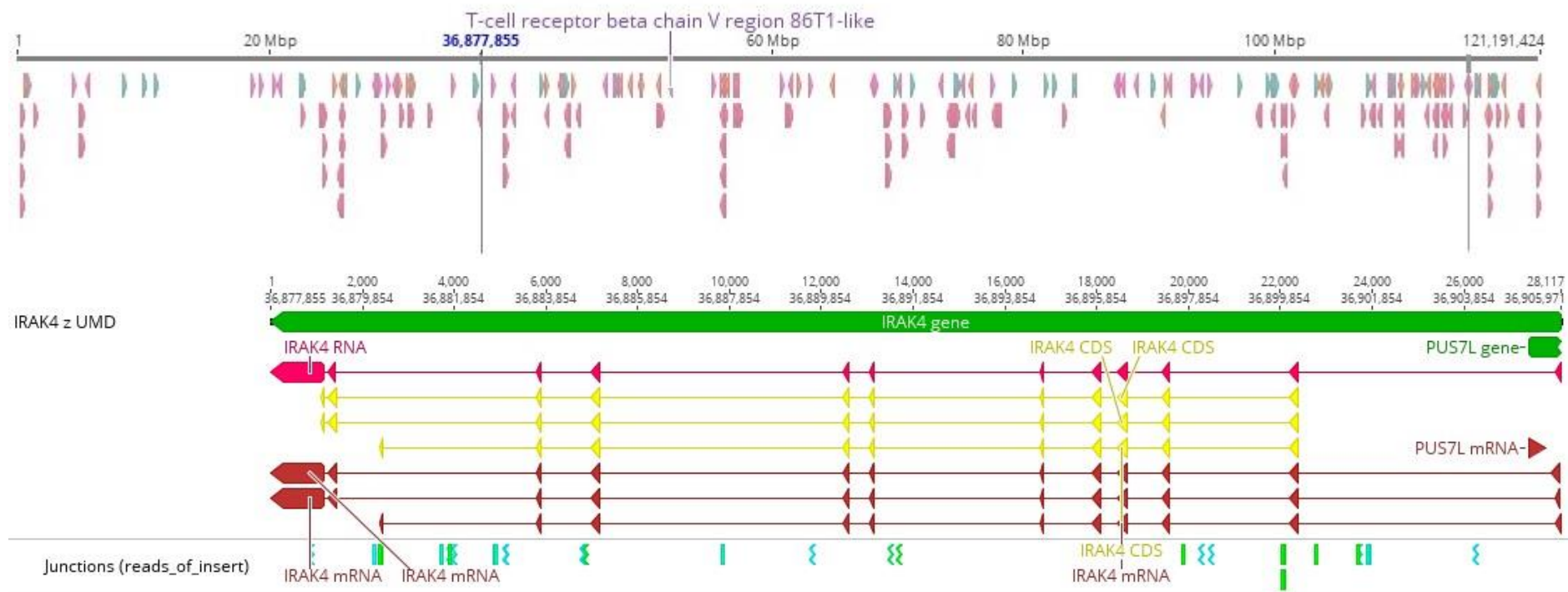
Eberlein et al. (2009) uvádí ve své studii, že výsledky analýzy exprese u skotu rozšířily funkční význam IRAK1 pro různé tkáně, včetně jater, kosterních svalů, mléčné žlázy a podkožního tuku, které se podílejí na metabolismu energie a tuku u skotu. Podobně jako u člověka byla exprese prokázána pro širokou škálu buněčných typů, což podporuje předpoklad autorů studie, že IRAK1 může mít funkce přesahující regulaci imunitní obrany.



Obrázek 3: Poloha genu IRAK1 na chromosomu X a struktura genu IRAK1. Zpracováno programem Geneious (podle editace bovinního genomu UMD 3.1.1).

### 3.7 IRAK4

Interleukin-1-receptor asociovaná kináza 4 ( Interleukin-1 receptor–associated kinase 4, IRAK4) je, stejně jako IRAK1, serin/treonin proteinová kináza, která hraje důležitou roli v iniciaci vrozené imunitní reakce proti patogenům. Podílí se na signálních drahách Toll-like receptorů a IL-1R signálních drahách. Po aktivaci TLR je okamžitě vázán molekulou Myd88 a společně s molekulou IRAK2 tvoří receptor-signalizační komplex - myddosom. Zpočátku fosforyluje IRAK1, čímž stimuluje kinázovou aktivitu a další autofosforylaci IRAK1 Fosforylace E3 ubikvitinových ligáz PELI1, PELI2 a PELI3 bílkovinami podporuje polyubikvitinaci IRAK 1 řízenou Pellino proteiny (Uniprot 2006, Yin et al. 2015). Pak se doména vázající ubikvitin IKBKG/NEMO váže na polyubiquitinovanou molekulu IRAK1, která spojuje komplex IRAK1-MAP3K7/TAK1-TRAF6 a komplex NEMO-IKKA-IKKB. MAP3K7/TAK1 aktivuje IKK (CHUK/IKKA a IKBKB/IKKB), což vede k translokaci do jádra a k aktivaci NF-kappa-B. Alternativně fosforyluje TIRAP na podporu jeho ubikvitinace a následné degradace. IRAK4 také fosforyluje NCF1 a reguluje aktivitu NADPH po stimulaci LPS, což naznačuje podobný mechanismus během mikrobiálních infekcí (Uniprot 2006).



Obrázek 4: Poloha genu IRAK4 na chromosomu 5 a struktura genu IRAK1. Zpracováno programem Geneious (podle editace bovinního genomu UMD 3.1.1).

### 3.8 MAL

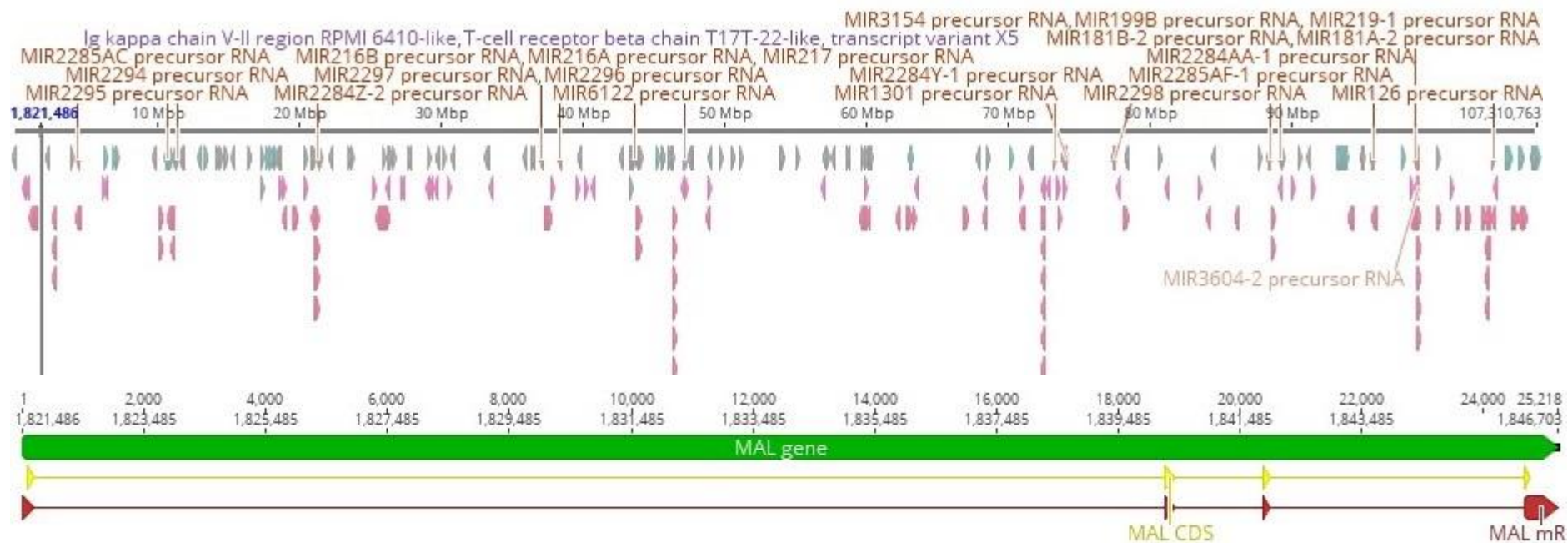
Alternativní sestřih genu vytváří čtyři varianty transkriptu, které se navzájem liší přítomností, nebo nepřítomností alternativně sestřižených exonů 2 a 3. Protein kódovaný genem MAL je vysoce hydrofobní membránový proteolipid se čtyřmi transmembránovými oblastmi a se dvěma extracelulárními smyčkami patřící do rodiny MAL proteolipidů. Nachází se zejména v polarizovaných epiteliálních buňkách, oligodendrocytech a lidských T-lymfocytech (Zacchetti et al. 1995; Millan et al. 1997; Genecards 2018).

Protein byl lokalizován na v endoplazmatickém retikulu T-lymfocytů a jedná se o kandidátní linkerový protein v transdukcí signálu T-lymfocytů. Kromě toho je tento protein lokalizován v kompaktním myelinu nervových buněk a je zapojen do biogeneze a funkce myelinu. Tento protein také hraje roli při tvorbě, stabilizaci a udržování glykosfingolipidových membránových mikrodomén. Snížená regulace tohoto genu je spojena s řadou lidských epiteliálních malignit (Genecards 2012).

V lidských T-lymfocytech se MAL exprimuje na plazmatické membráně a podílí se na tvorbě imunologických synapsí (Anton et al. 2008).

V polarizovaných epiteliálních buňkách je MAL lokalizován na apikální membráně a předpokládá se, že se bude pohybovat mezi Golgiho aparátem a plazmatickou membránou v TGN systému. MAL také hraje rozhodující úlohu při tvorbě, stabilizaci a udržování lipidových raftů obecně (Anton et al. 2011).





Obrázek 5: Poloha genu MAL na chromosomu 11 a struktura genu MAL. Zpracováno programem Geneious (podle editace bovinního genomu UMD 3.1.1).

## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Sada vzorků DNA z populace ČESTR**

Vzorky DNA byly izolovány z inseminačních dávek býků dodaných chovatelským družstvem IMPULS. Inseminační dávka v kapiláře (pejetě) byla rychle rozmrazena při 37°C a dále uchovávána na ledu. Alikvóta o objemu 50  $\mu$ L byla centrifugována ve zkumavce 1,5 ml při 8000 ot/min po dobu 5 minut. Sediment byl 1x promyt 100  $\mu$ L fosfátového fyziologického roztoku (PBS) a znovu centrifugován. Lýze byla prováděna v 225  $\mu$ L lyzačního pufru ze soupravy MagSep Tissue (Eppendorf). Ke vzorku bylo přidáno 25  $\mu$ L roztoku proteinázy K ze soupravy MagSep a 22  $\mu$ L 1 M roztoku dithiothreitolu (DTT). Po vortexování po dobu 1 min byla směs 12 hodin inkubována při 56°C. Po centrifugaci při 11.000 g po dobu 5 min bylo 225  $\mu$ L supernatantu přeneseno do 2 ml mikrozkuvek (Eppendorf) a použito pro automatickou izolaci DNA na stanici EpMotion. M5073 (Eppendorf). DNA byla v programu nejdříve vázána na suspenzi paramagnetických částic, třikrát promyta a čistý preparát byl získán pomocí 30 - 100  $\mu$ L elučního pufru. Výtěžek se u této metody pohybuje kolem 20  $\mu$ g. Zásobní 1 M roztok DTT byl připraven rozpuštěním 1,545 g DTT v 10 mL H<sub>2</sub>O a filtrací přes antibakteriální nitrocelulózový filtr s póry 0,2  $\mu$ M, potom byl skladován při -20°C. Sada vzorků DNA 164 býků byla vstupem diplomové práce. Oproti původnímu předpokladu, kvalita všech DNA vzorků byla dostatečná pro reprodukovatelnou PCR, takže náhrada jednotlivých vzorků novými izolacemi nebyla nutná. Osekvenováno bylo všech 164 vzorků, pro genotypovací reakce bylo využito pouze 96 vzorků.

### **4.2 Upřesnění kódujících oblastí vybraných genů a jejich amplifikace pomocí PCR**

#### **4.2.1 Upřesnění kódujících oblastí a výběr amplifikačních primerů**

Podle dat z NCBI byly vyhledány jednotlivé geny IRAK1, IRAK4 a MAL. Z databáze NCBI byly exportovány sekvence jednotlivých genů a příslušné mRNA. Hranice exonů byly vyhledány porovnáním sekvencí pomocí algoritmu ClustalW obsaženém v programu

Bioedit a následnou kontrolou na motivy intron-exonových rozhraní. I když jsou hranice exonů uváděny v použité verzi bovinního referenčního genomu UMD\_3.1.1, nebývá vymezení exonů na základě strojové editace vždy spolehlivé, proto byl použit nezávislý postup.

Pro resekvenování těchto genů bylo nezbytné je amplifikovat na potřebnou koncentraci pomocí PCR. V literatuře nebyly dohledány žádné amplifikační primery pro tyto geny, proto byly primery pro všechny geny navrhovány v rámci diplomové práce. I když v případě genů IRAK1 a IRAK4 byla amplifikačními úseky pokryta celá oblast genu, u genu MAL byla využita znalost exon-intronových rozhraní pro takový návrh amplikonů, aby byly zahrnuty především exony. Amplifikovat celou oblast genu MAL by bylo technicky obtížné, navíc diverzita v intronech nebývá funkčně významná.

Náležitě amplifikační primery byly vytvořeny v programu Bioedit. Primery se vybíraly tak, aby amplikony nabývaly hodnot kolem 1500 nukleotidů. Tyto hodnoty však velmi kolísaly, neboť se vyskytovaly nevhodné oblasti pro návrh primerů. Následně byly všechny primery kontrolovány v programu Oligoanalyzer na serveru firmy Integrated DNA Technologies ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)). Zde byla sledována vazebná teplota, komplementarita mezi forward a reverse primery a vlastní komplementarita primeru, která by mohla znemožnit nasednutí primeru na cílové místo na předloze DNA.

Primery byly objednány u firmy Eurofins Genomics (Konstanz, SRN). Dle instrukcí od dodavatele a podle výtěžku byly lyofilizované primery ředěny deionizovanou vodou bez nukleáz na výslednou koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Ve druhém kroku byly primery ředěny na koncentraci 10  $\mu\text{M}$  na mikrodestičkách ve formátu 96.

#### **4.2.2 Amplifikace fragmentů genů pomocí PCR**

Pro PCR amplifikaci byly využívány dva typy přístrojů: Biometra Thermocycler T-Gradient Thermoblock (Biometra, Göttingen, SRN) a Eppendorf Mastercycler Gradient Thermal Cyler 96 well (Eppendorf, (Eppendorf, Hamburk, SRN). Pro složení reakční směsi se vždy vycházelo z instrukcí od dodavatele. Nejprve byla testována Taq DNA polymeráza z katalogu Fermentas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). V případě užití Taq DNA polymerázy od Fermentas bylo složení jedné reakce o objemu 10  $\mu\text{l}$  následující: 6,9  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, 1  $\mu\text{l}$  koncentrovaného pufru o složení Tris-HCl 100 mM (pH

8,8), KCl 500 mM a Nonidet 0,8%, dále byly přidáno 0,8  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ l 10 mM dNTP, 0,06  $\mu$ l Taq-polymerázy (5 U/  $\mu$ l), 3  $\mu$ l genomické DNA o koncentraci 2 ng/ $\mu$ l a 0,8  $\mu$ l směsi 10  $\mu$ M reverse a forward primeru 1:1. Více se osvědčil Basic PCR Master Mix od firmy Generi Bitech (Hradec Králové, ČR). Tento mix pro PCR obsahuje enzym Taq DNA polymerázu v modifikaci hot-start, reakční pufr, dNTP, MgCl<sub>2</sub> a aditiva zabraňující inhibici PCR reakce. Složení jedné reakce o objemu 10  $\mu$ l v případě Basic PCR Master Mix bylo 3,95  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l Basic PCR Master Mix, 0,25  $\mu$ l gDNA a 0,8  $\mu$ l směsi reverse a forward primerů.

Při používání termocyklerů se používaly čtyři programy pro PCR amplifikaci, zobrazené v tabulce 1.

Tabulka 1 – Programy thermocycleru pro amplifikaci fragmentů pro geny IRAK1, IRAK4, MAL.

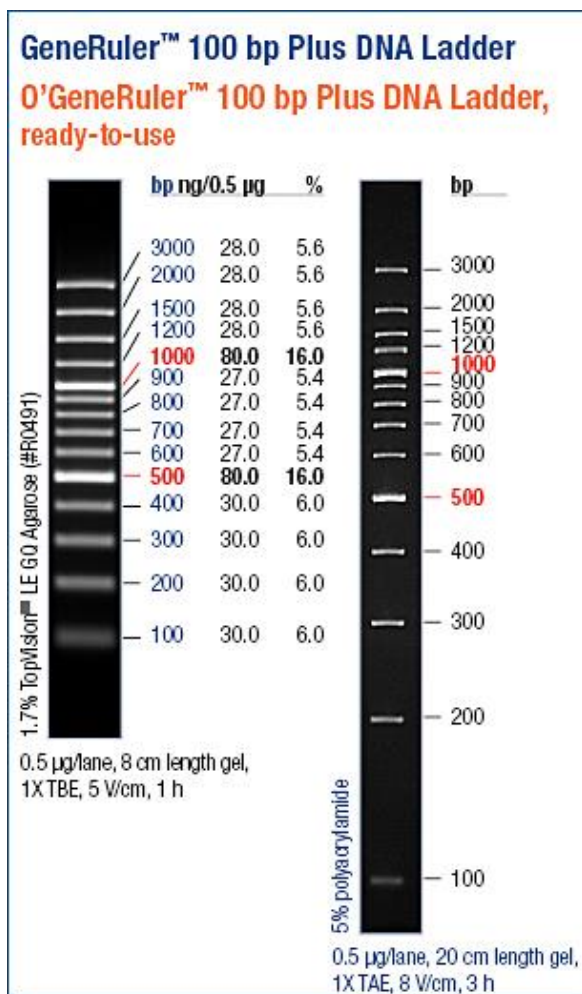
Název programu	krok č. 1	krok č. 2 (5 cyklů)			kroč. 3 (38 cyklů)			krok č. 4
Prog. 60/58°C	95°C - 60 s	95°C - 30 s	60°C - 30 s	72°C - 120 s	95°C - 30 s	58°C - 30 s	72°C - 120 s	72°C - 360 s
Prog. 62/60°C	95°C - 60 s	95°C - 30 s	62°C - 30 s	72°C - 120 s	95°C - 30 s	60°C - 30 s	72°C - 120 s	72°C - 360 s
Prog. 64/62°C	95°C - 60 s	95°C - 30 s	64°C - 30 s	72°C - 120 s	95°C - 30 s	62°C - 30 s	72°C - 120 s	72°C - 360 s
Prog. 66/64°C	95°C - 60 s	95°C - 30 s	66°C - 30 s	72°C - 120 s	95°C - 30 s	64°C - 30 s	72°C - 120 s	72°C - 360 s

Všechny programy pro amplifikaci fragmentů byly sestaveny na stejném principu. Krok č. 1 byl vždy úvodní denaturační krok po dobu jedné minuty. První typ cyklů se zvýšenou specifičností byl složen ze 3 po sobě jdoucích kroků. První fází byla denaturace na 95°C na 30 sekund. Následovala anelační fáze, určena pro nasednutí primerů. V této fázi se všechny programy liší teplotou, čas zůstal stejný – 30s. Poslední elongační fáze byla opět pro všechny programy stejná - 72°C po dobu 120 sekund. Druhý typ cyklů s nižší specifičností a vyšším výtěžkem se skládal opět ze 3 kroků. První fáze byla opět denaturace při 95°C na 30 sekundu. Anelační fáze byla opět rozdílná v použitých teplotách pro všechny programy, změna byla v anelační teplotě, která byla navíc na rozdíl od prvního typu cyklů snížena o 2°C. Elongační fáze byla stejná jako u kroku č. 2. Posledním krokem byl dodatečný krok č. 4, který byl určen k dosyntetizování komplementárních vláken DNA. Po ukončení PCR následovala kontrola fragmentů pomocí elektroforézy. Produkty PCR byly skladovány při 4°C, dlouhodobě při -20°C

#### 4.2.3 Kontrola fragmentů pomocí elektroforézy

Po PCR byly všechny fragmenty testovány na elektroforéze, přičemž jako nosič byl zvolen 1,6 % agarózový gel. Pro přípravu bylo použito 1,6 g agarózy na 100 ml pufru TBE (Tris - borát - EDTA). Následně byl agarózový roztok povařen v mikrovlnné troubě po dobu přibližně šesti minut. Poté bylo přidáno 10  $\mu$ l fluorescenčního barviva GelRed (Biotium, Fremont, USA) na 100 ml agarózového gelu.

Tento roztok byl následně nalit do výšky přibližně 1 cm do předem připravené vany s hřebínky a nechal se ztuhnout po dobu přibližně 45 minut. Poté se vyjmuly hřebínky a do vany s rozdělenými komorami (jednalo se o typ vysokorychlostní horizontální elektroforézy Liberty, výrobce Biokeystone Company, El Monte, CA, USA) byl nalit do komor elektrod chlazený pufr TBE, do komor nad gelem se nalila chlazená H<sub>2</sub>O. Do jamek po hřebínku se následně nanášel produkt PCR společně s nanášecím pufrem (6x Loading solution, výrobce Fermentas), kterým byla umožněna kontrola vložení PCR produktu do jamky a také určení rychlosti migrace fragmentů v gelu podle barevných značek xylencyanolu a bromfenolové modři. Do postranních jamek gelu byl také přidán hmotnostní standart GeneRuler 100 bp Plus z katalogu Fermentas.



Obrázek 6: Rozdělení hmotnostního standartu na agarózovém gelu (podle podkladů Thermo Fisher Scientific)

Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji a při konstantním napětí 200 V byly vzorky děleny po dobu přibližně 40 minut (čas závisel na počtu van zapojených současně ke zdroji). Po ukončení elektroforézy byl gel přemístěn na modrý transluminátor UltraBright LB-16 (MaestroGen, Hsinchu, Tchaj-wan) a byl ověřen výsledek. Toto pozorování bylo spíše využíváno jako prvotní kontrola výsledku PCR. Při přítomnosti produktů reakce byl gen přenesen pod fluorescenční kameru G:BOX Chemi XR (Syngene, Cambridge, UK), kde byly pořízeny konečné snímky s horním UV osvětlením a ethidium bromidovým emisním filtrem a exportovány do elektronické podoby. Výsledné fragmenty byly na počítači porovnávány s hmotnostním standardem pro přesné určení hmotnosti PCR produktů a zároveň byl porovnáním intenzit fluorescenčního signálu určen výtěžek. V případě neúspěchu při identifikaci fragmentů se pracovní postup vracel

zpět k PCR amplifikaci. Pokus byl opakován s použitím jiného teplotního programu na cykléru, jiného druhu DNA polymerázy či s eliminací možných zdrojů kontaminace.

#### **4.2.4 Příprava vzorku pro NGS**

V prvním kroku byl připraven směsný vzorek gDNA z celé populace. Po amplifikování všech PCR fragmentů ze směsného vzorku gDNA byly všechny produkty smíchány do nového směsného vzorku amplikonů s důrazem na stejnou molaritu u všech fragmentů. Následně byla směs amplikonů čistěna sadou QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), která je určena k purifikaci jedno a dvouvláknových fragmentů DNA z PCR. Dle návodu se před použitím musí přidat ethanol (96-100%) po rysku na zkumavce s dodávaným pufrům PE a pH indikátor I v poměru 1:250 do pufru PB.

Následně se přidával pufr PB v poměru (objemovém) 5:1 k PCR vzorku. Zkumavka s absorpční kolonkou byla vložena do centrifugy společně s odběrovou zkumavkou. Pro navázání DNA byl vzorek nanesen na kolonku QIAquick a centrifugován 60 sekund. Následně byla odběrová zkumavka vyprázdněna a znovu použita pro promytí vzorku. Pro promytí bylo přidáno 0,75 ml pufru PE na kolonku a zkumavky byly opět centrifugovány po dobu 60 sekund. Obsah odběrové zkumavky byl vylit a zkumavka opět nasazena zpět, přičemž se centrifugace jednou opakuje pro odstranění zbytků alkoholu. Ty by výrazně snížily rozpustnost DNA při jejím vymytí z kolonky v dalším kroku. Poté je horní zkumavka s kolonkou umístěna do čisté 1,5 ml zkumavky pro purifikovaný vzorek DNA. Pro vymytí DNA se přidávalo 50  $\mu$ l elučního pufru (EB) obsahujícího 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, do středu kolonky ve vrchní zkumavce a následně centrifugovalo po dobu 60 sekund.

#### **4.3 Využití vysokokapacitní metody pro screening polymorfismů ve vybraných genech**

Směsný vzorek byl ve zmraženém stavu odeslán na sekvenátor PacBio RSII od společnosti Pacific Biosciences (Menlo Park, CA, USA) ve spádové servisní laboratoři Eurofins Genomics (Konstanz, SRN). Jedná se o technologii, která nabízí délku čtení až v průměru 20 kb. Přesné označení technologie je Single Molecule Real-Time sequencing (SMRT). Principem technologie je přímé sekvenování dodaných templátových fragmentů



a nedochází zde k jejich amplifikaci, na rozdíl od většiny ostatních sekvenačních zařízení pro NGS. Fragmenty jsou čteny opakovaně během jednoho běhu přístroje, protože jsou uzavřeny do cirkulárního konstruktů. Porovnáním opakovaných čtení téhož místa templátu se zvyšuje přesnost konečné (konsensní) sekvence DNA. Tato metoda také vykazuje větší spolehlivost při čtení úseků s dlouhými repeticemi a oblastmi bohatými na GC báze.

#### **4.4 Identifikace variant a porovnání s databázovými údaji o variabilitě skotu**

Výsledky zaslány od laboratoře Eurofins Genomics ve formátu FASTA byly zpracovány v programu Geneious, kde byly funkcí mapování podle podobnosti sekvencí v programu Geneious přiřazeny k příslušnému genu. Pro mapování byl použit algoritmus implementovaný v programu Geneious. Zde mohly být určeny přečtené sekvence - ready - odpovídající jednotlivým ampliconům v sekvenované směsi.

Poté byla využita funkce nalezení sekvenčních variant na základě statistického vyhodnocení mapovaných readů. Byly hledány varianty, u nichž pravděpodobnost náhodného původu byla nižší než 0,01. Nalezené varianty byly exportovány jako tabulka ve formátu csv. Při vizuální kontrole sekvenčních variant označených programem byly vybrány takové mutace, které se zdály jako reálné. Také byly vyřazeny chyby, které vznikly charakteristickou chybovostí technologie PacBio, např. kolísání v počtu přečtených opakujících se nukleotidů jako v záměně G(4)->G(5).

Jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms, SNP), které nebyly vyřazeny vizuální kontrolou, byly porovnávány s polymorfismy zaznamenanými v databázi EBI (European Bioinformatics Institute). Seznam variant známých k určitému datu pro příslušný gen tura domácího byl exportován ve formě csv souboru (viz příloha 1 a 2). Lokalizace variant vycházela z editace bovinního genomu UMD\_3.1.1 (University of Maryland).

#### **4.5 Návrh sady genotypovacích reakcí pro nalezené varianty a jejich ověření.**

Protože sekvenování směsného populačního vzorku neposkytuje informaci o přiřazení jednotlivých SNP k příslušným jedincům, byly použity genotypovací reakce.

Konkrétně byla použita metoda extenze primeru (Hoogendoorn et al., 1999), a to v komerční verzi SNaPshot (divize Life Technologie firmy Thermo Fisher Scientific).

#### **4.5.1 Navržení extenzních primerů**

Extenzní primery byly navrženy tak, aby přiléhaly v přímé nebo reverzní orientaci k variabilnímu nukleotidu. Primery byly navrženy v programu Geneious, přičemž jejich délka byla optimalizována tak, aby byla v rozmezí 20 až 30 nukleotidů a také aby se zastoupení GC nukleotidů pohybovalo kolem 60%. Primery byly kontrolovány v programu Oligoanalyzer na serveru [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com) na autokomplementaritu, tj. komplementaritu uvnitř primeru vedoucí k tvorbě homodimerů, a na tvorbu vlásenkových struktur. Na základě těchto parametrů se vybral z dvojice přímý/zpětný primer ten, který vykazoval vhodnější vlastnosti. Na 5' konec základní sekvence primeru byl přidán polyT úsek, aby se délka primerů v jednom multiplexu stupňovala po pěti nukleotidech a bylo možné určovat současně více produktů v jednom vzorku při dělení na jedné kapiláře automatického sekvenátoru.

Samotné určení nukleotidu v místě mutace probíhalo na základě odlišných fluorescenčních značek spojených s dideoxynukleotidtrifosfáty v reakční směsi soupravy SNaPshot (SNaPshot Ready Reaction Mix). Ta obsahuje reakční pufr, *Taq* DNA polymerázu a fluorescenčně značené dideoxynukleotidtrifosfáty (ddNTP). Jako templátová DNA byly použity fragmenty nesoucí polymorfismy amplifikované pomocí PCR z DNA jednotlivých zvířat.

#### **4.5.2 Amplifikace fragmentů obsahující polymorfismy**

Dle souřadnic SNP na jednotlivých genech bylo určeno, na jakém amplifikačním fragmentu se daný SNP nachází. Tyto fragmenty byly vybrány a znovu amplifikovány pro každého jedince zvlášť. Pro každý fragment se využíval specifický program PCR amplifikace, jako enzym byl zvolen *gb* Basic PCR Master Mix od firmy Generi Biotech. Produkty PCR byly po vyjmutí z thermocykleru uloženy ve 4 °C.

#### 4.5.3 Čištění amplifikačních fragmentů

Pomocí směsí exonukleázy a fosfatázy byly odstraněny přebytečné amplifikační primery a dNTP, které by mohly mít negativní efekt pro následující reakce. Pro přečištění 6  $\mu\text{L}$  vzorku bylo použito 1,8  $\mu\text{L}$  termosenzitivní alkalické fosfatázy FastAP, 1 U/ $\mu\text{L}$  (Fermentas, Vilnius, Litva, kat. č. EF0651) a 0,8  $\mu\text{L}$  exonukleázy I, 20 U/ $\mu\text{L}$  (Fermentas, k.č. EN0581). Po promíchání byly vzorky vloženy do thermocykleru a inkubovány na mikrodestičce po dobu půl hodiny při 37 °C. V dalším kroku jsou enzymy inaktivovány zahřátím na 85°C po dobu 15 minut.

#### 4.5.4 Provedení genotypovacích reakcí

Pro ověření genotypovacích reakcí bylo nejprve využito zbytku PCR produktů, které byly původně připraveny pro NGS sekvenování. Po amplifikaci nových fragmentů bylo využito pro ověření reakcí vždy prvních 12 býků z každé destičky daného fragmentu. Produkty PCR byly smíchány do multiplexních genotypovacích reakcí tak, aby nedocházelo k překrytí primerů pro jednotlivé SNP. Pro jednu reakci se využívalo 3  $\mu\text{L}$  PCR produktu, 5  $\mu\text{L}$  reakční směsi SNaPshot od firmy Life Technologie a 2  $\mu\text{L}$  extenzního primeru o koncentraci 0,1  $\mu\text{M}$ . Destička s namíchanými reakcemi je vložena do thermocykleru a je spuštěn program odvozený ze standardního programu pro použití soupravy SNaPshot, který je složen z 25 cyklů s třemi kroky. První krok trvá 10 sekund při 96 °C, druhý 5 sekund při 50 °C a třetí 30 sekund při 60 °C. Poté dochází k zchlazení na 4 °C.

Následně je směs čištěna pomocí FastAP v množství 1  $\mu\text{L}$  na reakci. Po promíchání byly vzorky opět vloženy do thermocykleru a inkubovány na mikrodestičce po dobu půl hodiny při 37 °C. Dalším krokem jsou enzymy inaktivovány zahřátím na 85°C po dobu 15 minut. Dva  $\mu\text{L}$  produktu jsou dále použity na pro fragmentovou analýzu na sekvenátoru.

Fluorescenční produkty byly přeneseny do formamidu a doplněny fluorescenčně značenými standardy GeneScan 120 LIZ (Thermo Fisher Scientific) v poměru 8,5  $\mu\text{L}$  formamidu + 1  $\mu\text{L}$  vzorku + 0,5  $\mu\text{L}$  standardů. DNA byla denaturována pro oddělení produktů od templátu zahřátím na 5 min při 95 °C a rychlým zchlazením (Novák et al. 2018).

Dále byly vzorky děleny na kapilární elektroforéze (sekvenátoru) ABI 3130 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). Fluorescenční markery, které jsou použity v soupravě SNaPshot a v standardu GeneScan 120 LIZ, byly rozlišeny sadou filtrů E5. Jedná se o fluorescenční barviva dR110, dRGG, dTAMRA, dROX a LIZ. Primární elektroferogramy byly hodnoceny programem PeakScanner (Thermo Fisher Scientific).

#### **4.6 Určení genotypů ve vybraných genech přirozené imunity u modelové skupiny zvířat.**

Cílem genotypování bylo 96 vzorků DNA od jednotlivých býků. Reakce SNaPshot byly prováděny tak, jak je popsáno v bodě 4.5.4. Získané soubory z elektroforetického rozdělení produktů multiplexních reakcí ve formátu fsa pro jednotlivé vzorky byly importovány do programu PeakScanner, kde z nich byl vytvořen pro jednotné zpracování samostatný projekt. V rámci programu byly sjednoceny základní linie pro všechny barevné kanály a proběhla kalibrace migračního času na základě vnitřního standardu GS-120LIZ v oranžovém kanálu. Polohy všech dalších peaků byly exportovány do textového souboru a zpracovány v tabulkovém procesoru pro určení distribuce peaků v jednotlivých barevných kanálech. Identifikované peaky byly dále odděleny pro získání údajů o distribuci a četnosti jednotlivých alel.

#### **4.7 Předpověď funkčních změn v důsledku nalezených mutací.**

Na základě analýzy výsledků z NGS byly vybrány kandidátní SNP, které by potenciálně mohly způsobovat funkční změny jednotlivých aminokyselin. V prvním kroku byly polymorfismy vyhledány a porovnány v databázi EBI (European Bioinformatics Institute). V případě, že zde byla údaj o funkční charakteristice daného polymorfismu, byl tento údaj poznamenán do tabulky funkčních změn. V následujícím kroku byly kandidátní polymorfismy hodnoceny pomocí programů VEP (Variant Effect Predictor) a SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) v databázi ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/vep>), zjištěné informace byly opět zapsány do tabulky funkčních změn.

## 5 Výsledky

### 5.1 Upřesnění kódujících oblastí a výběr amplifikačních primerů

#### 5.1.1 Upřesnění kódujících oblastí a výběr amplifikačních primerů pro IRAK1

IRAK1 dle databáze NCBI leží na chromozómu X na souřadnicích 40127018 – 40133423 (podle editace bovinního genomu UMD 3.1.1) a obsahuje 6406 nukleotidů a 13 exonů. Vzhledem ke krátké sekvenci genu byl amplifikován celý gen IRAK1, to znamená, že amplifikované úseky zahrnuly i méně zajímavé introny. Bylo navrženo 5 párů primerů, přičemž amplifikované úseky se na koncích navzájem překrývaly a záměrem bylo pokrýt celý gen (tab. 2).

Tabulka 2: Primery pro gen IRAK1

Název primeru	Sekvence primeru	počet nukleotidů	poměr GC (%)
IK1_1F	GCGGGCGGTTTCAGCTCCGAAAC	22	68,2
IK1_1R	GGAGCATCATTGAGGGCATCAAGGC	25	56,0
IK1_2F	GAGGGTAGGGAACCGCAGGGCA	22	68,2
IK1_2R	GGCAGGTCTGCTCCTCCGTGG	22	72,7
IK1_3F	GAGCCCAGGCAACACACCAGC	21	66,7
IK1_3R	CCTGGCCTCAGCGACTGGACATCC	24	66,7
IK1_4F	GTCCCCGCCTCACCTCTTGACA	22	63,6
IK1_4R	GCCATCTCCAGCCCCCTCATCTACC	25	64,0
IK1_5F	TGCCTAGGGTGGCCAGGGGACCA	24	70,8
IK1_5R	CCGCCCTGATCGTCCGCGACCAG	23	73,9

Z důvodů nevhodných oblastí pro primer nabývaly amplifikační úseky různých délek kolem hodnoty 1500 nukleotidů. Pro větší přehlednost se používaly souřadnice genů.

Tabulka 3: Poloha a délka amplifikačních primerů pro IRAK1

	počátek	konec	počet nukleotidů
fragment 1	36	1552	1517
fragment 2	1413	2954	1542
fragment 3	2846	4374	1529
fragment 4	4263	5776	1514
fragment 5	5665	6410	746

#### 5.1.2 Upřesnění kódujících oblastí a výběr amplifikačních primerů pro gen IRAK4

IRAK4 dle databáze NCBI leží na chromozómu 5 na souřadnicích 36877855 – 36905971 (podle editace bovinního genomu UMD 3.1.1) a obsahuje 28.117 nukleotidů a 12 exonů. Exony genu jsou rozptýleny po celé jeho délce, proto by omezení amplifikované oblasti pouze na exony nepřineslo výraznou úsporu pracnosti a nákladů. Proto byl gen opět amplifikován celý za použití 20 párů primerů (Tab. 3).

Tabulka 4: Primery pro amplifikaci bovinního genu IRAK4

Název Primeru	Sekvence	počet nukleotidů	Poměr GC (%)
IK4-1F	GCTACTGAGGGTCTACAAGGC	22	59,1
IK4-1R	GTGAAGGAGGTGGGGTCTGTC	21	61,9
IK4-2F	CCACTGCATTTACCATGCTGCC	23	56,5
IK4-2R	CCCCTCTACTGTCTGCCCTGTG	23	65,2
IK4-3F	CACACACACACACAGAGGGGAAG	23	56,5
IK4-3R	CCTAAGGCCCACTTGACTTAC	22	54,5
IK4-4F	GGTGTGATCACTCACCTAGAGCCA	24	54,2
IK4-4R	ATGGACTGCAGCACTCCAGGC	21	61,9
IK4-5F	GGATGGCATCACCGACGTGAT	21	57,1
IK4-5R	GGAGTGGGGTGGGAGTGTTG	21	66,7
IK4-6F	ACCACCCTTTCTCCCTGACACC	23	56,5
IK4-6R	GTCCCATGCCCAGCACTGAG	21	66,7
IK4-7F	GAAGACCCGCAACGTGTTACAG	22	54,5
IK4-7R	GGACTGCAAGGAGGTCCAACC	22	63,6
IK4-8F	CCTCCCAGCATCAGGGTCTTTTC	23	56,5
IK4-8R	CCTGGAACGTGAAGTCAAGTGGG	23	56,5
IK4-9F	AGTCCTGTGGCCACTGCTGAG	21	61,9
IK4-9R	TGGATGGAGGAGCCTGGTAGG	21	61,9
IK4-10F	CAGTCGTGTCCAACCTTGTGTGACC	25	52,0
IK4-10R	CCCAGGGCTGATCTCCTTCAG	21	61,9
IK4-11F	GGACTGTGAAGAAGGATGAGCCCC	24	58,3
IK4-11R	CTGCAGTGCAGGAGACCCAGG	21	66,7
IK4-12F	GAATACTGGAGTGGATTGCCATGCCC	26	53,8
IK4-12R	ATGAACTGCAGCACACCAGGC	21	57,1
IK4-13F	GGCATCTGGTCCCATCACTTC	21	57,1
IK4-13R	GTGTCCAACCTCCTTGCGACCC	21	61,9
IK4-14F	TGGGTTGGGAAGATCTCCTGG	21	57,1
IK4-14R	CTTCCACCCTGATGGGACTCT	21	57,1
IK4-15F	GGCAACCAGACACGAACCCAC	21	61,9
IK4-15R	TCCCTTCCTTTCCCCCATCCC	21	61,9
IK4-16F	GGAGCCCAGTCTGGCACTCTG	21	66,7
IK4-16R	CGTGCGCTGCCTCAGTCTTGG	21	66,7

IK4-17F	CCACCACGGAAGTCCCTTCTCCC	23	65,2
IK4-17R	GCCACTGGCCTGCTGAGAACG	21	66,7
IK4-18F	CACTTGCCTTTGCTCATCTCCCTG	24	54,2
IK4-18R	GCCAGCTTTCCAGATGGTGC	21	61,9
IK4-19F	CCAGGCTTCTCTGTCCACAGG	21	61,9
IK4-19R	GCTAGTGGTAAAGGACCCACC	21	57,1
IK4-20F	CCATTCCTTCTCCAGGGGATCTTC	24	54,2
IK4-20R	CCCTTCGTAGTACCTGGGTCC	21	61,9

Pro gen IRAK4 bylo obzvláště obtížné vyhledat vhodnou oblast pro primery, převážně kvůli oblastem bohatý na báze adenin a thymin, kde by byl podíl GC v primerech značně nižší než optimální 60 %. Amplifikační úseky tedy nabývaly různých hodnot.

Tabulka 5: Poloha amplifikačních primerů pro IRAK4 a délka amplifikovaných úseků

	počátek	konec	počet nukleotidů		počátek	konec	počet nukleotidů
fragment1	72	1233	1162	fragment11	13282	14707	1426
fragment2	889	2527	1639	fragment12	14623	16200	1578
fragment3	2472	4142	1671	fragment13	15582	17830	2249
fragment4	3980	5120	1141	fragment14	17720	19125	1406
fragment5	5051	6343	1293	fragment15	19063	20509	1447
fragment6	6029	7720	1692	fragment16	20446	22320	1875
fragment7	7670	9230	1561	fragment17	21513	23253	1741
fragment8	9077	10422	1346	fragment18	23152	24820	1669
fragment9	10254	11855	1602	fragment19	24708	26366	1659
fragment10	11653	13410	1758	fragment20	26272	28092	1821

### 5.1.3 Upřesnění kódujících oblastí a výběr amplifikačních primerů pro MAL

MAL dle databáze NCBI leží na chromozómu 11 na souřadnicích 1821486 – 1846703 (podle editace bovinního genomu UMD 3.1.1) a obsahuje 25.218 nukleotidů a 4 exony. Pro tento gen byly primery designovány pouze pro exony vzhledem k velkému množství nekódujících úseků. Pro amplifikaci kódující sekvence byly vybrány 4 páry primerů.

Tabulka 6: Primery pro gen MAL

Název primeru	Sekvence primeru	Počet nukleotidů	Poměr GC(%)
MAL-1F	CTGGGCTCCGCCGAGCAAGAGAG	23	69,6
MAL-1R	GGGAAAGGCAGGTCGGGATGGG	23	65,2
MAL-2F	CTGACCGTCACCCCTTCTCTGCC	23	65,2
MAL-2R	GGGGCAGGGGGTAGTGATGGGA	22	68,2
MAL-3F	GGCCGCCCCATCTCTCTGATGGC	23	69,6
MAL-3R	GGTGCCCTGTTCCAGCTCCAC	23	69,6
MAL-4F	CCCCCGTGAATACCCAGTTAAC	23	56,5
MAL-4R	GGTGGGATGGGATAAACCTTG	22	54,5

Pro gen MAL byly primery pomocí programu Bioedit vyhledány (a kontrolovány na komplementaritu) bez větších problémů. Po odzkoušení autokomplementarity v programu OligoAnalyzer byly primery objednány u firmy Eurofins (Genomics).

Tabulka 7: Poloha a délka amplifikačních primerů pro MAL

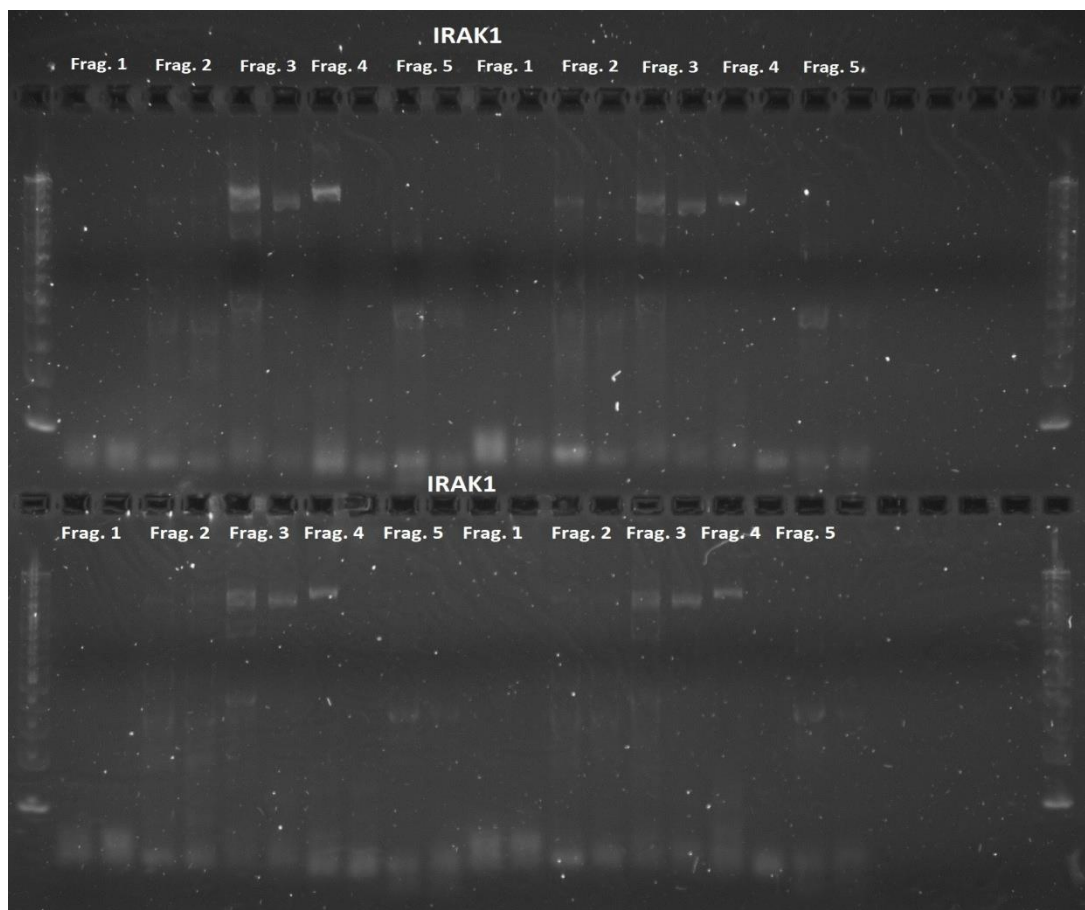
	počátek	konec	počet nukleotidů
fragment1	1	240	240
fragment2	17910	18157	248
fragment3	19447	19709	263
fragment4	23791	24366	576

## 5.2 Amplifikace fragmentů genů pomocí PCR a kontrola pomocí elektroforézy

### 5.2.1 Amplifikace genu IRAK1

Primery pro IRAK1 byly objednané a dodané jako první. Krom testování samotných primerů docházelo také k prvnímu testování polymeráz a programů PCR. V prvním kroku byla použita Taq polymeráza od firmy Fermentas za použití PCR programů 58/56°C a 62/60°C (9. 10. 2018).





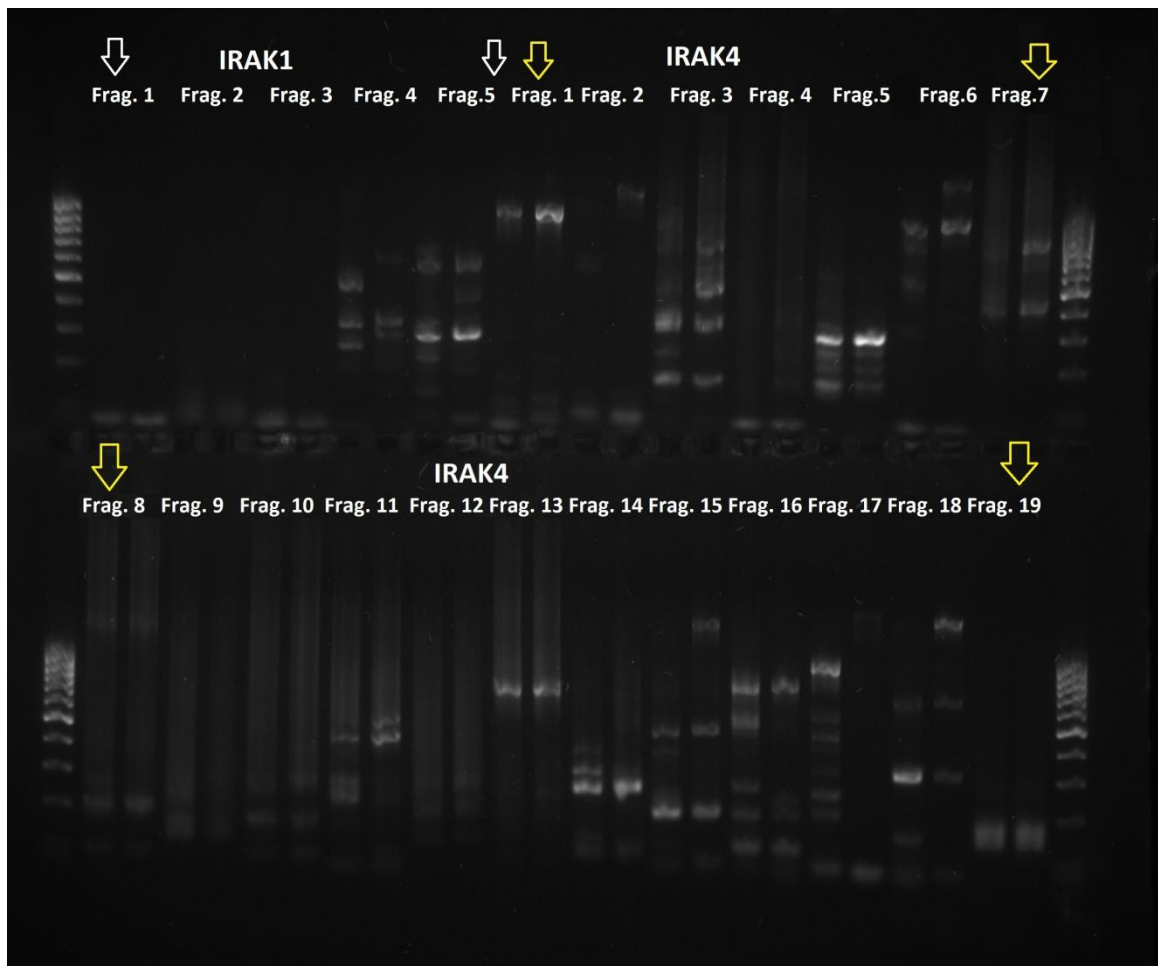
Obrázek 7: Elektroforéza fragmentů IRAK1 č. 1 až 5, střídání programů 58/56°C a 62/60°C.

Z výsledků na obr. 8 plyne, že fragment 1 nebyl amplifikován. U fragmentu 2 byl pozorován pouze slabý produkt při obou programech. Při programu 58/56°C byl pozorován výtěžek u fragmentu 3 a 4. Fragment 4 se již při programu 62/60°C netvořil, u fragmentu 3 byl pozorován slabší výtěžek. U fragmentu 5 byl zaznamenán slabší výtěžek při programu 58/56°C.

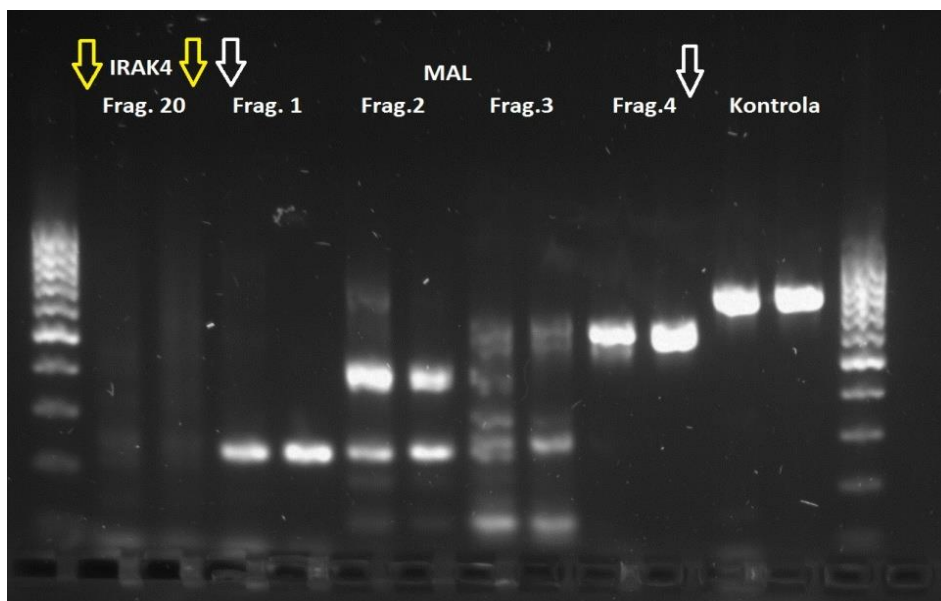
Celý pokus byl ještě jednou zopakován se změnou beznukleázové H<sub>2</sub>O, aby byla vyloučena možnost degradace primerů při kontaminaci nukleázami, ale výsledky byly stejné. Z tohoto důvodu bylo odstoupeno od použití Taq-polymerázy od Fermentas. Pro PCR amplifikace byl využíván Basic PCR Master Mix od firmy Generi Biotech.

### 5.2.2 Amplifikace genů IRAK1, IRAK4 a MAL

Po doplnění dalších primerů pro geny IRAK4 a MAL byly všechny fragmenty amplifikovány společně. První testování proběhlo za použití programu 58/56 °C a 62/60 °C pro každý fragment. Pro přípravu reakcí byl využit Basic PCR Master Mix (30.10.2018).



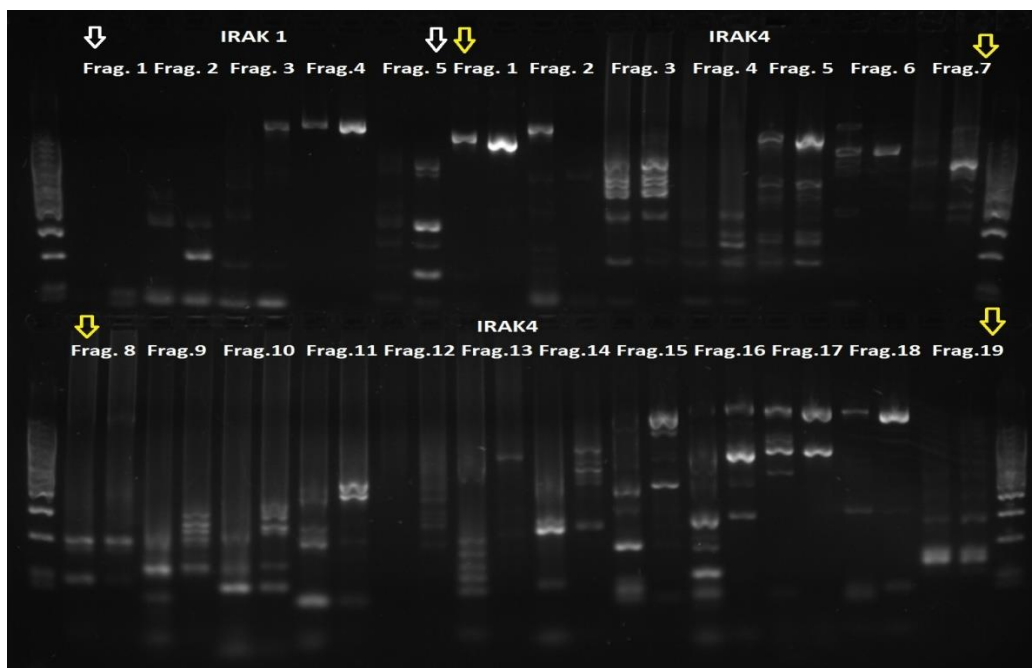
Obrázek 8: Elektroforéza fragmentů IRAK1 (1 – 5) a IRAK4 (1 – 19) při použití programů 58/56°C a 62/60°C



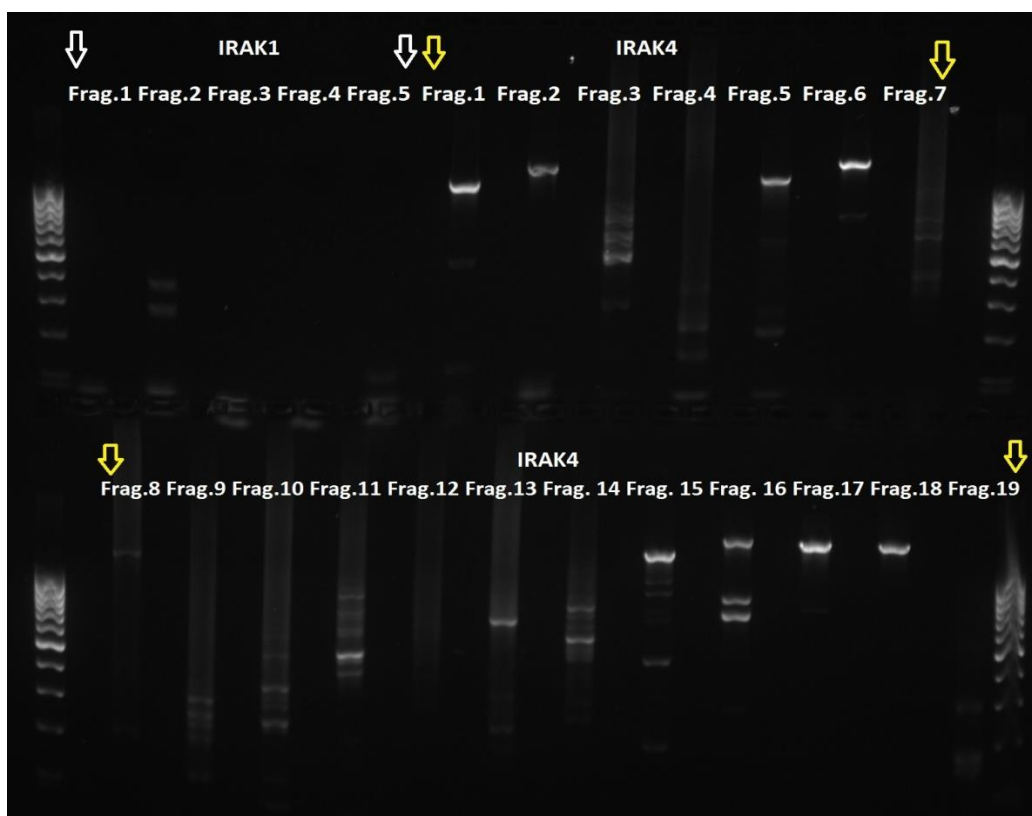
Obrázek 9: Elektroforéza fragmentů IRAK4 (19) a MAL (1 – 4) při použití programů 58/56°C a 62/60°C

Tento pokus o amplifikaci vybraných fragmentů nebyl příliš úspěšný. Pro gen IRAK1 se nepodařilo amplifikovat téměř žádný fragment. Pro gen IRAK4 se podařilo amplifikovat pouze fragment 1. U fragmentů 2, 6, 15 a 18 bylo pozorováno malé množství produktů. Nejlépe vyšel gen MAL, u kterého se podařilo amplifikovat všechny 4 fragmenty, přičemž u fragmentu 2 a 3 byly vedlejší produkty.

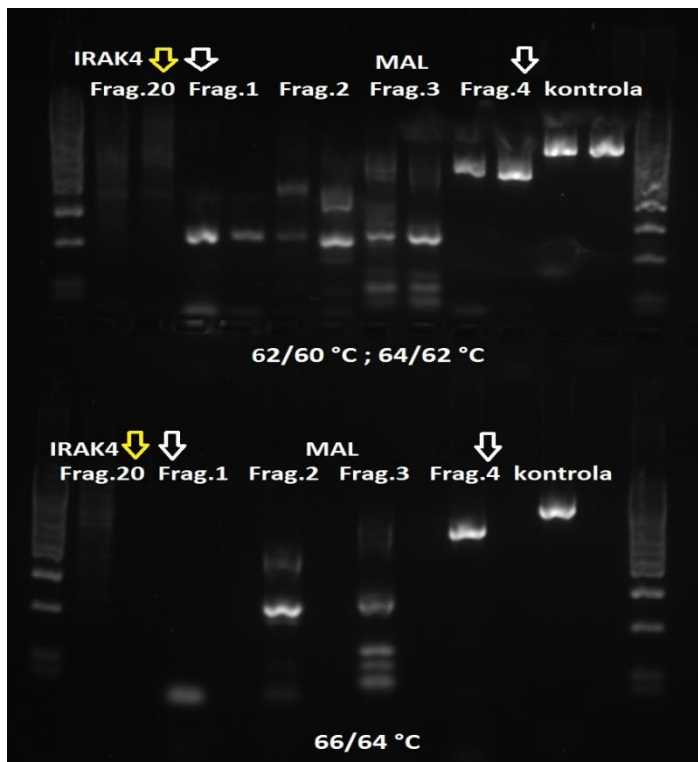
Pro všechny geny bylo celkem provedeno 6 optimalizací se střídáním PCR programů. Zůstalo se u použití Basic PCR Master Mixu od firmy Generi Biotech, neboť vykazoval lepší výtěžnost produktů a usnadňoval manipulaci a míchání reakcí pro velké množství vzorků. Poslední optimalizace byla provedena dne 27.11 2018, za použití programů 62/60 °C, 64/62 °C, 66/64 °C a Basic PCR Master Mixu.



Obrázek 10: Elektroforéza fragmentů IRAK1 a IRAK4 při použití programů 62/60°C a 64/62°C



Obrázek 11: Elektroforéza fragmentů IRAK1 (1 – 5) a IRAK4 (1 – 19) při použití programu 66/64°C



Obrázek 12: Elektroforéza fragmentů IRAK4 (19) a MAL (1-4) při použití programů 62/60°C, 64/62°C a 66/64 °C

Ne u všech fragmentů se, i přes opakované optimalizace, povedlo amplifikovat dostatečný výtěžek. Nejhorší výsledky vykazovaly fragmenty 1 a 2 u genu IRAK1. U genu IRAK4 se z neznámých důvodů nepodařilo ve větším množství namnožit fragmenty 4, 8, 9, 10,11 a 12. Oblasti exonů u genu MAL se podařilo amplifikovat všechny.

Z neúspěšnější amplifikace ze dne 27. 11. 2018 byly vybrány vzorky pro NGS sekvenování.

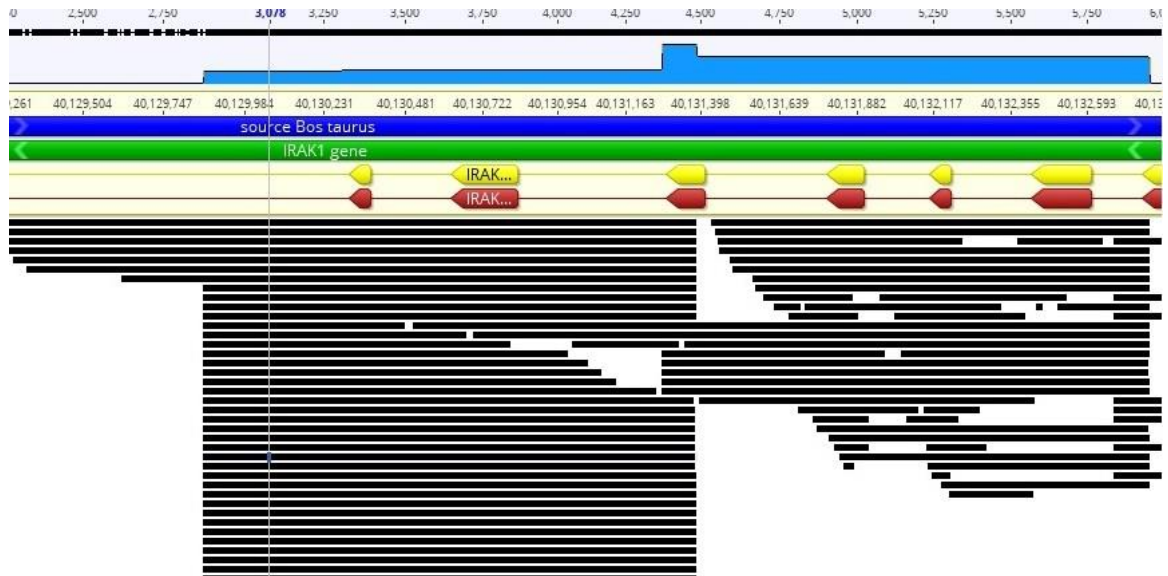
### 5.3 Výsledky NGS a identifikace genových variant

Výsledky sekvenování smíšeného vzorku ampliconů ze všech tří genů a celé populace býků byly zaslány z laboratoře Eurofins Genomics ve formátu FASTQ a současně FASTA. Za pomoci funkce mapování na referenční sekvenci v programu Geneious podle podobností sekvencí byly ready přiřazeny k odpovídajícím místům referenční sekvence jednotlivých genů.

Po použití algoritmu pro přiřazení přečtených sekvencí byla provedena manuální kontrola. Nejdříve byly odstraněny ready, které na první pohled jasně neodpovídaly

referenční sekvenci a byly chybně mapovány v důsledku omylu programu. Následně byla použita funkce nalezení sekvenčních variant na základě statistického vyhodnocení odlišných nukleotidů v mapovaných readech.

### 5.3.1 Identifikace variant a porovnání s databázovými údaji u genu IRAK1



Obrázek 13: Přiřazení readů k příslušné sekvenci genu IRAK1

Pro gen IRAK1 bylo nalezeno velké množství polymorfismů. Všechny polymorfismy byly analyzovány v prvním kroku podprogramem v Geneious. V druhém kroku bylo manuálně vyhledáno přesné místo polymorfismu a bylo podrobena vizuální kontrole, zda se nejedná pouze o charakteristickou chybu technologie PacBio.

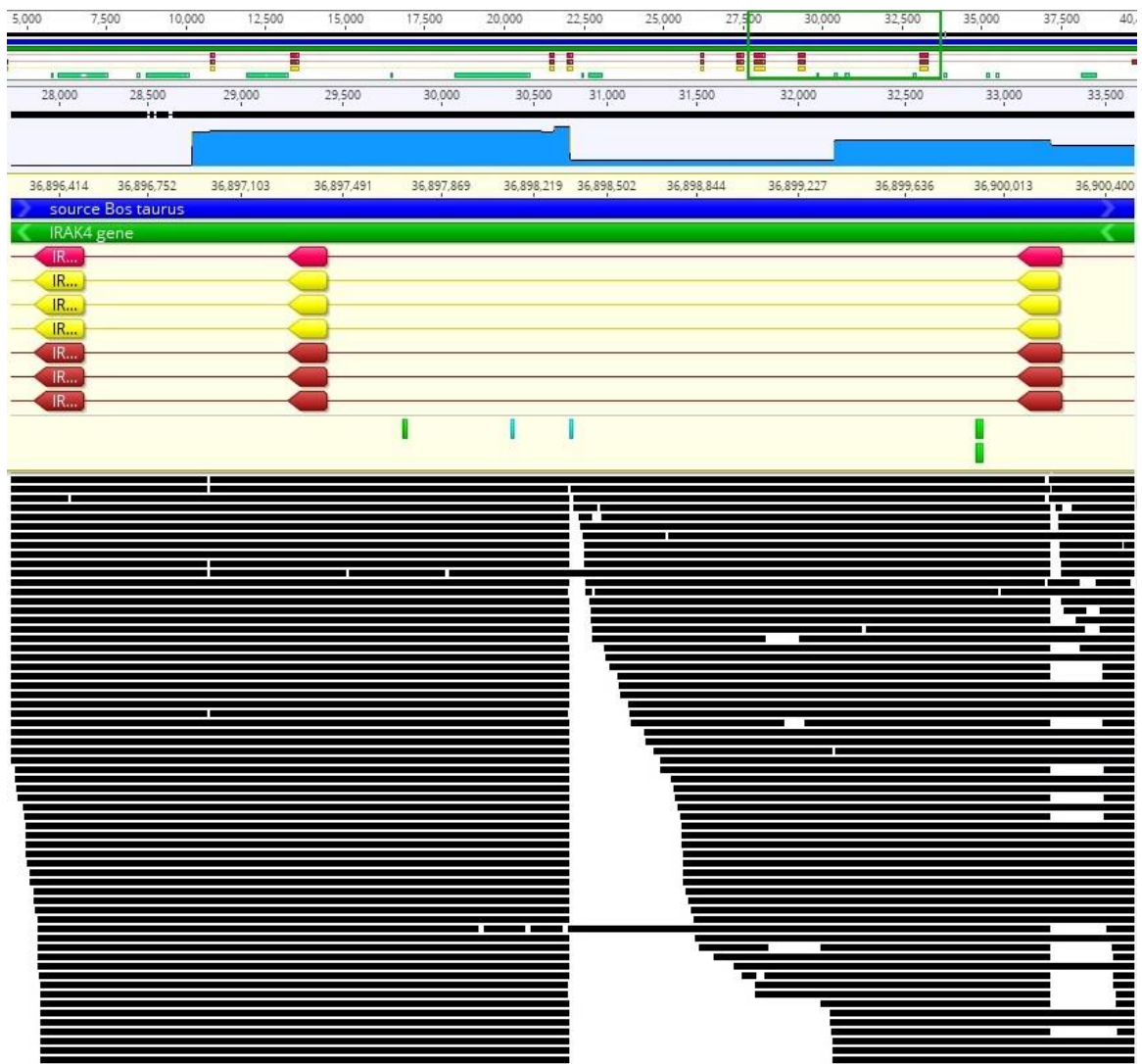
Poté, co byly polymorfismy podrobena vizuální kontrole, následoval krok porovnání objevených polymorfismů s polymorfismy zaznamenanými v databázi EBI (viz. Příloha 1). Pro gen IRAK1 bylo nalezeno 17 polymorfismů, které byly považovány za reálné, z nichž 6 bylo identifikováno v databázi. Ve všech případech se jednalo o bodovou mutaci (viz. Tabulka 7).

Červeně vyznačené řádky značí polymorfismy vyskytující se v exonech. Ostatní SNPs se nacházejí mimo kódující oblast.

Tabulka 8: Polymorfismy nalezené na genu IRAK1

Jméno	Typ	Poloha na ref. rekvenci genu	Poloha na chromosomu	Sekvence	Změna nukleotidu	Počet readů	Typ polymorfismu	Drekvence	Výskyt v databázi
Poly_1	<b>Polymorfismus</b>	2907	40,129,921	T	T -> G	341	SNP (transversion)	3.2%	shoda
Poly_2	<b>Polymorfismus</b>	3063	40,130,077	T	T -> C	345	SNP (transition)	1.2%	shoda
Poly_3	<b>Polymorfismus</b>	3075	40,130,089	C	C -> T	346	SNP (transition)	4.6%	
Poly_4	<b>Polymorfismus</b>	3200	40,130,214	A	A -> G	349	SNP (transition)	2.3%	
Poly_5	<b>Polymorfismus</b>	<b>3658</b>	<b>40,130,672</b>	<b>G</b>	<b>G -&gt; A</b>	<b>351</b>	<b>SNP (transition)</b>	<b>4.3%</b>	
Poly_6	<b>Polymorfismus</b>	3930	40,130,944	C	C -> T	349	SNP (transition)	2.6%	shoda
Poly_7	<b>Polymorfismus</b>	4157	40,131,171	G	G -> T	343	SNP (transversion)	2.3%	
Poly_8	<b>Polymorfismus</b>	4732	40,131,746	C	C -> T	714	SNP (transition)	1.7%	
Poly_9	<b>Polymorfismus</b>	5027	40,132,041	C	C -> G	711	SNP (transversion)	5.2%	shoda
Poly_10	<b>Polymorfismus</b>	<b>5131</b>	<b>40,132,145</b>	<b>A</b>	<b>A -&gt; G</b>	<b>714</b>	<b>SNP (transition)</b>	<b>1.3%</b>	
Poly_11	<b>Polymorfismus</b>	5192	40,132,206	G	G -> A	712	SNP (transition)	2.9%	
Poly_12	<b>Polymorfismus</b>	5198	40,132,212	G	G -> A	709	SNP (transition)	2.4%	
Poly_13	<b>Polymorfismus</b>	<b>5431</b>	<b>40,132,445</b>	<b>G</b>	<b>G -&gt; A</b>	<b>699</b>	<b>SNP (transition)</b>	<b>7.3%</b>	<b>shoda</b>
Poly_14	<b>Polymorfismus</b>	<b>5452</b>	<b>40,132,466</b>	<b>G</b>	<b>G -&gt; A</b>	<b>698</b>	<b>SNP (transition)</b>	<b>1.3%</b>	<b>shoda</b>
Poly_15	<b>Polymorfismus</b>	5624	40,132,638	C	C -> T	695	SNP (transition)	2.0%	
Poly_16	<b>Polymorfismus</b>	5691	40,132,705	G	G -> T	700	SNP (transversion)	1.9%	
Poly_17	<b>Polymorfismus</b>	5718	40,132,732	A	A -> G	698	SNP (transition)	1.3%	

### 5.3.2 Identifikace variant a porovnání s databázovými údaji genu IRAK4



Obrázek 14: Přiřazení readů k příslušné sekvenci genu IRAK4

Pro gen IRAK4 bylo nalezeno, stejně jako u IRAK1, velké množství polymorfismů. Všechny polymorfismy byly analyzovány v prvním kroku podprogramem Geneious pro hledání variant. V druhém kroku bylo manuálně vyhledáno přesné místo polymorfismu a bylo podrobena vizuální kontrole, zda se nejedná o charakteristickou chybu technologie PacBio.

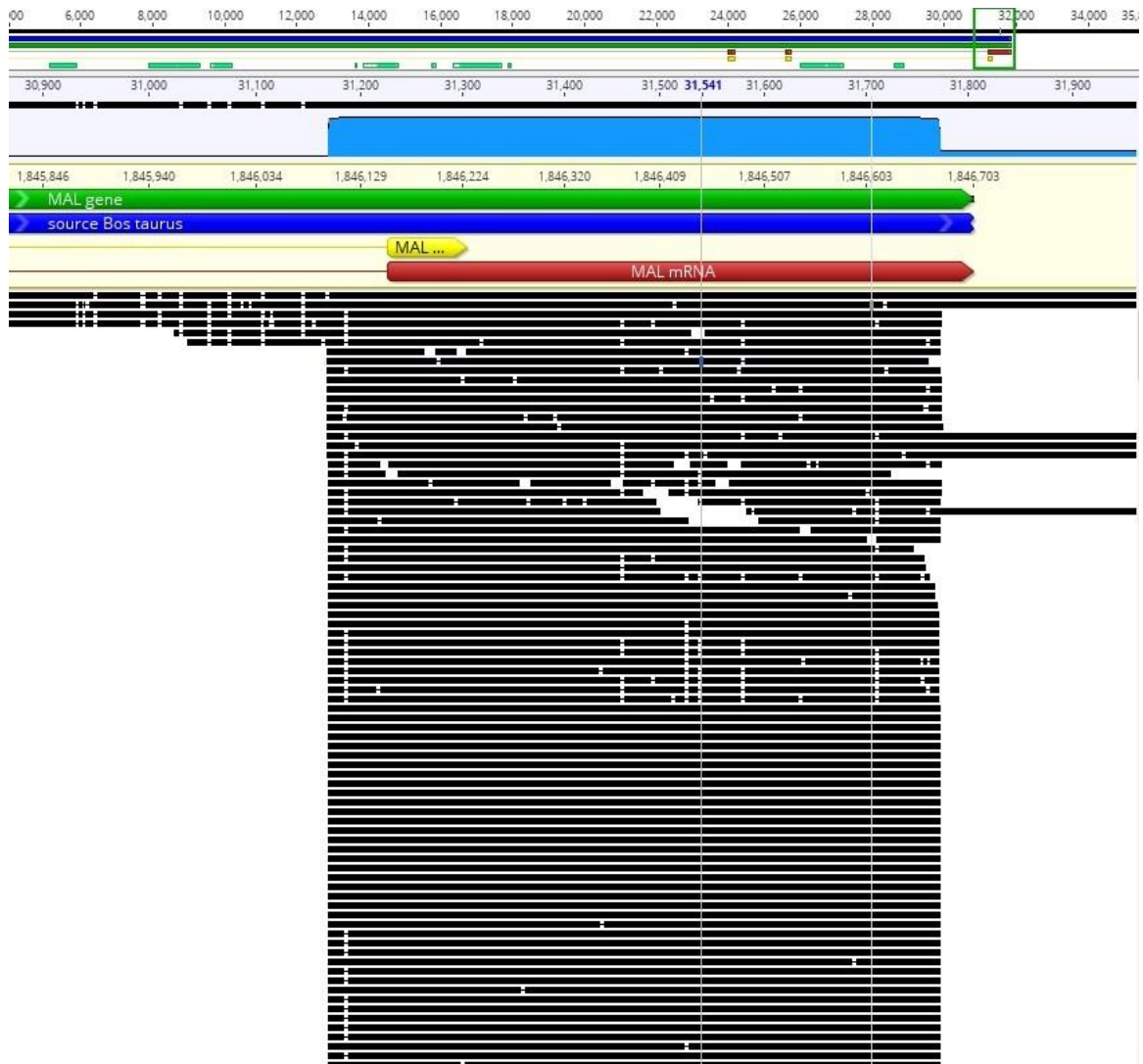
Poté, co byly polymorfismy podrobena vizuální kontrole, následoval krok porovnání objevených polymorfismů s polymorfismy zaznamenanými v databázi EBI (viz. Příloha 2). Pro gen IRAK4 bylo nalezeno 3 delece a 12 polymorfismů, přičemž u jednoho z nich se jednalo o polymorfismus tandemové repetice. Polymorfismy nacházející se v exonech jsou v tabulce 8 vyznačeny červenou barvou.



Tabulka 9: Polymorfismy nalezené na genu IRAK4

jméno	typ	poloha na ref. Sekvenci genu	poloha na chromosomu	sekvence	změna	krytí	typ polymorfismu	frekvence	existence v databázi
<b>Polym_1</b>	<b>Polymorphism</b>	<b>546</b>	<b>36,878,400</b>	<b>A</b>	<b>A -&gt; G</b>	<b>562</b>	<b>SNP (transition)</b>	<b>1.1%</b>	
<b>Polym_2</b>	<b>Polymorphism</b>	<b>861</b>	<b>36,878,715</b>	<b>C</b>	<b>C -&gt; T</b>	<b>568</b>	<b>SNP (transition)</b>	<b>24.1%</b>	<b>shoda</b>
<b>Polym_3</b>	<b>Polymorphism</b>	<b>925</b>	<b>36,878,779</b>	<b>G</b>	<b>G -&gt; A</b>	<b>567</b>	<b>SNP (transition)</b>	<b>1.1%</b>	
<b>Polym_4</b>	<b>Polymorphism</b>	<b>988</b>	<b>36,878,842</b>	<b>A</b>	<b>A -&gt; G</b>	<b>571</b>	<b>SNP (transition)</b>	<b>1.1%</b>	
Polym_5	Polymorphism	1,847	36,879,701	A	A -> C	1,652	SNP (transversion)	7.7%	shoda
Polym_6	Polymorphism	2,264	36,880,118	A	A -> G	1,622	SNP (transition)	37.9%	shoda
<b>junction_3</b>	<b>Junction</b>	<b>2,389</b>	<b>36,880,243</b>	<b>TA</b>	<b>deletion size - 3</b>				
<b>junction_4</b>	<b>Junction</b>	<b>2,404</b>	<b>36,880,258</b>	<b>CC</b>	<b>deletion size - 3</b>				<b>shoda</b>
<b>Polym_7</b>	<b>Polymorfismus</b>	<b>2,402</b>	<b>36,880,256</b>	<b>T</b>	<b>T -&gt; G</b>	<b>1,607</b>	<b>SNP (transversion)</b>	<b>20.1%</b>	<b>shoda</b>
Polym_8	Polymorphism	2,452	36,880,306	G	G -> A	1,597	SNP (transition)	2.6%	
Polym_9	Polymorphism	2,472	36,880,326	AC	(AC)7 -> (AC)6	1,595	Deletion (tandem repeat)	86.5%	
Polym_10	Polymorphism	8,631	36,886,485	G	G -> A	110	SNP (transition)	1.8%	
Polym_11	Polymorphism	23,667	36,901,521	T	T -> C	2,733	SNP (transition)	18.1%	shoda
junction_26	Junction	23,692	36,901,546	GG	deletion size - 4				shoda
Polym_12	Polymorphism	23,796	36,901,650	G	G -> A	2,746	SNP (transition)	26.8%	shoda

### 5.3.3 Identifikace variant a porovnání s databázovými údaji genu MAL



Obrázek 15: Přiřazení readů k příslušné sekvenci genu IRAK4

Na rozdíl od genu IRAK1 a IRAK4 byly pro gen MAL nalezeno malé množství polymorfismů, převážně z důvodu amplifikace pouze exonových úseků. Všechny polymorfismy byly analyzovány podprogramem Genesious a následně podrobeny vizuální kontrole. Po provedení kontrol a vyřazení chybných polymorfismů zbyly pouze 2 polymorfismy, které se zdály jako reálné.

Prvním polymorfismem byl SNP (tranzice) na pozici 1.846.145 na chromosomu 11. Jednalo se o záměnu C -> T s frekvencí 39,4 % (864 čtení), který se nacházel mimo exon.

Druhým polymorfismem byl SNP (transverze) na pozici 1.846.435 na chromosomu 11.

Jednalo se o záměnu C -> G s frekvencí 55,7 % (870 čtení), který se nacházel na exonu.

#### 5.4 Návrh sady genotypovacích reakcí pro nalezené varianty a jejich ověření

Na základě frekvence a poloze na chromosomu bylo vybráno 18 kandidátních polymorfismů pro genotypovací reakce. Pro každý polymorfismus byl v programu Geneious vybrán přímý a zpětný primer, tak aby ležely z obou stran těsně za variabilním nukleotidem. Délka se nastavila na 30 nukleotidů a následně se upravovala tak, aby vyšel optimální poměr GC. Všechny primery musely být otestovány na autokomplementaritu.

Na základě těchto informací byl vybrán jeden z dvojice primerů. Jestliže se jednalo o reverzní primer, musel být primer převeden v programu Bioedit na reverzní komplement.

Na 5' konec extenzního primeru byl přidán polyT úsek, který umožnil určovat více produktů v jednom vzorku při dělení v kapiláře na sekvenátoru.

Primery byly rozděleny do 3 multiplexů po šesti primerech, přičemž se sledovalo, aby se jednotlivé primery nepřekrývaly, což by znemožnilo správné provedení reakce. Seřazení primerů do jednotlivých multiplexů je zobrazeno v tabulce 10.

Tabulka 10: Přehled délky a polohy fragmentů určených pro genotypování

fragment	Sada primerů	Poloha na referenční sekvenci	Počet nukleotidů
IK1_fr3	IK1-3FR	2846-4374	1528
IK1_fr4	IK1-4FR	4263-5776	1513
IK4_fr1	IK4-1FR	72-1233	1161
IK4_fr2	IK4-2FR	889-2527	1638
IK4_fr18	IK4-18FR	23152-24820	1668
MAL_fr4	MAL-4FR	23791-24366	575

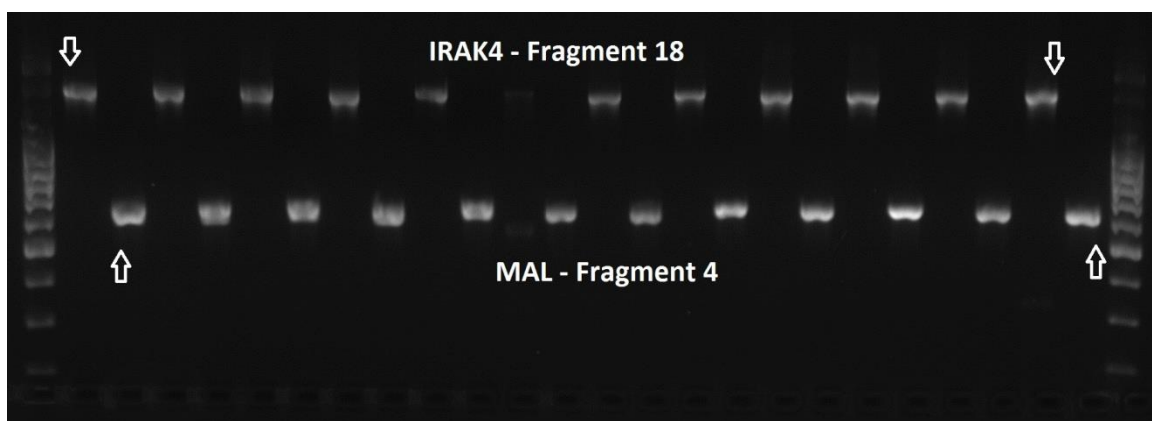
Tabulka 11: Rozdělení extenzních primerů do multiplexů

Gen	PCR fragment	Poloha a typ polymorfismu	označení extenzivního primeru	Extenzní primer - sekvence 5'→3'	počet nukleotidů	složka multiplexu
Mal	Mal_fr	614C>T	M435R	GAGTGGCTACATACGAAAACACCTGC	26	A1
Mal	Mal_fr	425C>G	M425R	GTTAGTCCTCAATCCCCACCCCACTGCCCC	30	A2
IRAK1	IK1_fr3	2907T>G	I907R	TCCTCCGTGGACTGACCCAGAGCCAAAATCCAG	34	A3
IRAK1	IK1_fr3	3063T>C	I063F	(T12)CTGTTTTCCACTGTGATTGGGCCGCACC	40	A4
IRAK1	IK1_fr3	3658G>A	I658F	(T15)GGTGTCTACGGCCAGCCTCCCGGTCTTCAC	45	A5
IRAK1	IK1_fr3	3900C>T	I900F	T(23)GAGACAATCAGACCGGAGCCACTGACG	50	A6
IRAK1	IK1_fr4	5027C>G	I027F	TCGCCTGGGCCTGGCAGGCTGCAGAC	26	B1
IRAK1	IK1_fr4	5431G>A	I431F	GACCTCCTTGAGCCTCTTCACAGCATAGAC	30	B2
IRAK1	IK1_fr4	5452G>A	I452F	(T6)GCATAGACGGTGTTCCTCATCACCGCCCG	35	B3
IRAK4	IK4_fr1	861C>T	861R	T(10)TCTTACAGTAATCCCTGAGATATCTCTCTCG	40	B4
IRAK4	IK4_fr2	1847A>C	I847R	T(19)TAGAGCAGTGTGCTTGTGCAGAGAGG	45	B5
IRAK4	IK4_fr2	2400del-3	I400F	T(20)CGACTGAAGCGACTTAGCAGCAGCAGCAGC	50	B6
IRAK4	IK4_fr2	2385del-3	I385R	ACCTGGGTAATCCAGGATGCTGCTGC	26	C1
IRAK4	IK4_fr2	2264A>G	I264R	T(4)TGGAGTGGGTTGCCATGTCCTTCTCC	30	C2
IRAK4	IK4_fr2	2402T>G	I402R	T(6)GGATTTAAGGCCTACCTGGGTAATCCAGG	35	C3
IRAK4	IK4_fr18	23657T>C	I657F	T(16)CTAATTACTAGCATACCCAGAAA	40	C4
IRAK4	IK4_fr18	23687del-4	I687R	T(24)TATAAGTCACCTAGCATGGGC	45	C5
IRAK4	IK4_fr18	23796G>A	I796R	T(28)TGAATTTGGAGTCAGACATGGG	50	C6

Pro ověření genotypovacích reakcí byly nejprve použity PCR produkty, které se nespotřebovaly při odebrání vzorků pro NGS sekvenování. Reakční směs o objemu 10  $\mu$ L se skládala z 5  $\mu$ L reakční směsi SNaPshot od firmy Life Technologie, 3  $\mu$ L PCR produktu a 2  $\mu$ L směsi extenzivních primerů o koncentraci 0,01  $\mu$ M. Testovány byly všechny multiplexy (A1 – A6, B1 – B6 a C1 – C6).

První ověření genotypovacích reakcí bylo neúspěšné, po analyzování dat ze sekvenátoru nebyly nalezeny žádné peaky. Zřejmě tedy nedošlo ani k nasednutí extenzivních primerů.

Pro druhý pokus ověření byly znovu pomocí PCR generovány fragmenty potřebné pro genotypovací reakce, konkrétně fragmenty 3 a 4 z genu IRAK1, fragmenty 1, 2 a 18 z genu IRAK4 a čtvrtý fragmentu z genu MAL (viz. Tabulka 9).

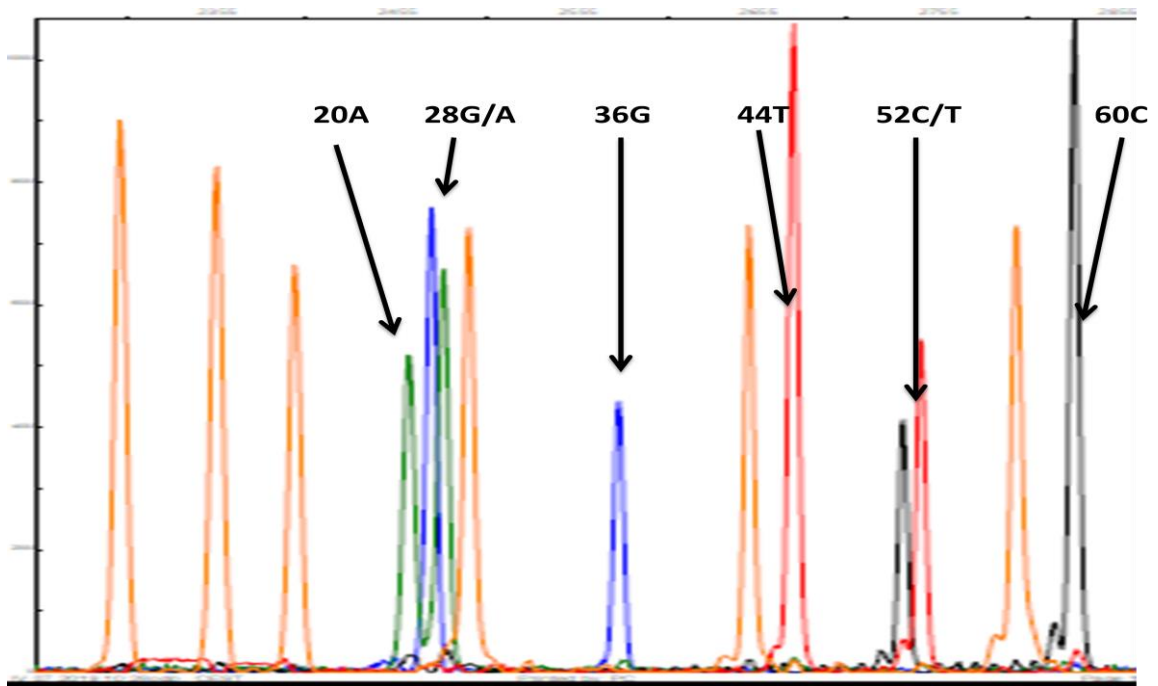


Obrázek 16: Příklad amplifikace fragmentu 18 z genu IRAK4 a fragmentu 4 z genu MAL při PCR programu 66/64 °C

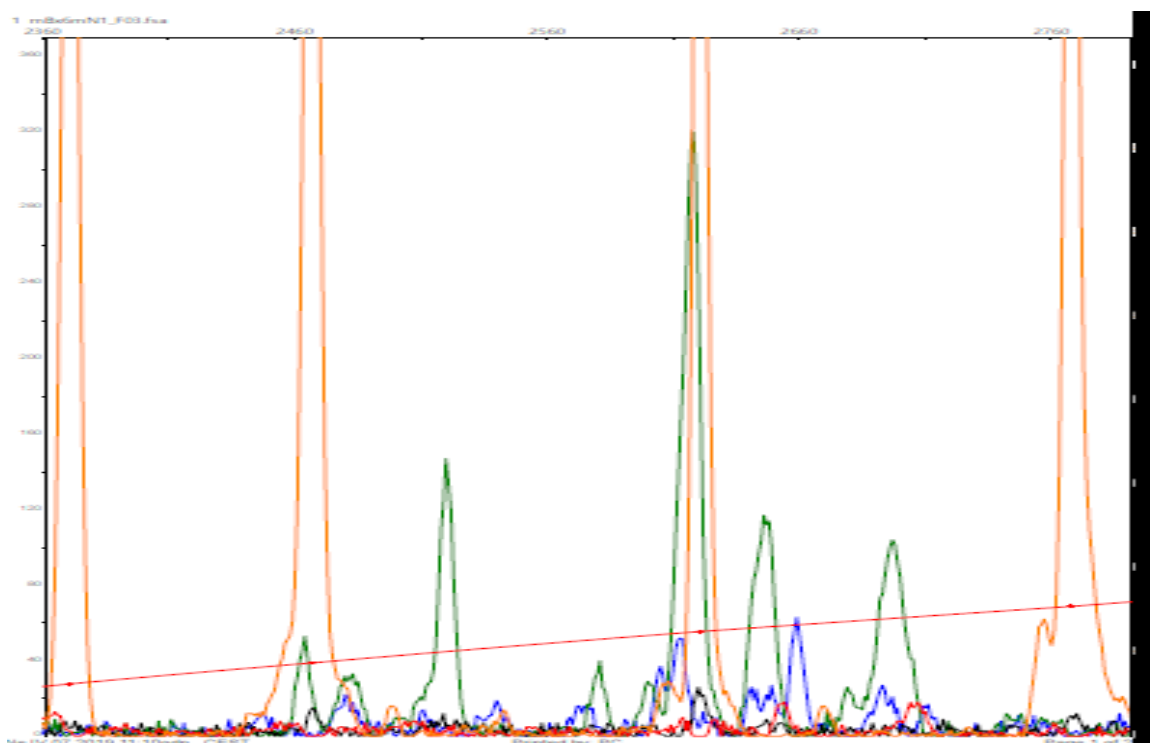
Reakční směs pro druhý pokus o objemu 10  $\mu$ L se skládala ze 3  $\mu$ L přečištěné směsi amplifikačních fragmentů (prvních 12 bývá určených ke genotypování), 5  $\mu$ L reakční směsi SNaPshot od firmy Life Technologie a 2  $\mu$ L směsi extenzivních primerů o zvýšené koncentraci 0,1  $\mu$ M.

Výsledky z druhého pokusu opět nebyly optimální a ověření muselo být provedeno znovu.

Pro třetí pokus ověření byla u směsi extenzivních primerů zvýšena koncentrace na 1  $\mu$ M. Tento krok již vedl k prvním pozitivním genotypovacím reakcím, konkrétně pro fragment 4 genu IRAK1, fragmenty 1 a 18 genu IRAK4 a pro čtvrtý fragment genu MAL. Tento pokus již obsahoval očekávané výsledky (viz. Obrázek 18).



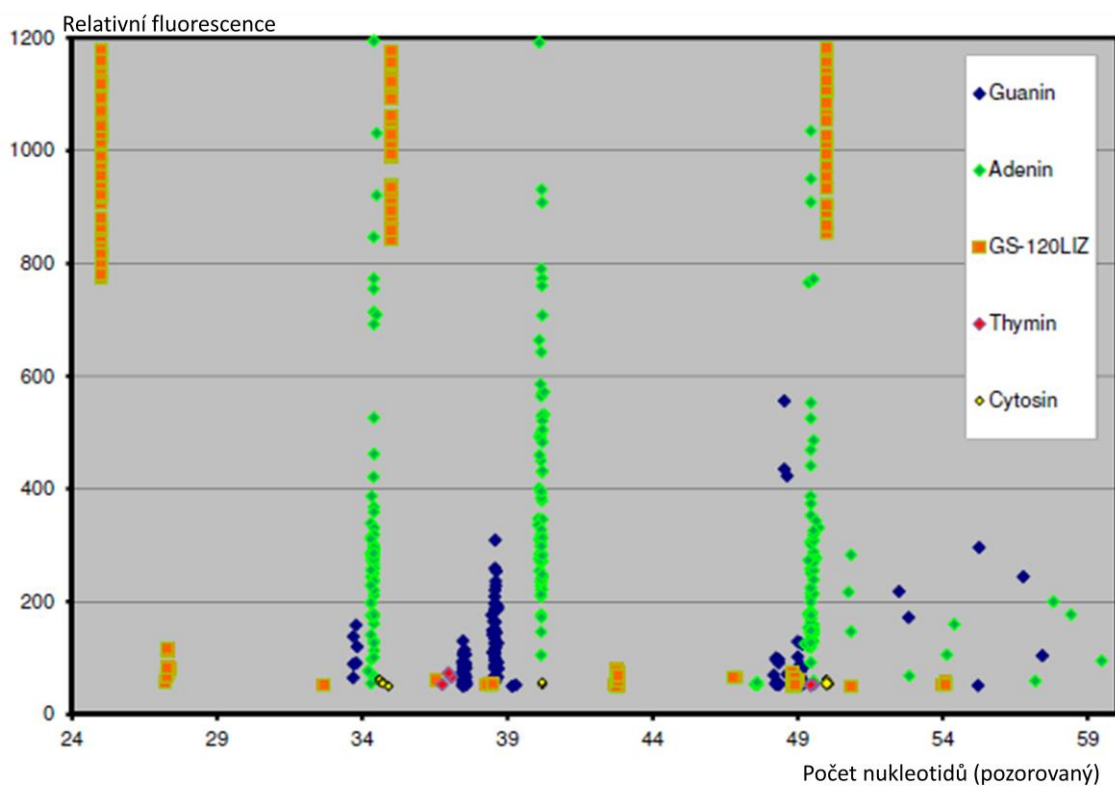
Obrázek 17: Kontrolní reakce (pozitivní kontrola) s templátem a primery od provozovatele sekvenování Applied Biosystems. Reakce jsou ve shodě s předepsaným rozdělení polohy a druhu peaků.



Obrázek 18: Třetí pokus ověření genotypovacích reakcí pro multiplex B (B1 – B6)

## 5.5 Určení genotypů ve vybraných genech přirozené imunity u modelové skupiny zvířat.

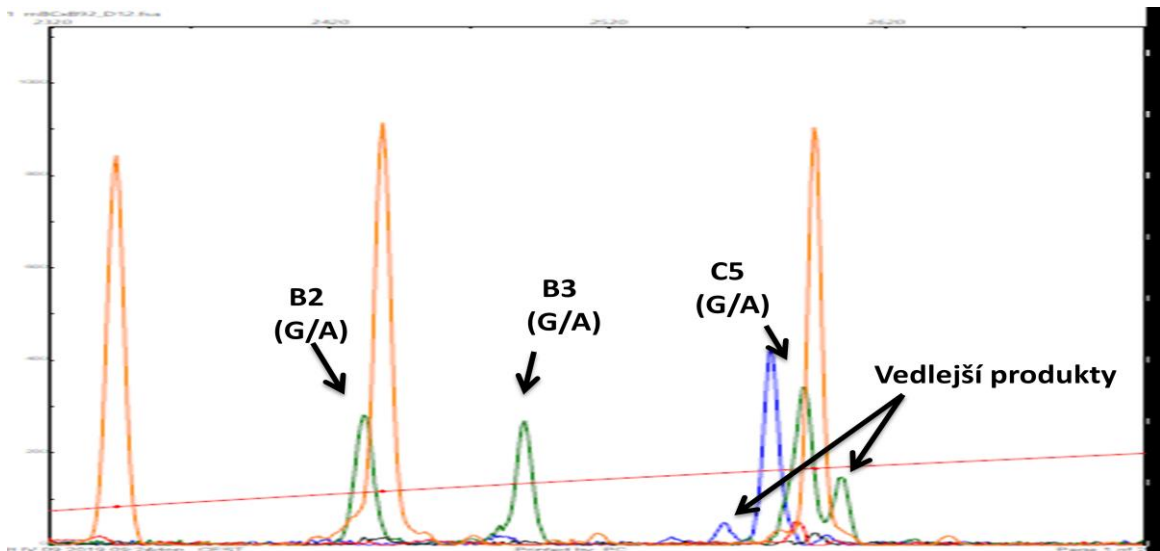
Pro genotypovací reakce bylo použito 96 býků z populace ČESTR. Na základě výsledků testování primerů byl pro lepší využití reakčních směsí složen nový multiplex, který se skládá ze složek B1 – B4 a C5 – C6. Směs pro jednu genotypovací reakci se skládala z 5  $\mu\text{L}$  reakční směsi SNaPshot od firmy Life Technologie, 3  $\mu\text{L}$  PCR produktu (fragment 4 pro gen IRAK1 a fragmenty 1 a 18 pro gen IRAK4) a 2  $\mu\text{L}$  směsi extenzních primerů (B1-B4 a C5 – C6) o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ .



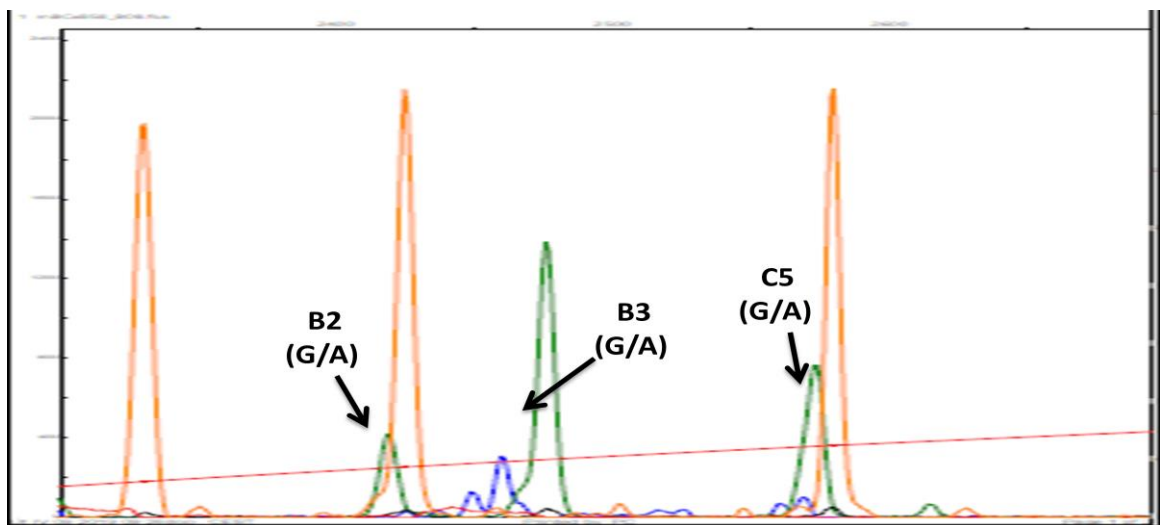
Obrázek 19: Distribuce produktů z reakcí složeného multiplexu B (1 – 4) + C(5, 6) u souboru 96 býků podle určené hmotnosti a intenzity peaků

Z neznámých důvodů se nezdařila reakce u složek B1, B4 a C6 multiplexu, i když B4 a C6 byly vybrány právě z důvodu funkčnosti v předchozím ověřování reakcí. Na obrázku 19 je vyobrazena distribuce celého multiplexu všech 96 býků. Tři zelené peaky (A), tedy složky B2, B3 a C5 odpovídají příslušným polymorfismům, pro které byly extenzní primery vytvořeny. Genotypování bylo úspěšné alespoň pro polovinu

polymorfismů. Výsledek dělení reakčních produktů na jedné kapiláře je zobrazen na obrázcích 20 a 21.



Obrázek 20: Výsledek genotypování jedince, který je homozygotní pro složky multiplexu B2, B3 a heterozygotní pro složku C5.



Obrázek 21: Výsledek genotypování jedince, který je homozygotní pro složky multiplexu B2 s C5 a heterozygotní pro složku B3.

Výsledky genotypování souboru býků na tři polymorfismy, značené v multiplexech reakcí B2, B3 a C5, jsou uvedeny v tabulce 11. Vzhledem k částečné úspěšnosti reakcí jsou uvedeny výsledky pro 67 zvířat, namísto celého souboru 96. Obtížně interpretovatelné výsledky reakcí SNaPshot vyřazuje již program PeakScanner při vstupní kontrole.



Výsledky dovolily určit homozygotnost i heterozygotnost býků pro jednotlivé SNP, určit alelické frekvence a soulad s distribucí genotypů podle Hardyho-Weinberga. H-W rovnováha byla narušena pouze pro SNP B3. I přes malý stupeň ověření a optimalizace reakcí, což může vést ke zkreslení výsledků, nebyla H-W rovnováha (s výjimkou B3) pro sledované SNP narušena.

I když jsou býci v souboru uvedeni pod pořadovými čísly, jedná se o konkrétní jedince s konkrétními fenotypovými daty, což dovoluje přistoupit k asociační studii, která může ověřit vliv polymorfismu ve sledovaných genech na užitkové a zdravotní znaky.

Tabulka 12: Genotypování býků

Číslo býka	Reakce SNaPshot					
	B2 (G>A)		B3 (G>A)		C5 (T>C)	
<u>1</u>		A	G	A	C	T
<u>2</u>		A	G	A	C	T
<u>3</u>		A		A	C	T
<u>5</u>		A		A		T
<u>6</u>		A	G	A		T
<u>7</u>		A		A		T
<u>8</u>		A		A	C	T
<u>9</u>		A	G	A		T
<u>10</u>		A	G	A		T
<u>11</u>	G	A	G	A		T
<u>13</u>		A	G	A		T
<u>15</u>	G	A	G	A		T
<u>17</u>		A	G	A		T
<u>18</u>		A	G	A		T
<u>19</u>		A	G	A		T
<u>20</u>	G	A	G	A		T
<u>21</u>		A	G	A		T
<u>22</u>		A	G	A		T
<u>24</u>	G	A		A		T
<u>25</u>		A	G	A		T
<u>27</u>		A	G	A		T
<u>28</u>		A	G	A		T
<u>29</u>		A	G	A		T
<u>33</u>		A	G	A	C	T
<u>34</u>		A	G	A		T
<u>35</u>		A	G	A		T
<u>36</u>		A	G	A		T

<u>38</u>		A	G	A		T
<u>41</u>		A	G	A	C	T
<u>42</u>		A	G	A		T
<u>43</u>		A	G	A		T
<u>44</u>		A	G	A		T
<u>46</u>		A	G	A		T
<u>48</u>		A	G	A		T
<u>49</u>		A	G	A		T
<u>50</u>			G	A	C	T
<u>51</u>			G	A		T
<u>53</u>			G	A		T
<u>54</u>		A	G	A		T
<u>55</u>		A	G	A		T
<u>57</u>		A	G	A		T
<u>58</u>		A	G	A	C	T
<u>59</u>		A	G	A		T
<u>60</u>		A	G	A		T
<u>61</u>			G	A		T
<u>62</u>		A	G	A		T
<u>65</u>		A		A	C	T
<u>68</u>		A		A		T
<u>69</u>		A		A	C	T
<u>72</u>		A		A	C	T
<u>73</u>		A		A		T
<u>74</u>		A		A		T
<u>76</u>		A		A		T
<u>77</u>				A		T
<u>78</u>		A		A		T
<u>79</u>		A		A		T
<u>81</u>	G	A		A		T
<u>82</u>		A		A		T
<u>83</u>		A		A		T
<u>84</u>		A		A	C	T
<u>85</u>		A		A		T
<u>86</u>		A		A		T
<u>89</u>	G	A		A	C	T
<u>90</u>				A		T
<u>91</u>				A		T
<u>92</u>		A		A	C	T
<u>95</u>		A		A		T

## **5.6 Předpověď funkčních změn v důsledku nalezených mutací.**

Kandidátní polymorfismy vybrané z výsledků NGS sekvenování byly vloženy do tabulek 12 a 13. Nejprve k nim byly přiřazeny funkční změny, které byly uvedeny v databázi EBI (European Bioinformatics Institute). V případě, že zde byl exportován údaj o funkční charakteristice daného polymorfismu, byl tento údaj poznamenán do tabulky funkčních změn. Další předpovědi funkčních změn byly získány po zadání souboru polymorfismů do programu Variant Effect Predictor na serveru [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org).

Tabulka 13: Funkční změny polymorfismů genu IRAK4

jméno	poloha na chromosomu 5	změna	frekvence	existence v databázi EBI	consequenceTypes z databáze EBI	kódující funkce	Consequence type z VEP	IMPACT	EXON	INTRON	cDNA position	Novost polymorfismu
Polym_1	36,878,400	A -> G	1.1%	ne		exon	3_prime UTR variant	MODIFIER	12_12	-	2198	nový
Polym_2	36,878,715	C -> T	24.1%	ano	3_prime_UTR variant	exon	3_prime UTR variant	MODIFIER	12_12	-	1883	Rs379546685
Polym_3	36,878,779	G -> A	1.1%	ne		exon	3_prime UTR variant	MODIFIER	12_12	-	1819	nový
Polym_4	36,878,842	A -> G	1.1%	ne		exon	3_prime UTR variant	MODIFIER	12_12	-	1756	nový
Polym_5	36,879,701	A -> C	7.7%	ano	intron_variant	intron	intron variant	MODIFIER	-	10_11	-	Rs382209396
Polym_6	36,880,118	A -> G	37.9%	ano	intron_variant	intron	Intron variant	MODIFIER	-	10_11	-	Rs385218628
deletion_3	36,880,243	deletion size - 3		ne		exon	Intron variant	MODIFIER	-	10_11	-	nový
deletion_4	36,880,258	deletion size - 3		ne		exon	Intron variant	MODIFIER	-	10_11	-	nový
Polym_7	36,880,256	T -> G	20.1%	ano	intron_variant	exon	Intron variant	MODIFIER	-	10_11	-	Rs209992951
Polym_8	36,880,306	G -> A	2.6%	ne		intron	Intron variant	MODIFIER	-	10_11	-	Rs721604696
Polym_9	36,880,326	(AC)7 -> (AC)6	86.5%	ne		intron	Intron variant	MODIFIER	-	10_11	-	nový
Polym_10	36,886,485	G -> A	1.8%	ne		intron	Intron variant	MODIFIER	-	8_11	-	nový
Polym_11	36,901,521	T -> C	18.1%	ano	intron_variant	intron	Intron variant	MODIFIER	-	1_11	-	Rs132981883
deletion_2_6	36,901,546	deletion size - 4		ano	intron_variant	intron	Intron variant	MODIFIER	-	1_11	-	Rs380202447
Polym_12	36,901,650	G -> A	26.8%	ano	intron_variant	intron	Intron variant	MODIFIER	-	1_11	-	Rs385762758

Tabulka 14: Funkční změny genu IRAK1

jméno	poloha na chromosomu X	změna	frekvence	Consequence Types z databáze EBI	kódující funkce podle UMD 3.1.1	Consequence	IMPACT	EXON	INTRON	cDNA position	CDS position	Protein position	Aminoacids	Codons	Novost Polymorfismu
Poly_1	40,129,921	T -> G	3.2%	intron variant	intron	intron variant	MODIFIER	-	10_13	-	-	-	-	-	Rs 134381860
Poly_2	40,130,077	T -> C	1.2%	intron variant	intron	intron variant	MODIFIER	-	10_13	-	-	-	-	-	Rs 209170931
Poly_3	40,130,089	C -> T	4.6%	nenalezeno	intron	intron variant	MODIFIER	-	10_13	-	-	-	-	-	nový
Poly_4	40,130,214	A -> G	2.3%	nenalezeno	intron	intron variant	MODIFIER	-	10_13	-	-	-	-	-	nový
Poly_5	40,130,672	G -> A	4.3%	nenalezeno	exon	synonymous variant	LOW	9_14	-	1198	1185	395	Tyr395Tyr	taC_taT	nový
Poly_6	40,130,944	C -> T	2.6%	intron variant	intron	intron variant	MODIFIER	-	8_13	-	-	-	-	-	Rs 110533802
Poly_7	40,131,171	G -> T	2.3%	nenalezeno	intron	intron variant	MODIFIER	-	8_13	-	-	-	-	-	nový
Poly_8	40,131,746	C -> T	1.7%	nenalezeno	intron	intron variant	MODIFIER	-	7_13	-	-	-	-	-	nový
Poly_9	40,132,041	C -> G	5.2%	intron variant	intron	intron variant	MODIFIER	-	6_13	-	-	-	-	-	Rs 210710958
Poly_10	40,132,145	A -> G	1.3%	nenalezeno	exon	missense variant	MODERATE	6_14	-	768	755	252	Val252Ala	gTg_gCg	nový
Poly_11	40,132,206	G -> A	2.9%	nenalezeno	intron	intron variant	MODIFIER	-	5_13	-	-	-	-	-	nový
Poly_12	40,132,212	G -> A	2.4%	nenalezeno	intron	intron variant	MODIFIER	-	5_13	-	-	-	-	-	nový
Poly_13	40,132,445	G -> A	7.3%	synonymous variant	exon	synonymous variant	LOW	5_14	-	715	702	234	Thr234Thr	acC_acT	Rs 211379365
Poly_14	40,132,466	G -> A	1.3%	nenalezeno	exon	synonymous variant	LOW	5_14	-	694	681	227	Tyr227Tyr	taC_taT	nový
Poly_15	40,132,638	C -> T	2.0%	nenalezeno	intron	intron variant	MODIFIER	-	4_13	-	-	-	-	-	nový
Poly_16	40,132,705	G -> T	1.9%	nenalezeno	intron	intron variant	MODIFIER	-	4_13	-	-	-	-	-	nový
Poly_17	40,132,732	A -> G	1.3%	nenalezeno	intron	intron variant	MODIFIER	-	4_13	-	-	-	-	-	nový

Pro gen IRAK4 nebyly nalezeny žádné polymorfismy, které by mohly způsobovat funkční změny aminokyselin. Polymorfismy Polym\_1 až Polym\_4 se nacházejí v exonech, ale 3' UTR oblasti, tudíž se nedají očekávat závažné funkční změny. I poměrně větší zásahy do sekvence genu jako tři nalezené delece nejsou podle programu VEP spojeny se změnou funkce genového produktu vzhledem k přisuzované intronové lokalizaci. Podle referenční sekvence (editace bovinního genomu UMD 3.1.1) se deletion\_3, deletion\_4 a polym\_7 nachází na exonu, avšak podle databází se jedná o polymorfismy nacházející se v intronech. V tomto případě se bralo v potaz, že informace v databázích budou aktuálnější oproti editaci bovinního genomu UMD 3.1.1. Zejména se jedná o databázi ENSEMBL, která přešla na nejnovější verzi bovinního genomu ARS\_UCD1.2, zveřejněnou v r. 2018. Proto byly tyto mutace vyhodnoceny jako polymorfismy v intronech, i když v důsledku dalšího zpřesňování transkriptů a hranic exonů mohou být opět považovány za kódující. Ostatní polymorfismy byly jednoznačně vyhodnoceny jako intronové varianty, u kterých se předpokládá, že budou mít minimální vliv na funkční znaky proteinů.

Pro gen IRAK1 byly nalezeny čtyři polymorfismy, které se nachází v exonech. Tři z nich (Poly\_5, Poly\_13 a Poly\_14) byly shledány dle databází a programu VEP jako synonymní mutace. V případě poly\_10 se jedná o missense polymorfismus A -> G, který mění 252 aminokyselinu valin na alanin. Ostatní polymorfismy byly vyhodnoceny jako intronové varianty.

Gen Mal obsahoval dva polymorfismy, které by případně mohly vést ke změnám aminokyselin. Po vyhodnocení těchto SNP se došlo k závěru, že polymorfismus C -> T nacházející se na souřadnicích 1 846 145 na chromosomu 11 s frekvencí 39,4 % je SNP v intronu, identifikován jako polymorfismus rs378642920. Polymorfismus C -> G na souřadnicích 1 846 435 na chromosomu 11 s frekvencí 55,7 % je polymorfismus 3' UTR oblasti, identifikován jako polymorfismus rs43652348. Funkční efekt u obou těchto mutací je tedy odhadován jako nízký, až zanedbatelný.

## 6. Diskuze

### 6.1 Rekapitulace

Práce se zaměřila na diverzitu ve dvou člancích dráhy přenosu signálu od antibakteriálních Toll-like receptorů k buněčné imunitní odpovědi (IRAK1, IRAK4) v současné produkční populaci českého strakatého skotu. Výběr byl doplněn genem z jiné oblasti imunity, genem MAL, který kontroluje vývoj T buněk a podílí se na vnímavosti k bakteriálním toxinům. Vzhledem ke konzervovanosti Toll-dráhy se předpokládala u genu MAL významná diverzita. Společným důvodem pro výběr těchto tří bílkovin a odpovídajících genů byla jejich minimální prostudovanost u skotu, zejména ve vztahu k infekční rezistenci, která je významná pro šlechtitelské programy.

### 6.2 Amplifikace fragmentů genů

Amplifikace fragmentů genů studovaných genů se velmi lišila v úspěšnosti a výtěžnosti produktů. Zatímco u některých amplikonů by se dvojice primerů a program PCR dal označit za naprosto spolehlivý, u jiných amplikonů syntéza produktů téměř vůbec neprobíhala. Fragменты 1 a 2 u genu IRAK1 se amplifikovaly pouze výjimečně, avšak fragmenty 3 a 4 vykazovaly vysoké množství produktů převážně při programu 64/62 °C a u fragmentu 5 se tvořily vedlejší produkty.

U genu IRAK4 se spolehlivě amplifikovaly fragmenty 1, 2, 5, 6, 15 – 18, na rozdíl od zbylých fragmentů, kde se, i přes opakované optimalizace, buď tvořily produkty málo, nebo byly přítomny i vedlejší produkty.

V případě genu MAL se podařilo spolehlivě amplifikovat všechny fragmenty.

Zajímavou skutečností je, že u genu IRAK4 byla nefunkční série pěti po sobě jdoucích fragmentů, které vykazovaly i stejné chyby. Tedy větší množství vedlejších produktů (žádný pruh neodpovídal správnému amplikonu) a šum v celé délce cesty v agarózovém gelu. Chyba byla nejprve odhadována na kontaminaci H<sub>2</sub>O, ale ani opětovné ředění primerů problém nevyřešilo.

Nižší úspěšnost návrhu PCR reakcí nutí uvažovat o specifických překážkách v amplifikaci genů IRAK1 a IRAK4, jako je vysoký obsah GC anebo repetitivní sekvence,

kteře vedou k velkému počtu vedlejších produktů. Žádný z těchto předpokladů se při kontrole sekvencí těchto genů nepotvrdil. Není pochyb o tom, že pokud bude výzkum diverzity v těchto genech pokračovat, ustálí se i optimalizovaný systém pro jejich amplifikaci, který může převzít úspěšný návrh fragmentů. Další možný postup optimalizace by mohl být design a objednání nových primerů pro fragmenty 1 a 2 u genu IRAK1 a 9 – 14 u genu IRAK4.

Kupodivu nedostatečné množství PCR produktů u některých amplikonů poměrně málo ovlivnilo resekvenování pomocí NGS. Ready odpovídající většině amplikonů byly ve výsledcích detekovatelné a zpravidla i v dostatečném počtu kopií. Použitý postup kompenzace nízkých výtěžků PCR při sestavování směšného vzorku byl zřejmě úspěšný.

V každém případě se lze na základě dostupných informací domnívat, že amplifikační systém pro bovinní geny IRAK1 a IRAK4 nebyl doposud v odborné literatuře publikován, stejně jako pro gen MAL. Proto lze i dosažený neúplný výsledek považovat za předpoklad pro práci na charakterizaci těchto genů v budoucnu.

### **6.3 Významné výsledky**

Oproti očekávání byla nalezena vyšší diverzita v genech Toll dráhy než u genu MAL. Ve vybraných genech IRAK1 a IRAK4 Toll signální dráhy bylo v diplomové diplomové práci nalezeno 29 polymorfismů, z nichž 11 se nachází v exonech.

Gen IRAK1 i přes jeho kratší sekvenci obsahoval větší polymorfismů - 17 - než gen IRAK4, který jich obsahoval 13. V genu IRAK1 bylo identifikováno 17 polymorfismů, přičemž 4 se nacházely v exonech. Jeden z nich se shodoval s databází. Jednonukleotidový polymorfismus, který spočívá v záměně G -> A na souřadnicích 40 130 672 s frekvencí 4,3 %, se nenachází v databázi. Mohlo by se tedy jednat o dosud nepublikovaný SNP. Zbylé 2 polymorfismy v exonech se nacházely pouze s frekvencí 1,3 %, která nemůže být brána jako průkazná. Ostatní polymorfismy se nacházejí v intronech. Pro opakované sekvenování by bylo optimální navržení nových primerů pro fragment 1 a 2, které by zajistily větší množství produktů.

V amplifikovaných úsecích genu IRAK4 se nacházelo 12 SNP, z nichž 5 se nacházelo na exonech. Polymorfismus záměna báze C -> T s frekvencí 24,1 % byl shodný s databází. Ostatní polymorfismy se vyskytovaly s nízkou frekvencí 1,1 %, ale při vizuální



kontrole se opravdu jednalo o polymorfismy, které by s malou pravděpodobností vznikly chybou technologie. Delece byly nalezeny pouze v genu IRAK4. Jednalo se o 3 delece, přičemž 2 z nich se nacházely v exonech. O velkou část potenciálních polymorfismů se jistě přišlo kvůli špatné amplifikaci střední části genu, konkrétně fragmentů 9 – 14, kdy zde byl pozorován jen nízký PCR výtěžek, což mohlo snížit citlivost detekce polymorfismů ve výsledcích sekvenování.

Pro gen MAL byly nalezeny pouze dva polymorfismy (oba nalezené v databázi), přičemž pouze jeden z nich se nacházel na exonu č. 4. Šlo o záměnu C -> G s frekvencí 55,7 %, podloženou 870 ready. Je ovšem třeba vzít v úvahu, že u genu MAL byla použita pro resekvenování pouze kódující oblast, na rozdíl od genů Toll dráhy, které byly resekvenovány celkově. Kódující sekvence jsou charakterizovány nižší diverzitou vzhledem k selekčnímu tlaku vůči mutacím v nich lokalizovaným, proto pozorovaná distribuce diverzity nepřekvapuje.

#### **6.4 Využitelnost pro šlechtění**

Z hlediska využitelnosti pro šlechtění je špatným výsledkem malý podíl nalezených nesynonymních mutací (pouze jedna nesynonymní mutace u genu IRAK1). Přesnější hodnocení dopadu pomocí programů VEP a částečně i SIFT ukazuje, že i některé synonymní mutace mohou mít efekt na funkci proteinů a tím i na fenotypový znak infekční rezistence v populaci, konkrétně mutace Poly\_5, Poly\_13 a Poly\_14.

Je třeba rovněž brát v úvahu, že nalezené polymorfismy odpovídají skupinám variant na jednom vlákně DNA - haplotypům. Mohou být proto v absolutní genové vazbě s mutacemi s výraznějším efektem. Zejména se může jednat o mutace v regulačních oblastech všech tří genů, které nebyly předmětem screeningu na diverzitu v této práci. Proto jsou současná data o polymorfismu využitelná pro provedení asociační studie, která by mohla určit vliv konkrétních variant ve sledovaných třech genech na zdravotní znaky a s nimi spojené znaky užitkovosti.

Pro orientaci šlechtění jsou zajímavé i údaje o zastoupení jednotlivých nalezených variant v konkrétní populaci, tj. v ČESTR. Je to vodítko pro případnou korekci ve směru zvýšení zastoupení příznivých alel, jako se tomu děje například u alel pro různé

formy mléčných bílkovin. Snahou by mělo být i zvýšení heterozygotnosti jako takové, neboť diverzifikace na geny infekční rezistence chrání populaci snížením rychlosti šíření patogenů. Vyšší diverzita zlepšuje epidemiologické ukazatele a může vést sama o sobě k utlumení epizootie (Springbett et al. 2003).

V každém případě kontrastuje omezená funkční diverzita nalezená v současné produkční populaci ČESTR s vysokou diverzitou v celosvětovém genofondu tura domácího, tak jak je zastoupena v databázi variant European Variation Archive EBI (Příloha 1, 2). Zvýšení diverzity pro imunitní geny by bylo určitě vhodné jako nezbytný základ pro selekci na zdravotní znaky. Vytipování dalších populací jako donorů diverzity v převodném křížení by mělo být předmětem dalších studií.

## 6.5 Publikované výsledky u skotu

Význam studia diverzity v těchto genech a případné asociační studie je určen mj. skutečností, že v současné době nejsou o efektu polymorfismu v těchto genech na fenotypové znaky skotu žádné publikované údaje. To je potvrzeno hledáním v literárních databázích jako Web of Science, kde nebyla nalezena obdobná práce zaměřená na variabilitu genů IRAK1 a IRAK4 Toll signální dráhy. S tím kontrastuje existence prací zaměřených na molekulu MyD88, která se nachází na prvním místě Toll-signální dráhy a s IRAK1 a IRAK4 interaguje. Capparelli et al. (2013) ve své práci uvádí, že u skotu zvířata heterozygotní v polymorfním markeru Myd88 A625C mají pětinasobně snížené riziko aktivní plicní tuberkulózy. Rovněž Gao et al. (2018) označili gen *MYD88* za kandidátní gen pro rezistenci k paratuberkulóze skotu na základě celogenomového mapování lokusů kvantitativních znaků.

Ještě výraznější rozdíl je v počtu prací publikovaných u skotu o samotných Toll-like receptorech, které jsou na začátku Toll signální dráhy.

Pro porovnání s variabilitou Toll-like receptorů: Sharma et al. (2006) ve své práci, kde bylo genotypováno 388 býků holštýnského plemena, uvádějí 3 jednonukleotidové polymorfismy (1 SNP v promotorové oblasti, dva SNP v exonu 3) v TLR4, přičemž jednotlivé haplotypy jsou spojeny se změnami plemenných hodnot pro perzistenci laktace a skóre somatických buněk.

Mucha et al. (2008) uvádějí, že existuje spojení mezi TLR mutacemi a zvýšenou náchylností k infekci *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Vzhledem k vysoce konzervované povaze Toll-like receptorů u savců to nepřímo podporuje úlohu mutací v TLR a v člancích jejich signální dráhy v mykobakteriálních infekcích u jiných savců včetně lidí.

## 6.6 Publikované výsledky u jiných druhů

I když jsou doposud výsledky u skotu pro sledovanou skupinu tří genů omezené, existuje řada podpůrných důkazů pro úlohu těchto genů v imunitě u jiných druhů.

Chandra et al. (2013) ve své studii ukazují pozitivní vliv inhibice IRAK1 u myši během polymikrobiální septické reakce. Ovlivnění aktivity IRAK1 se tak projevuje zpožděným nástupem zánětu a zvyšuje šanci přežití. Vysvětlením je, že zpomalení signalizace IRAK1 zmírňuje zánět v důsledku redundantních drah po smíšených TLR stimulech. Variabilita v IRAK1 je také spojována s náchylností k systémovému lupusu, který je považován za autoimunitní poruchu (Jacob et al., 2009).

V případě IRAK4 Medvedev et al. (2003) uvádějí, že IRAK4 je u lidí klíčový při vývoji normální zánětlivé reakce vyvolané bakteriálními i nebakteriálními faktory. Také Hultgren et al. (2002) se zmiňuje o rozhodující roli molekuly IRAK4 při obranných reakcích organismu vůči grampozitivním *S. pneumoniae* a *S. aureus*. Úloha polymorfismu v této molekule byla jasně demonstrována na mutaci Q293X vedoucí ke zkrácení proteinového řetězce u lidského IRAK4. Defekt článku v řetězci přenosu signálu inhibuje odpověď Toll dráhy v lidských leukocytech a způsobuje imunodeficienci (Davidson et al., 2006).

Dopad mutací v lidském IRAK1 na interakci s MyD88 jako předcházejícím článkem signálního řetězce a dopad na funkci Toll dráhy byl pro model lidských bílkovin přímo určován skupinou autorů Yamamoto et al. (2014).

Úloha MAL ve vnímavosti k patogenním bakteriím byla více než jednoznačně prokázána v práci Rumah et al. (2015): buněčná linie s inaktivovaným genem nereagovala na  $\epsilon$ -toxin (ETX) bakterie *Clostridium perfringens*. U myši s inaktivovaným genem byla rezistence vůči toxinu dokonce více než 1000x zvýšená. Proto lze odůvodněně předpokládat, že i přirozená variabilita v tomto genu bude spojena s odolností vůči ekonomicky významnému patogenu (jeden z původců průjmů telat).

Vzhledem k omezenému objemu informací o účinku tří sledovaných genů u skotu budou výsledky získané v rámci diplomové práce publikovány. Předpokládá se i zahrnutí asociační studie se známými fenotypovými ukazateli pro sledovanou skupinu býků ČESTR.

## 7. Závěr

V rámci předložené práce byla otestována pracovní hypotéza o polymorfismu genů kódujících články signálního řetězce od Toll-like receptorů přirozené imunity v populaci českého strakatého skotu. Pro tento účel byl aplikován screening pomocí sekvenování nové generace, což dovolilo provést hledání variant v rozsahu celých genů při racionalizaci nákladů. Byla rovněž snížena závislost na často nesystematických poznatcích o diverzitě v těchto genech v jiných populacích skotu, tím spíše, že publikace o diverzitě těchto bovinních genů jsou ojedinělé. Úplná informace o diverzitě v konkrétní populaci dovolila navrhnout systém pro genotypování známých variant u jednotlivých zvířat, částečně jej optimalizovat a aplikovat. Tím byly vytvořeny předpoklady pro navazující asociační studii s fenotypovými znaky. Paralelně byla stejným přístupem sledována diverzita v genu z jiné oblasti imunitního systému skotu MAL. Pro prověření druhé pracovní hypotézy o využitelnosti diverzity ve sledovaných genech pro šlechtění na zdravotní znaky u ČESTR byly nalezené polymorfismy vyhodnoceny na efekt na genový produkt pomocí predikčních metod. Lze konstatovat, že funkčně významná diverzita je v populaci omezená, prakticky se jedná o jedinou nesynonymní mutaci se záměnou valinu 252 na alanin v IRAK1, i když zůstává nezmapovaná diverzita v regulační oblasti všech tří genů. Zvýšení diverzity v genech Toll-signální dráhy pro selekci zaměřenou na infekční rezistenci by bylo nutné řešit na základě polymorfismu podchyceného v databázích pro genofond světové populace skotu.

## 8. Seznam použité literatury

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783–801.

Akira S. 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Current opinion in immunology* **15**:5–11.

Anton O, Batista A, Millan J, Andres-Delgado L, Puertollano R, Correas I, Alonso MA. 2008. An essential role for the MAL protein in targeting Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* **205**:3201–3213.

Anton OM, Andres-Delgado L, Reglero-Real N, Batista A, Alonso MA. 2011. MAL protein controls protein sorting at the supramolecular activation cluster of human T lymphocytes. *Journal of Immunology* **186**:6345–6356.

Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11**:463–472.

Bhaladhare A, Sharma D, Kumar A, Sonwane A, Chauhan A, Singh R, Kumar P, Yadav R, Baqir M, Bhushan B, Prakash O. 2016. Single nucleotide polymorphism in toll-like receptor genes and case-control association studies with bovine tuberculosis. *Veterinary World* **9**:458–464.

Botos I, Segal DM, Davies DR. 2011. The structural biology of Toll-like receptor. *Structure* **19**:447–459.

Bowie A and O'Neill LAJ. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology* **67**:509–514.

Capparelli R, De Chiara F, Nocerino N, Medaglia Ch, Di Constanzo R, Ramunno L, Capuano F, Casalnuovo F, Di Matteo A, Iannella D. 2013. Heterozygosity at the A625C Polymorphic Site of the MyD88 gene Is Associated with *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Infection and immunity* **81**: 2139–2144.

CESTR. 2008. Český strakatý skot. Available at: <https://www.cestr.cz/cesky-strakaty-skot.html> (accessed October 2018).

Conejeros I, Gibson AJ, Werling D, Muñoz-Caro T, Hermosilla C, Taubert A, Burgos RA. 2015. Effect of the synthetic Toll-like receptor ligands LPS, Pam3CSK4, HKLM and FSL-1 in the function of bovine polymorphonuclear neutrophils. *Developmental & Comparative Immunology* 52 DOI: 10.1016/j.dci.2015.05.012

Davidson DJ, Currie AJ, Bowdish, DME, Brown KL, Rosenberger CM., Ma RC, Bylund J, Campsall PA, Puel A, Picard C, Casanova JL, Turvey SE, Hancock REW, Devon RS, Speert DP. 2006. IRAK-4 mutation (Q293X): Rapid detection and characterization of defective post-transcriptional TLR/IL-1R responses in human myeloid and non-myeloid cells. *Journal of Immunology* **177**:8202-8211.

Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzales D, White JO, Conlan RS, O'Farrelly C, Sheldon M. 2008. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology* **6**:53.

Delves PJ and Roitt IM. 2000. The Immune system. *Advances in Immunology* **343**:37-49.

Eberlein A, Kalbe C, Goldammer T, Brunner RM, Kuehn C, Weikard R. 2011. Annotation of novel transcripts putatively relevant for bovine fat Metabolism. *Molecular Biology Reports* **38**:2975–2986.

Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RAB. 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition receptors that link innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology* **10**:363-372.

Gao Y, Jiang J, Yang S, Cao J, Han B, Wang Y, Zhang Y, Yu Y, Zhang S, Zhang Q, Fang L, Cantrell B, Sun D. 2018. Genome-wide association study of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in Chinese Holstein. *BMC Genomics* **19**:972.

Garcia KC, Teyton L, Wilson IA. 1999. Structural basis of T cell recognition. *Annual Review of Immunology* **17**:369-397.

Genecards. 2012 MAL gene (protein coding). Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAL>(accessed October 2018).

Goldammer T, Zerbe H, Molennar A, Schuberth J, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM. 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of A-Defensin 5, Toll-Like-Receptor 2 (TLR2) and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunol* **11**:174-185.

Grewal IS, Flavell RA. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annual Review of Immunology* **16**:111-135.

Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. 2006. *Nature* **439**:204–207.

Honda K, Taniguchi T. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews Immunology* **6**:644–658.

Hoogendoorn B, Owen MJ, Oefner PJ, Williams N, Austin J, O'Donovan MC. 1999. Genotyping single nucleotide polymorphisms by primer extension and high performance liquid chromatography. *Human Genetics* **104**:89–93.

Hornig T, Barton GM, Medzhitov R. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the toll signaling pathway. *Nature Immunology* **2**: 835–841.

Hosseini AM, Majidi J, Baradaran B, Yousefi M. 2015. „Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases“. In: *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **5**: 605-614.

Hřeben F. 2015. Metodika uchovávání genetického zdroje zvířat Plemeno: Český strakatý skot. Available from: [https://www.cestr.cz/files/ke\\_stazeni/metodika-chovu-cesky-strakaty-skot.pdf](https://www.cestr.cz/files/ke_stazeni/metodika-chovu-cesky-strakaty-skot.pdf) (accessed October 2018)

Hultgren OH, Svensson L, Tarkowski A. 2002. Critical role of signaling through IL-1 receptor for development of arthritis and sepsis during *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Immunology* **168** : 5207–5212.



- Chandra R, Federici S, Bishwas T, Németh ZH, Deitch EA, Thomas JA, Spolarics Z. 2013. IRAK1-dependent signaling mediates mortality in polymicrobial sepsis. *Inflammation* **36**: 1503-1512.
- Chen ZJ. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nature Cell Biology* **7**:758–65.
- Jacob CO, Zhub J, Armstrong DL, Yan M, Han J, Zhou XJ, Thomas JA, Reiff A, Barry L, Myones BL, Ojwangf JO, Kaufman KM, Gitelman MK, McCurdy D, Wagner-Weiner L, Silverman E, Ziegler J, Kelly JA, Merrill JT, Harley JB, Ramsey-Goldman R, Vilam LM, Baen SC, Vyse TJ, Gilkeson GS, Gaffney PM, Moser KL, Langefeld CD, Zidovetzki R, Mohan C. 2009. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**:6256–6261
- Kawai T a Akira S. 2007. TLR signaling. *Seminars in immunology* **19**:24–32.
- Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ. 2005. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nature Review Immunology* **5**:866-879.
- Medvedev AE, Lentschat A, Kuhns DB, Blanco JCG, Salkowski C, Thang S, Arditi M, Gallin JI, Vogel SN. 2003. Distinct Mutations in IRAK4 Confer Hyporesponsiveness to Lipopolysaccharide and Interleukin-1 in Patient with Recurrent Bacterial Infections. *The Journal of Experimental Medicine* **198**: 521-531.
- Medzhitov R and Janeway CA. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology* **9**: 4-9.
- Millan J, Puertollano R, Fan L, Rancano C, Alonso MA. 1997. The MAL proteolipid is a component of the detergent-insoluble membrane subdomains of human T-lymphocytes. *Biochemical Journal* **321**: 247–252.
- Miyake K, Yamashita Y, Ogata M, Sudo T, Kimoto M. 1995. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *Journal of Immunology* **154**:3333–3340.

- Novák K, Czerneková V, Kyselová J, Bjelka M. 2018. Laboratorní určování funkčních variant v genech TLR přirozené imunity skotu. VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v.v.i. V UHŘÍNĚVSI. Česká republika. Certifikovaná metodika 978-80-7403-211-0.
- Novák K. 2014. Functional polymorphisms in Toll-like receptor genes for innate immunity in farm animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **157**:1–11.
- Novotny J, Bruccoleri R, Newell J, Murphy D, Haber E, Karplus M. 1983. Molecular anatomy of the antibody binding site. *Journal of Biological Chemistry* **258**:14433-7.
- O'Neill LA. 2008. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity* **29**:12-20.
- Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. 2003. TICAM1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nature Immunology* **4**:161–167.
- Pancer Z, Cooper MD. 2006. The evolution of adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* **24**:497-518.
- Parker DC. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annual Review of Immunology* **11**:331-360.
- Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. 2007. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* **131**:1124-1136.
- Rumah KR, Ma Y, Linden JR, Oo ML, Anrather J, Schaeren-Wiemers N, Alonso MA, Fischetti VA, McClain MS, Vartanian T. 2015. The Myelin and Lymphocyte Protein MAL Is Required for Binding and Activity of *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ Toxin. *PLoS Pathogens* **11**: e1004896. doi:10.1371/journal.ppat.1004896.
- Russell CD, Widdison S, Leigh JA, Coffey TJ. 2012. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine Toll-like receptor 1 gene and association with health traits in cattle. *Veterinary Research* **43** DOI: 10.1186/1297-9716-43-17.

Sharma BS, Leyva I, Schenkel F, Karrow NA. 2006. Association of Toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science* **89**:3626–3635.

Schaut RG, Ridpath JF, Sacco RE, Roques P. 2016. Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2 Impairs Macrophage Responsiveness to Toll-Like Receptor Ligation with the Exception of Toll-Like Receptor 7. *PLOS ONE* **11** (e0159491) DOI: 10.1371/journal.pone.0159491.

Schroder K, Tschopp J. 2010. The inflammasomes. *Cell* **140**:821-832.

Skládanka J, Doležal O, Hegedüsová Z, Holásek R, Chládek G, Kopec T, Kropsch M, Kučera J, Kvapilík J, Ofner-Schröck E, Onráková M, Strapák P. 2014. Chov strakateho skotu. Mendelova univerzita v Brně, Brno.

Springbett AJ, MacKenzie K, Woolliams JA, Bishop SC. 2003. The contribution of genetic diversity to the spread of infectious diseases in livestock populations. *Genetics* **165**:1465-1474.

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulos L, Flavell RA, Beutler B. 2004. Toll-like receptor 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:3516-3521.

Takeda K and Akira S. 2004. TLR signaling pathways. *Seminars in immunology* **16**:3–9.

Uniprot. 2006. UniProtKB - Q1RMT8 (IRAK4\_BOVIN). Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q1RMT8> (accessed October 2018).

Uniprot. 2007. UniProtKB - Q2LGB3 (IRAK1\_BOVIN). Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q2LGB3>(accessed October 2018).

URBAN F. 1997. Chov dojného skotu. Apros. Praha.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi, Takeda K, Akira S. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology* **4**:1144–1150.

Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N. 2014. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. *Molecular Immunology* **58**:66-76.

Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Günther J, Draing C, von Aulock S, Schuberth HJ, Seyfert HM. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E coli*, but *S aureus* fails to both activate NF-kappa B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF alpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Molecular Immunology* **45**:1385–1397.

Yin Q, Fu TM, Li J, Wu H. 2015. Structural Biology of Innate Immunity. *Annual Review of Immunology* **33**: 13.1-13.24.

Zacchetti D, Peranen J, Murata M, Fiedler K, Simons K. 1995. VIP17/MAL, a proteolipid in apical transport vesicles. *FEBS Letters* **377**:465–469.

Zhu J, Mohan Ch. 2010. Toll-like receptor Signaling Pathways – Therapeutic opportunities. *Mediators of Inflammation* 2010: doi:10.1155/2010/781235.

## 9. Samostatné přílohy

Příloha č. 1: Databáze polymorfismů genu IRAK1 vycházející z editace bovinního genomu UMD\_3.1.1 (University of Maryland) exportovaná ze European Variation Archive EBI v říjnu 2018

chromosome	start	end	alternate	ids	type	consequenceTypes
X	40138231	40138231	T	rs208372409	SNV	-
X	40138229	40138231	TTC	rs523700549	INDEL	-
X	40137865	40137865	A	rs208390412	SNV	-
X	40137742	40137742	C	rs438941388	SNV	-
X	40137737	40137737	T	rs476846384	SNV	-
X	40136907	40136907	C	rs379875559	INDEL	-
X	40136587	40136587	T	rs133282715	SNV	-
X	40136513	40136513	C	rs381265108	SNV	-
X	40135292	40135292	C	rs518728448	SNV	-
X	40135186	40135186	G	rs521583630	SNV	-
X	40135170	40135170	C	rs717188843	SNV	-
X	40134554	40134554	G	rs135562211	SNV	-
X	40134418	40134418	T	rs719678612	SNV	-
X	40134086	40134086	A	rs716521231	SNV	-
X	40133376	40133376	A	rs208105935	SNV	synonymous_variant
X	40133211	40133211	C	rs517457802	SNV	intron_variant
X	40132445	40132445	A	rs211379365	SNV	synonymous_variant
X	40132078	40132078	G	rs480726521	SNV	intron_variant
X	40132041	40132041	G	rs210710958	SNV	intron_variant
X	40132016	40132016	T	rs798918786	SNV	intron_variant
X	40131931	40131931	A	rs383419608	SNV	intron_variant
X	40131641	40131641	C	rs450710687	SNV	intron_variant
X	40131397	40131397	A	rs715808409	SNV	missense_variant
X	40130944	40130944	T	rs110533802	SNV	intron_variant
X	40130822	40130822	A	rs524282141	SNV	synonymous_variant
X	40130806	40130806	G	rs385850896	SNV	synonymous_variant
X	40130518	40130518	G	rs526511177	SNV	intron_variant
X	40130167	40130167	A	rs519411059	SNV	intron_variant
X	40130077	40130077	C	rs209170931	SNV	intron_variant
X	40129921	40129921	G	rs134381860	SNV	intron_variant
X	40129297	40129297	T	rs209594163	SNV	intron_variant
X	40129269	40129269	C	rs208279698	SNV	intron_variant
X	40128854	40128854	C	rs453209348	SNV	intron_variant
X	40128841	40128841	-	rs518951802	INDEL	intron_variant
X	40128776	40128776	G	rs211406021	SNV	intron_variant
X	40128454	40128454	C	rs133154216	SNV	intron_variant
X	40127402	40127402	T	rs207912842	SNV	splice_region_variant
X	40127315	40127315	G	rs446424577	SNV	intron_variant

X	40127287	40127287	A	rs525747074	SNV	intron_variant
X	40126889	40126889	T	rs516506725	SNV	3_prime_UTR_variant
X	40126810	40126810	T	rs135486869	SNV	3_prime_UTR_variant
X	40126658	40126658	A	rs455550261	SNV	3_prime_UTR_variant
X	40125923	40125923	A	rs523782229	SNV	downstream_gene_variant
X	40125829	40125829	C	rs210152488	SNV	downstream_gene_variant
X	40125727	40125730	TCTT	rs385188070	INDEL	downstream_gene_variant
X	40125692	40125692	G	rs207559709	SNV	downstream_gene_variant
X	40125349	40125349	C	rs134143714	SNV	downstream_gene_variant
X	40125119	40125119	G	rs720423466	SNV	downstream_gene_variant
X	40124947	40124947	A	rs525602272	SNV	downstream_gene_variant
X	40124754	40124754	T	rs210292749	SNV	downstream_gene_variant
X	40123730	40123730	-	rs719476910	INDEL	downstream_gene_variant
X	40123442	40123442	C	rs136632652	SNV	downstream_gene_variant
X	40123146	40123146	G	rs721950098	SNV	downstream_gene_variant
X	40122972	40122972	C	rs721474069	SNV	downstream_gene_variant
X	40122291	40122291	C	rs433982836	SNV	downstream_gene_variant
X	40122254	40122254	T	rs722494732	INDEL	downstream_gene_variant
X	40122215	40122215	C	rs523870288	SNV	downstream_gene_variant
X	40122214	40122214	T	rs472480938	SNV	downstream_gene_variant
X	40122158	40122158	A	rs135366426	SNV	downstream_gene_variant
X	40122014	40122014	C	rs109413949	SNV	downstream_gene_variant
X	40122010	40122010	A	rs519669462	SNV	downstream_gene_variant
X	40122009	40122009	T	rs523951827	SNV	downstream_gene_variant
X	40121848	40121848	A	rs134766103	SNV	downstream_gene_variant
X	40121482	40121482	T	rs211083458	SNV	downstream_gene_variant
X	40121423	40121423	T	rs721181606	SNV	downstream_gene_variant
X	40121360	40121360	A	rs137051402	SNV	downstream_gene_variant
X	40121327	40121327	T	rs716584710	SNV	downstream_gene_variant
X	40121265	40121265	A	rs208673869	SNV	downstream_gene_variant

Příloha č. 2: Databáze polymorfismů genu IRAK4 vycházející z editace bovinního genomu UMD\_3.1.1 (University of Maryland) exportovaná ze European Variation Archive EBI v říjnu 2018

chromosome	start	end	alternate	ids	type	consequenceTypes
5	36872892	36872895	CTAC	rs468135571	INDEL	downstream_gene_variant
5	36873009	36873009	-	rs717607841	INDEL	downstream_gene_variant
5	36873070	36873070	T	rs436821110	SNV	downstream_gene_variant
5	36873149	36873149	C	rs519671609	SNV	downstream_gene_variant
5	36873155	36873155	C	rs719661654	SNV	downstream_gene_variant
5	36873166	36873166	A	rs718717968	INDEL	downstream_gene_variant
5	36873230	36873230	G	rs721889982	SNV	downstream_gene_variant
5	36873257	36873257	G	rs379797796	SNV	downstream_gene_variant

5	36873330	36873330	T	rs715772110	SNV	downstream_gene_variant
5	36873393	36873393	T	rs479772405	SNV	downstream_gene_variant
5	36873412	36873412	C	rs715398605	SNV	downstream_gene_variant
5	36873427	36873427	A	rs450673369	SNV	downstream_gene_variant
5	36873435	36873435	C	rs723322488	SNV	downstream_gene_variant
5	36873469	36873469	T	rs715902594	SNV	downstream_gene_variant
5	36873480	36873480	A	rs719092844	SNV	downstream_gene_variant
5	36873506	36873506	G	rs481500015	SNV	downstream_gene_variant
5	36873565	36873565	G	rs717632138	SNV	downstream_gene_variant
5	36873604	36873604	G	rs719383626	SNV	downstream_gene_variant
5	36873640	36873640	A	rs723387865	SNV	downstream_gene_variant
5	36873697	36873697	T	rs717617936	SNV	downstream_gene_variant
5	36873700	36873700	A	rs464477800	SNV	downstream_gene_variant
5	36873709	36873709	G	rs132638446	SNV	downstream_gene_variant
5	36873748	36873748	A	rs716760733	SNV	downstream_gene_variant
5	36873843	36873843	A	rs453620413	SNV	downstream_gene_variant
5	36873867	36873867	G	rs432909301	SNV	downstream_gene_variant
5	36873876	36873880	-	rs721311922	INDEL	downstream_gene_variant
5	36873951	36873951	C	rs520227390	SNV	downstream_gene_variant
5	36874009	36874009	C	rs525244913	SNV	downstream_gene_variant
5	36874027	36874027	T	rs717378622	SNV	downstream_gene_variant
5	36874174	36874174	G	rs720610298	SNV	downstream_gene_variant
5	36874202	36874202	G	rs134420611	SNV	downstream_gene_variant
5	36874203	36874203	C	rs135569948	SNV	downstream_gene_variant
5	36874248	36874248	T	rs722225560	SNV	downstream_gene_variant
5	36874262	36874268	-	rs477311928	INDEL	downstream_gene_variant
5	36874266	36874266	A	rs714034298	SNV	downstream_gene_variant
5	36874277	36874277	T	rs716001041	INDEL	downstream_gene_variant
5	36874327	36874327	A	rs718493663	SNV	downstream_gene_variant
5	36874341	36874341	G	rs43434319	SNV	downstream_gene_variant
5	36874378	36874378	A	rs715857299	INDEL	downstream_gene_variant
5	36874437	36874437	A	rs715885086	SNV	downstream_gene_variant
5	36874445	36874445	T	rs720216846	SNV	downstream_gene_variant
5	36874478	36874478	A	rs716446024	SNV	downstream_gene_variant
5	36874553	36874553	C	rs719586887	SNV	downstream_gene_variant
5	36874625	36874625	C	rs473244234	SNV	downstream_gene_variant
5	36874642	36874642	A	rs716955793	SNV	downstream_gene_variant
5	36874697	36874697	T	rs721315168	SNV	downstream_gene_variant
5	36874709	36874709	G	rs434871745	SNV	downstream_gene_variant
5	36874781	36874781	C	rs716852986	SNV	downstream_gene_variant
5	36874797	36874797	A	rs719501134	SNV	downstream_gene_variant
5	36874824	36874824	C	rs723958433	SNV	downstream_gene_variant
5	36874827	36874827	T	rs716875877	SNV	downstream_gene_variant
5	36874846	36874846	T	rs473764841	SNV	downstream_gene_variant
5	36874880	36874880	T	rs455053908	SNV	downstream_gene_variant

5	36874889	36874889	G	rs717487204	SNV	downstream_gene_variant
5	36874994	36874994	T	rs134528713	SNV	downstream_gene_variant
5	36875023	36875023	A	rs714840513	SNV	downstream_gene_variant
5	36875029	36875029	T	rs716757036	SNV	downstream_gene_variant
5	36875054	36875054	-	rs522036790	INDEL	downstream_gene_variant
5	36875140	36875140	T	rs721072234	SNV	downstream_gene_variant
5	36875209	36875209	G	rs377998788	SNV	downstream_gene_variant
5	36875287	36875287	A	rs443636466	SNV	downstream_gene_variant
5	36875336	36875336	C	rs718450116	SNV	downstream_gene_variant
5	36875342	36875342	T	rs722712084	SNV	downstream_gene_variant
5	36875368	36875368	A	rs720416838	SNV	downstream_gene_variant
5	36875438	36875438	T	rs720105148	SNV	downstream_gene_variant
5	36875457	36875457	A	rs723221452	SNV	downstream_gene_variant
5	36875506	36875506	A	rs717582370	SNV	downstream_gene_variant
5	36875554	36875554	T	rs719447674	SNV	downstream_gene_variant
5	36875555	36875555	A	rs380637810	SNV	downstream_gene_variant
5	36875709	36875709	C	rs714553356	SNV	downstream_gene_variant
5	36875773	36875773	A	rs719059637	SNV	downstream_gene_variant
5	36875807	36875807	C	rs714798032	SNV	downstream_gene_variant
5	36876002	36876002	A	rs716656720	SNV	downstream_gene_variant
5	36876055	36876061	-	rs136234910	INDEL	downstream_gene_variant
5	36876131	36876131	G	rs722103516	SNV	downstream_gene_variant
5	36876193	36876193	C	rs463990408	SNV	downstream_gene_variant
5	36876205	36876205	C	rs721655699	SNV	downstream_gene_variant
5	36876220	36876220	G	rs715227908	SNV	downstream_gene_variant
5	36876233	36876233	C	rs718351247	SNV	downstream_gene_variant
5	36876255	36876255	T	rs722752096	SNV	downstream_gene_variant
5	36876274	36876274	G	rs715754591	SNV	downstream_gene_variant
5	36876298	36876298	C	rs720182307	SNV	downstream_gene_variant
5	36876317	36876317	G	rs722128552	SNV	downstream_gene_variant
5	36876406	36876406	T	rs718334230	SNV	downstream_gene_variant
5	36876469	36876469	T	rs471117265	SNV	downstream_gene_variant
5	36876487	36876487	G	rs715712494	SNV	downstream_gene_variant
5	36876495	36876495	G	rs465131853	SNV	downstream_gene_variant
5	36876583	36876583	C	rs723305952	SNV	downstream_gene_variant
5	36876609	36876609	A	rs716159666	SNV	downstream_gene_variant
5	36876641	36876641	C	rs137542005	SNV	downstream_gene_variant
5	36876666	36876666	T	rs723890917	SNV	downstream_gene_variant
5	36876727	36876727	A	rs721176068	SNV	downstream_gene_variant
5	36876734	36876734	A	rs798745611	SNV	downstream_gene_variant
5	36876751	36876752	TG	rs717259801	INDEL	downstream_gene_variant
5	36876755	36876755	G	rs722963582	SNV	downstream_gene_variant
5	36876853	36876853	A	rs717287155	SNV	downstream_gene_variant
5	36876868	36876870	-	rs133247489	INDEL	downstream_gene_variant
5	36876886	36876886	A	rs721579402	SNV	downstream_gene_variant



5	36876973	36876973	A	rs714566099	SNV	downstream_gene_variant
5	36876978	36876978	T	rs718982834	SNV	downstream_gene_variant
5	36877000	36877000	T	rs714661938	SNV	downstream_gene_variant
5	36877001	36877001	A	rs716370092	SNV	downstream_gene_variant
5	36877007	36877007	T	rs718228953	SNV	downstream_gene_variant
5	36877016	36877016	C	rs722678413	SNV	downstream_gene_variant
5	36877036	36877036	C	rs381876513	SNV	downstream_gene_variant
5	36877082	36877082	G	rs385054951	SNV	downstream_gene_variant
5	36877262	36877262	C	rs720944175	SNV	downstream_gene_variant
5	36877297	36877297	A	rs720028484	SNV	downstream_gene_variant
5	36877382	36877382	C	rs459777560	SNV	downstream_gene_variant
5	36877549	36877549	G	rs715527036	SNV	downstream_gene_variant
5	36877657	36877657	G	rs718291189	SNV	downstream_gene_variant
5	36877813	36877813	C	rs722751953	SNV	downstream_gene_variant
5	36877824	36877824	G	rs479858075	SNV	downstream_gene_variant
5	36877858	36877858	C	rs448070087	SNV	downstream_gene_variant
5	36877935	36877935	A	rs43434318	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36877944	36877944	T	rs481845636	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878055	36878055	T	rs450477933	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878113	36878113	T	rs464412633	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878177	36878177	G	rs433046541	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878346	36878346	G	rs446807913	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878432	36878432	A	rs466756162	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878521	36878521	T	rs716269316	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878548	36878548	T	rs527057352	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878555	36878555	T	rs723757504	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878560	36878560	C	rs715553342	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878715	36878715	T	rs379546685	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878757	36878757	T	rs718816277	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878778	36878778	T	rs723061863	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36878801	36878801	A	rs717255405	SNV	3_prime_UTR_variant
5	36879055	36879055	A	rs454916810	SNV	intron_variant
5	36879178	36879178	G	rs468715971	SNV	synonymous_variant
5	36879215	36879215	T	rs437138222	SNV	missense_variant
5	36879535	36879538	-	rs719271701	INDEL	intron_variant
5	36879559	36879559	C	rs457173840	SNV	intron_variant
5	36879578	36879578	A	rs716564563	SNV	intron_variant
5	36879606	36879606	T	rs721052190	SNV	intron_variant
5	36879634	36879634	T	rs722860332	SNV	intron_variant
5	36879701	36879701	C	rs382209396	SNV	intron_variant
5	36879740	36879740	T	rs470852702	SNV	intron_variant
5	36879742	36879742	T	rs519728774	SNV	intron_variant
5	36879805	36879805	T	rs523305465	SNV	intron_variant
5	36879812	36879812	A	rs439853297	SNV	intron_variant
5	36879828	36879828	T	rs453513394	SNV	intron_variant

5	36879877	36879877	G	rs137727235	SNV	intron_variant
5	36879947	36879947	C	rs718820693	SNV	intron_variant
5	36879967	36879967	G	rs526770169	SNV	intron_variant
5	36879973	36879973	A	rs719014132	SNV	intron_variant
5	36880024	36880024	A	rs722093484	SNV	intron_variant
5	36880033	36880033	C	rs518866442	SNV	intron_variant
5	36880046	36880046	C	rs523826785	SNV	intron_variant
5	36880070	36880070	A	rs718164133	SNV	intron_variant
5	36880082	36880082	T	rs798090208	SNV	intron_variant
5	36880118	36880118	G	rs385218628	SNV	intron_variant
5	36880198	36880198	A	rs379006023	SNV	intron_variant
5	36880202	36880202	A	rs722390951	SNV	intron_variant
5	36880210	36880210	A	rs520893291	SNV	intron_variant
5	36880256	36880256	G	rs209992951	SNV	intron_variant
5	36880318	36880318	T	rs719963137	SNV	intron_variant
5	36880342	36880342	-	rs722918596	INDEL	intron_variant
5	36880381	36880381	A	rs516504784	SNV	intron_variant
5	36880394	36880394	G	rs520051239	SNV	intron_variant
5	36880418	36880418	A	rs525067071	SNV	intron_variant
5	36880427	36880427	A	rs518531987	SNV	intron_variant
5	36880450	36880450	G	rs716673523	SNV	intron_variant
5	36880470	36880470	T	rs719706784	SNV	intron_variant
5	36880487	36880487	G	rs717610108	INDEL	intron_variant
5	36880515	36880516	-	rs720782368	INDEL	intron_variant
5	36880544	36880544	G	rs715038354	SNV	intron_variant
5	36880574	36880574	G	rs718210226	SNV	intron_variant
5	36880611	36880611	T	rs722614546	SNV	intron_variant
5	36880649	36880649	G	rs211041232	SNV	intron_variant
5	36880653	36880653	A	rs520673302	SNV	intron_variant
5	36880687	36880687	T	rs525621390	SNV	intron_variant
5	36880772	36880772	T	rs517721972	SNV	intron_variant
5	36880783	36880783	A	rs719881893	SNV	intron_variant
5	36880830	36880830	G	rs721725937	SNV	intron_variant
5	36880836	36880836	G	rs522758367	SNV	intron_variant
5	36880872	36880872	A	rs526341470	SNV	intron_variant
5	36880882	36880882	T	rs720928027	SNV	intron_variant
5	36880888	36880888	A	rs518342246	SNV	intron_variant
5	36880940	36880940	C	rs718270606	SNV	intron_variant
5	36880967	36880967	G	rs442227043	SNV	intron_variant
5	36881063	36881063	T	rs521911658	SNV	intron_variant
5	36881083	36881083	A	rs720836303	SNV	intron_variant
5	36881099	36881099	C	rs714339110	SNV	intron_variant
5	36881100	36881100	T	rs718816152	SNV	intron_variant
5	36881156	36881156	G	rs526876835	SNV	intron_variant
5	36881174	36881174	A	rs716201538	SNV	intron_variant

5	36881175	36881175	G	rs719265755	SNV	intron_variant
5	36881188	36881188	A	rs722471426	SNV	intron_variant
5	36881200	36881200	G	rs715344459	SNV	intron_variant
5	36881274	36881274	T	rs461781532	SNV	intron_variant
5	36881359	36881359	C	rs481974496	SNV	intron_variant
5	36881407	36881407	T	rs525985886	SNV	intron_variant
5	36881432	36881432	G	rs444141582	SNV	intron_variant
5	36881488	36881488	G	rs723518845	SNV	intron_variant
5	36881488	36881488	C	rs723518845	SNV	intron_variant
5	36881506	36881506	T	rs715339221	SNV	intron_variant
5	36881524	36881524	C	rs717803153	SNV	intron_variant
5	36881627	36881627	C	rs523052579	SNV	intron_variant
5	36881631	36881631	A	rs516564151	SNV	intron_variant
5	36881662	36881662	C	rs717080470	SNV	intron_variant
5	36881694	36881694	A	rs724018916	SNV	intron_variant
5	36881697	36881697	G	rs716995386	SNV	intron_variant
5	36881699	36881699	A	rs721400506	SNV	intron_variant
5	36881716	36881716	G	rs718986102	SNV	intron_variant
5	36881731	36881731	C	rs717533165	SNV	intron_variant
5	36881768	36881768	C	rs520112295	SNV	intron_variant
5	36881881	36881881	C	rs523654647	SNV	intron_variant
5	36881892	36881892	G	rs714296135	INDEL	intron_variant
5	36881914	36881914	G	rs718667078	SNV	intron_variant
5	36881968	36881968	G	rs720606350	SNV	intron_variant
5	36882040	36882040	C	rs515739894	SNV	intron_variant
5	36882100	36882100	T	rs718015434	SNV	intron_variant
5	36882128	36882128	G	rs520703845	SNV	intron_variant
5	36882180	36882180	T	rs722443438	SNV	intron_variant
5	36882182	36882182	G	rs715380880	SNV	intron_variant
5	36882204	36882204	A	rs718491618	SNV	intron_variant
5	36882223	36882223	G	rs457724196	SNV	intron_variant
5	36882252	36882252	G	rs517779032	SNV	intron_variant
5	36882262	36882262	C	rs521363905	SNV	intron_variant
5	36882303	36882303	A	rs524956227	SNV	intron_variant
5	36882327	36882327	G	rs715454629	SNV	intron_variant
5	36882331	36882331	A	rs440504850	SNV	intron_variant
5	36882351	36882351	C	rs518399804	SNV	intron_variant
5	36882455	36882455	A	rs462650558	SNV	intron_variant
5	36882487	36882487	T	rs477834803	SNV	intron_variant
5	36882516	36882516	C	rs723377621	SNV	intron_variant
5	36882548	36882548	C	rs717592013	SNV	intron_variant
5	36882635	36882635	A	rs380395639	SNV	intron_variant
5	36882798	36882798	T	rs723627353	SNV	intron_variant
5	36882836	36882836	A	rs716482437	SNV	intron_variant
5	36882911	36882911	T	rs720696279	SNV	intron_variant

5	36882919	36882919	C	rs525442190	SNV	intron_variant
5	36882921	36882921	A	rs719699185	SNV	intron_variant
5	36882992	36882992	C	rs517539821	SNV	intron_variant
5	36883004	36883004	C	rs522513732	SNV	intron_variant
5	36883032	36883032	T	rs480440224	SNV	intron_variant
5	36883074	36883074	G	rs526054003	SNV	intron_variant
5	36883093	36883093	A	rs717609917	SNV	intron_variant
5	36883115	36883115	T	rs519567923	SNV	intron_variant
5	36883237	36883237	A	rs449080520	SNV	intron_variant
5	36883256	36883256	G	rs718210079	SNV	intron_variant
5	36883269	36883269	C	rs721258930	SNV	intron_variant
5	36883274	36883274	A	rs450726437	SNV	intron_variant
5	36883312	36883312	G	rs518730800	SNV	intron_variant
5	36883382	36883382	C	rs718598122	SNV	intron_variant
5	36883413	36883413	T	rs523748934	SNV	intron_variant
5	36883448	36883448	C	rs135996383	SNV	intron_variant
5	36883617	36883617	C	rs723911057	SNV	intron_variant
5	36883771	36883771	C	rs519341519	SNV	intron_variant
5	36883820	36883820	T	rs716906725	SNV	intron_variant
5	36883831	36883831	A	rs720107758	SNV	intron_variant
5	36883836	36883836	A	rs723887032	SNV	intron_variant
5	36883917	36883917	G	rs437285000	SNV	intron_variant
5	36884085	36884085	A	rs524295279	SNV	intron_variant
5	36884114	36884114	A	rs714178674	SNV	intron_variant
5	36884169	36884169	T	rs457314618	SNV	intron_variant
5	36884291	36884291	G	rs464377043	SNV	intron_variant
5	36884473	36884473	G	rs516382381	SNV	intron_variant
5	36884574	36884574	C	rs722883040	SNV	intron_variant
5	36884662	36884662	A	rs715874220	SNV	intron_variant
5	36884699	36884699	A	rs714590158	SNV	intron_variant
5	36884720	36884720	A	rs720168149	SNV	intron_variant
5	36884730	36884730	C	rs521424994	SNV	intron_variant
5	36884768	36884768	T	rs525013829	SNV	intron_variant
5	36884801	36884801	T	rs716437053	SNV	intron_variant
5	36884835	36884835	T	rs719549110	SNV	intron_variant
5	36884867	36884867	A	rs722701759	SNV	synonymous_variant
5	36885035	36885035	G	rs717551360	SNV	splice_region_variant
5	36885044	36885044	-	rs720118037	INDEL	intron_variant
5	36885112	36885112	A	rs719521075	SNV	intron_variant
5	36885227	36885227	-	rs715570431	INDEL	intron_variant
5	36885248	36885248	A	rs716880603	SNV	intron_variant
5	36885272	36885272	C	rs723121870	SNV	intron_variant
5	36885303	36885303	A	rs433172183	SNV	intron_variant
5	36885396	36885396	A	rs714235193	SNV	intron_variant
5	36885412	36885412	G	rs717448448	SNV	intron_variant

5	36885439	36885439	A	rs720476829	SNV	intron_variant
5	36885447	36885447	A	rs714830832	SNV	intron_variant
5	36885465	36885465	T	-	SNV	intron_variant
5	36885465	36885465	G	rs718060376	SNV	intron_variant
5	36885468	36885468	T	rs722410492	SNV	intron_variant
5	36885501	36885501	T	rs714142553	SNV	intron_variant
5	36885531	36885531	T	rs718340903	SNV	intron_variant
5	36885532	36885532	A	rs718482283	SNV	intron_variant
5	36885537	36885537	A	rs715713251	SNV	intron_variant
5	36885574	36885574	A	rs383904262	SNV	intron_variant
5	36885580	36885580	T	rs516990837	SNV	intron_variant
5	36885615	36885615	G	rs520527913	SNV	intron_variant
5	36885652	36885652	A	rs525548343	SNV	intron_variant
5	36885667	36885667	A	rs209072107	SNV	intron_variant
5	36885669	36885669	T	rs719396077	SNV	intron_variant
5	36885744	36885744	G	rs453451587	SNV	intron_variant
5	36885805	36885805	G	rs207673664	SNV	intron_variant
5	36885882	36885882	C	rs522599856	SNV	intron_variant
5	36885954	36885954	A	rs134335748	SNV	intron_variant
5	36885972	36885972	C	rs524686892	SNV	intron_variant
5	36885978	36885978	T	rs723955527	SNV	intron_variant
5	36885986	36885986	C	rs518186290	SNV	intron_variant
5	36886001	36886001	A	rs722998491	SNV	intron_variant
5	36886043	36886043	G	rs442149614	SNV	intron_variant
5	36886191	36886191	T	rs210487838	SNV	intron_variant
5	36886213	36886213	C	rs455914684	SNV	intron_variant
5	36886284	36886284	T	rs476048582	SNV	intron_variant
5	36886413	36886413	C	rs721489724	SNV	intron_variant
5	36886425	36886425	T	rs380202114	SNV	intron_variant
5	36886478	36886478	G	rs526714158	INDEL	intron_variant
5	36886533	36886533	C	rs518799361	SNV	intron_variant
5	36886536	36886536	A	rs522336399	SNV	intron_variant
5	36886590	36886590	G	rs721243764	SNV	intron_variant
5	36886634	36886634	-	rs722546553	INDEL	intron_variant
5	36886646	36886646	T	rs109963247	SNV	intron_variant
5	36886647	36886647	A	rs483116095	SNV	intron_variant
5	36886660	36886660	TG	rs135352963	INDEL	intron_variant
5	36886665	36886665	T	rs722526673	SNV	intron_variant
5	36886763	36886763	T	rs519378404	SNV	intron_variant
5	36886830	36886830	C	rs381655793	SNV	intron_variant
5	36886841	36886841	A	rs721586537	SNV	intron_variant
5	36886964	36886964	C	rs516437582	SNV	intron_variant
5	36886989	36886989	G	rs136490600	SNV	intron_variant
5	36886992	36886992	-	rs136472104	INDEL	intron_variant
5	36887103	36887103	C	rs378593349	SNV	intron_variant

5	36887193	36887193	G	rs381730723	SNV	intron_variant
5	36887195	36887195	C	rs457862797	SNV	intron_variant
5	36887322	36887322	C	rs719101771	SNV	intron_variant
5	36887334	36887334	T	rs723501591	SNV	intron_variant
5	36887356	36887356	G	rs520606247	SNV	intron_variant
5	36887580	36887580	C	rs379484488	SNV	intron_variant
5	36887608	36887608	T	rs381339838	SNV	intron_variant
5	36887620	36887620	C	rs715661927	SNV	intron_variant
5	36887716	36887716	A	rs440046640	SNV	intron_variant
5	36887744	36887744	C	rs456592337	SNV	intron_variant
5	36887841	36887841	G	rs716239124	SNV	intron_variant
5	36887859	36887859	T	rs521188047	SNV	intron_variant
5	36887892	36887892	G	rs718191071	SNV	intron_variant
5	36887917	36887917	C	rs722605067	SNV	intron_variant
5	36887919	36887919	C	rs714314925	SNV	intron_variant
5	36887967	36887967	G	rs718766814	SNV	intron_variant
5	36888029	36888029	C	rs722577537	SNV	intron_variant
5	36888041	36888041	C	rs719432581	SNV	intron_variant
5	36888086	36888086	T	rs719929945	SNV	intron_variant
5	36888124	36888124	C	rs721782573	SNV	intron_variant
5	36888169	36888169	A	rs723751538	SNV	intron_variant
5	36888170	36888170	T	rs460362458	SNV	intron_variant
5	36888226	36888226	-	rs474701268	INDEL	intron_variant
5	36888228	36888228	C	rs207749044	SNV	intron_variant
5	36888238	36888238	A	rs136554098	SNV	intron_variant
5	36888257	36888257	G	rs723575845	SNV	intron_variant
5	36888366	36888366	T	rs717758368	SNV	intron_variant
5	36888631	36888631	C	rs716848675	SNV	intron_variant
5	36888664	36888664	C	rs721191583	SNV	intron_variant
5	36888734	36888734	A	rs716978039	INDEL	intron_variant
5	36888761	36888761	T	rs525335134	SNV	intron_variant
5	36888855	36888855	A	rs480551918	SNV	intron_variant
5	36888931	36888931	A	rs449132101	SNV	intron_variant
5	36888941	36888941	A	rs469194400	SNV	intron_variant
5	36888971	36888971	G	rs482923855	SNV	intron_variant
5	36889016	36889016	T	rs718712648	SNV	intron_variant
5	36889079	36889079	-	rs450874984	INDEL	intron_variant
5	36889166	36889166	G	rs716113076	SNV	intron_variant
5	36889170	36889170	C	rs721008400	SNV	intron_variant
5	36889318	36889318	T	rs722380623	SNV	intron_variant
5	36889480	36889480	A	rs385350305	SNV	intron_variant
5	36889508	36889508	T	rs718421983	SNV	intron_variant
5	36889589	36889589	C	rs718963411	SNV	intron_variant
5	36889669	36889669	A	rs722942681	SNV	intron_variant
5	36889701	36889701	T	rs716537808	SNV	intron_variant

5	36889797	36889797	T	rs464512205	SNV	intron_variant
5	36889852	36889852	A	rs433111591	SNV	intron_variant
5	36889961	36889961	C	rs446806716	SNV	intron_variant
5	36890079	36890079	-	rs466980285	INDEL	intron_variant
5	36890275	36890275	-	rs723296686	INDEL	intron_variant
5	36890276	36890276	A	rs715512822	SNV	intron_variant
5	36890296	36890296	C	rs720023593	SNV	intron_variant
5	36890498	36890498	C	rs717656620	SNV	intron_variant
5	36890505	36890505	A	rs43434315	SNV	intron_variant
5	36890542	36890542	G	rs435880124	SNV	intron_variant
5	36890689	36890689	A	rs720534145	SNV	intron_variant
5	36890731	36890731	T	rs379423878	SNV	intron_variant
5	36890778	36890778	G	rs456003628	SNV	intron_variant
5	36890855	36890855	T	rs208356133	SNV	intron_variant
5	36891046	36891046	A	rs382390229	SNV	intron_variant
5	36891060	36891060	T	rs476031435	SNV	intron_variant
5	36891076	36891076	A	rs718564088	SNV	intron_variant
5	36891137	36891137	C	rs478972740	SNV	intron_variant
5	36891144	36891144	C	rs715983684	SNV	intron_variant
5	36891336	36891336	G	rs719141642	SNV	intron_variant
5	36891421	36891421	A	rs481381131	INDEL	intron_variant
5	36891464	36891464	C	rs209201483	SNV	intron_variant
5	36891482	36891482	A	rs720198728	SNV	intron_variant
5	36891518	36891518	A	rs718921485	SNV	intron_variant
5	36891522	36891522	C	rs526651134	SNV	intron_variant
5	36891703	36891703	G	rs518648162	SNV	intron_variant
5	36891971	36891971	A	rs718227851	SNV	intron_variant
5	36892020	36892020	T	rs384909351	SNV	intron_variant
5	36892137	36892137	C	rs716935500	SNV	intron_variant
5	36892317	36892317	C	rs527180792	SNV	intron_variant
5	36892405	36892405	C	rs715623292	SNV	intron_variant
5	36892455	36892455	A	rs720136360	SNV	intron_variant
5	36892562	36892562	A	rs721924178	SNV	intron_variant
5	36892600	36892600	-	rs714174260	INDEL	intron_variant
5	36892865	36892865	C	rs716179500	SNV	intron_variant
5	36892876	36892876	T	rs137482308	SNV	intron_variant
5	36892908	36892908	T	rs524231583	SNV	intron_variant
5	36892929	36892929	A	rs516265190	SNV	intron_variant
5	36893133	36893133	C	rs719796658	SNV	intron_variant
5	36893143	36893143	A	rs378057914	SNV	intron_variant
5	36893185	36893185	T	rs451386263	SNV	intron_variant
5	36893243	36893243	G	rs471503123	SNV	intron_variant
5	36893271	36893271	A	rs521272272	SNV	intron_variant
5	36893284	36893284	A	rs523357266	INDEL	intron_variant
5	36893295	36893295	C	rs714553466	SNV	intron_variant

5	36893307	36893307	A	rs516864871	SNV	intron_variant
5	36893353	36893353	-	rs520413096	INDEL	intron_variant
5	36893354	36893354	A	rs525390695	SNV	intron_variant
5	36893385	36893385	A	rs720803182	SNV	intron_variant
5	36893403	36893403	A	rs517474812	SNV	intron_variant
5	36893426	36893426	C	rs521012196	INDEL	intron_variant
5	36893490	36893490	C	rs380815876	SNV	intron_variant
5	36893528	36893528	T	rs718341048	SNV	intron_variant
5	36893529	36893529	A	rs722727631	SNV	intron_variant
5	36893589	36893589	A	rs524586848	SNV	intron_variant
5	36893650	36893650	A	rs518063205	SNV	intron_variant
5	36893652	36893652	G	rs521673000	SNV	intron_variant
5	36893689	36893689	G	rs714758656	INDEL	intron_variant
5	36893709	36893709	A	rs526707120	SNV	intron_variant
5	36893782	36893782	A	rs717887843	SNV	intron_variant
5	36893796	36893796	T	rs517245169	SNV	intron_variant
5	36893861	36893861	C	rs714062910	SNV	intron_variant
5	36893912	36893912	A	rs522272124	SNV	intron_variant
5	36893922	36893922	G	rs527187619	SNV	intron_variant
5	36893929	36893929	C	rs716493019	SNV	intron_variant
5	36893941	36893941	G	rs439985184	SNV	intron_variant
5	36893953	36893953	A	rs524237382	SNV	intron_variant
5	36894067	36894067	C	rs526406313	SNV	intron_variant
5	36894230	36894230	G	rs132837151	SNV	intron_variant
5	36894290	36894290	C	rs442696024	SNV	intron_variant
5	36894292	36894292	T	rs723280097	SNV	intron_variant
5	36894853	36894853	C	rs717544517	SNV	intron_variant
5	36894879	36894879	C	rs516922209	SNV	intron_variant
5	36894990	36894990	T	rs462837534	INDEL	intron_variant
5	36895019	36895019	G	rs524052495	SNV	intron_variant
5	36895152	36895153	AA	rs720606103	INDEL	intron_variant
5	36895154	36895155	AT	rs516085441	INDEL	intron_variant
5	36895527	36895527	-	rs521094911	INDEL	intron_variant
5	36895543	36895543	T	rs721100904	SNV	intron_variant
5	36895547	36895547	C	rs714101117	SNV	intron_variant
5	36895593	36895593	G	rs134082738	SNV	intron_variant
5	36895636	36895636	G	rs482593550	SNV	intron_variant
5	36895761	36895761	G	rs797449358	SNV	intron_variant
5	36895866	36895866	G	rs210597955	SNV	synonymous_variant
5	36895982	36895982	G	rs445012020	SNV	intron_variant
5	36896031	36896031	A	rs458036293	SNV	intron_variant
5	36896085	36896085	T	rs714974389	SNV	intron_variant
5	36896086	36896086	A	rs718179911	SNV	intron_variant
5	36896101	36896102	TT	-	INDEL	intron_variant
5	36896101	36896101	T	rs722069705	INDEL	intron_variant



5	36896110	36896110	C	rs377983203	SNV	intron_variant
5	36896124	36896124	A	rs17870307	SNV	intron_variant
5	36896178	36896178	T	rs522335594	SNV	intron_variant
5	36896182	36896182	A	rs722483146	SNV	intron_variant
5	36896217	36896217	G	rs478110463	SNV	intron_variant
5	36896387	36896387	A	rs446943598	SNV	missense_variant
5	36896523	36896523	C	rs209863301	SNV	intron_variant
5	36896556	36896556	C	rs715985252	SNV	intron_variant
5	36896557	36896557	A	rs719206431	SNV	intron_variant
5	36896738	36896738	C	rs723645212	SNV	intron_variant
5	36896849	36896849	T	rs715281787	SNV	intron_variant
5	36896935	36896935	T	rs719757737	SNV	intron_variant
5	36896938	36896938	A	rs207739687	SNV	intron_variant
5	36897056	36897056	C	rs517888312	SNV	intron_variant
5	36897092	36897092	T	rs210771759	SNV	intron_variant
5	36897262	36897262	C	rs526405865	SNV	intron_variant
5	36897263	36897263	A	rs519928492	SNV	intron_variant
5	36897272	36897272	G	rs522036560	SNV	intron_variant
5	36897338	36897338	T	rs527014796	SNV	synonymous_variant
5	36897410	36897410	T	rs470697074	SNV	synonymous_variant
5	36897520	36897520	A	rs43434313	SNV	intron_variant
5	36897556	36897556	T	rs718126383	SNV	intron_variant
5	36897598	36897598	C	-	SNV	intron_variant
5	36897598	36897598	A	rs432128006	SNV	intron_variant
5	36897645	36897645	A	rs714229066	SNV	intron_variant
5	36897646	36897646	A	rs718739321	SNV	intron_variant
5	36897655	36897655	C	rs519681368	SNV	intron_variant
5	36897692	36897692	-	rs523272661	INDEL	intron_variant
5	36897709	36897709	A	rs209089198	SNV	intron_variant
5	36897714	36897714	T	rs716093872	SNV	intron_variant
5	36897951	36897951	C	rs449540752	SNV	intron_variant
5	36898031	36898031	A	rs469681783	SNV	intron_variant
5	36898041	36898041	A	rs515909200	SNV	intron_variant
5	36898071	36898071	G	rs520946021	SNV	intron_variant
5	36898075	36898075	A	rs438167037	SNV	intron_variant
5	36898087	36898087	T	rs441659479	SNV	intron_variant
5	36898095	36898095	T	rs521493054	SNV	intron_variant
5	36898122	36898122	A	rs525074584	SNV	intron_variant
5	36898229	36898229	A	rs518545494	SNV	intron_variant
5	36898260	36898260	G	rs522091682	SNV	intron_variant
5	36898271	36898271	C	rs716971807	SNV	intron_variant
5	36898313	36898313	A	rs721273673	SNV	intron_variant
5	36898423	36898423	T	rs714338920	SNV	intron_variant
5	36898537	36898537	G	rs714429189	SNV	intron_variant
5	36898540	36898540	G	rs527072691	SNV	intron_variant

5	36898571	36898571	A	rs451927512	SNV	intron_variant
5	36898647	36898647	C	rs519149196	SNV	intron_variant
5	36898775	36898775	A	rs714919687	SNV	intron_variant
5	36898820	36898820	T	rs135942912	SNV	intron_variant
5	36898824	36898824	C	rs526228866	SNV	intron_variant
5	36898894	36898894	A	rs519764355	SNV	intron_variant
5	36898926	36898926	T	rs523298371	SNV	intron_variant
5	36899002	36899002	T	rs384364816	SNV	intron_variant
5	36899026	36899026	T	rs719751831	SNV	intron_variant
5	36899030	36899030	G	rs472033712	SNV	intron_variant
5	36899169	36899169	T	rs717188534	INDEL	intron_variant
5	36899178	36899178	T	rs450388162	INDEL	intron_variant
5	36899199	36899199	T	rs209175603	SNV	intron_variant
5	36899200	36899200	A	rs523988381	SNV	intron_variant
5	36899202	36899202	T	rs515964814	SNV	intron_variant
5	36899261	36899261	T	rs520946806	SNV	intron_variant
5	36899280	36899280	C	rs714439313	SNV	intron_variant
5	36899435	36899435	C	rs523096389	SNV	intron_variant
5	36899487	36899487	T	rs721964095	SNV	intron_variant
5	36899516	36899516	T	rs516571038	SNV	intron_variant
5	36899518	36899518	C	rs717072834	SNV	intron_variant
5	36899537	36899537	C	rs520133778	SNV	intron_variant
5	36899547	36899547	G	rs525098428	SNV	intron_variant
5	36899662	36899662	C	rs517170275	SNV	intron_variant
5	36899674	36899674	C	rs520723736	SNV	intron_variant
5	36899754	36899754	T	rs525695344	SNV	intron_variant
5	36899759	36899759	A	rs716810353	SNV	intron_variant
5	36899803	36899803	C	rs433651701	SNV	intron_variant
5	36899816	36899816	T	rs714193222	SNV	intron_variant
5	36899823	36899823	G	rs453776547	SNV	intron_variant
5	36899836	36899836	C	rs721769272	SNV	intron_variant
5	36900047	36900047	C	rs473804650	SNV	intron_variant
5	36900074	36900074	T	rs721566910	SNV	synonymous_variant
5	36900242	36900242	T	rs717841797	SNV	intron_variant
5	36900422	36900422	T	rs717698968	SNV	intron_variant
5	36900476	36900476	A	rs208221382	SNV	intron_variant
5	36900525	36900525	A	rs517769483	SNV	intron_variant
5	36900539	36900555	-	rs522752882	INDEL	intron_variant
5	36900682	36900682	-	rs718182855	INDEL	intron_variant
5	36900818	36900818	G	rs526342344	SNV	intron_variant
5	36900867	36900867	A	rs442411597	SNV	intron_variant
5	36900916	36900916	A	rs723316268	SNV	intron_variant
5	36900925	36900925	G	rs717626118	SNV	intron_variant
5	36900953	36900953	T	rs518364278	SNV	intron_variant
5	36900995	36900995	A	rs521945035	SNV	intron_variant

5	36900996	36900996	C	rs382591177	SNV	intron_variant
5	36901013	36901013	T	rs716913566	SNV	intron_variant
5	36901077	36901077	T	rs462813329	SNV	intron_variant
5	36901087	36901087	A	rs476322867	SNV	intron_variant
5	36901121	36901121	C	rs524043181	SNV	intron_variant
5	36901129	36901129	T	rs526171059	SNV	intron_variant
5	36901145	36901145	T	rs438511728	SNV	intron_variant
5	36901154	36901154	C	rs523120654	SNV	intron_variant
5	36901164	36901164	C	rs516645233	SNV	intron_variant
5	36901390	36901390	G	rs458569005	INDEL	intron_variant
5	36901434	36901434	T	rs478649834	SNV	intron_variant
5	36901484	36901484	T	rs446921337	SNV	intron_variant
5	36901521	36901521	C	rs132981883	SNV	intron_variant
5	36901542	36901545	-	rs380202447	INDEL	intron_variant
5	36901636	36901636	A	rs382267310	SNV	intron_variant
5	36901650	36901650	A	rs385762758	SNV	intron_variant
5	36901678	36901678	C	rs460624180	SNV	intron_variant
5	36901900	36901900	T	rs718628451	SNV	intron_variant
5	36902001	36902001	G	rs515799531	SNV	intron_variant
5	36902081	36902081	T	rs480615466	SNV	intron_variant
5	36902100	36902100	-	rs717885799	INDEL	intron_variant
5	36902102	36902102	A	rs449199383	SNV	intron_variant
5	36902153	36902153	G	rs469630961	SNV	intron_variant
5	36902308	36902308	A	rs483284597	SNV	intron_variant
5	36902360	36902360	C	rs137127026	SNV	intron_variant
5	36902362	36902362	T	rs209471948	SNV	intron_variant
5	36902372	36902372	G	rs465547182	SNV	intron_variant
5	36902390	36902390	T	rs723991683	SNV	intron_variant
5	36902570	36902570	C	rs524909295	SNV	intron_variant
5	36902675	36902675	G	rs434194525	SNV	intron_variant
5	36902728	36902728	T	rs132910684	SNV	intron_variant
5	36902744	36902744	G	rs717566118	SNV	intron_variant
5	36902810	36902810	T	rs720684496	SNV	intron_variant
5	36902839	36902839	G	rs453762798	SNV	intron_variant
5	36902844	36902844	A	rs467454937	SNV	intron_variant
5	36902997	36902997	G	rs522648043	SNV	intron_variant
5	36903050	36903050	T	rs435945735	SNV	intron_variant
5	36903111	36903111	T	rs717972734	SNV	intron_variant
5	36903133	36903133	A	rs720366408	SNV	intron_variant
5	36903168	36903168	T	rs714563068	SNV	intron_variant
5	36903188	36903188	T	rs456068865	SNV	intron_variant
5	36903349	36903349	T	rs438647733	SNV	intron_variant
5	36903380	36903380	A	rs716407140	SNV	intron_variant
5	36903411	36903411	T	rs452320158	SNV	intron_variant
5	36903498	36903498	C	rs472179100	SNV	intron_variant

5	36903551	36903551	T	rs715708038	SNV	intron_variant
5	36903626	36903626	G	rs526712798	SNV	intron_variant
5	36903663	36903663	A	rs718792962	SNV	intron_variant
5	36903713	36903713	C	rs518809252	SNV	intron_variant
5	36903735	36903735	T	rs523776807	SNV	intron_variant
5	36903833	36903833	C	rs719463754	SNV	intron_variant
5	36903922	36903922	C	rs723826839	SNV	intron_variant
5	36903939	36903939	A	rs716866775	SNV	intron_variant
5	36903991	36903991	A	rs515854161	SNV	intron_variant
5	36904010	36904010	C	rs110100214	SNV	intron_variant
5	36904074	36904074	A	rs519400094	SNV	intron_variant
5	36904180	36904180	C	rs522939759	SNV	intron_variant
5	36904256	36904256	-	rs516467629	INDEL	intron_variant
5	36904267	36904267	C	rs136750656	SNV	intron_variant
5	36904296	36904296	C	rs441012097	SNV	intron_variant
5	36904365	36904365	C	rs460613494	SNV	intron_variant
5	36904387	36904387	A	rs480779278	SNV	intron_variant
5	36904452	36904452	G	rs517044723	SNV	intron_variant
5	36904472	36904472	T	rs455511201	SNV	intron_variant
5	36904491	36904491	G	rs525684837	SNV	intron_variant
5	36904612	36904612	G	rs517668587	SNV	intron_variant
5	36904645	36904645	T	rs798516303	SNV	intron_variant
5	36904711	36904714	-	rs137277082	INDEL	intron_variant
5	36904772	36904772	G	rs211655633	SNV	intron_variant
5	36904799	36904799	G	rs718974262	SNV	intron_variant
5	36904818	36904818	T	rs378578555	SNV	intron_variant
5	36904828	36904828	C	rs722745919	SNV	intron_variant
5	36904832	36904832	T	rs714401567	SNV	intron_variant
5	36904873	36904873	A	rs518258592	SNV	intron_variant
5	36904901	36904901	G	rs442959914	SNV	intron_variant
5	36905045	36905045	G	rs715660856	SNV	intron_variant
5	36905063	36905063	-	rs720032932	INDEL	intron_variant
5	36905074	36905074	C	rs723784036	SNV	intron_variant
5	36905281	36905281	T	rs211305061	SNV	intron_variant
5	36905339	36905339	G	rs518843123	SNV	intron_variant
5	36905403	36905403	T	rs522390572	SNV	intron_variant
5	36905420	36905420	T	rs109723722	SNV	intron_variant
5	36905575	36905575	T	rs715564080	SNV	intron_variant
5	36905620	36905620	T	rs720479514	SNV	intron_variant
5	36905777	36905777	G	rs377834723	SNV	intron_variant
5	36905798	36905798	T	rs801247905	SNV	intron_variant
5	36905807	36905807	A	rs714733118	SNV	intron_variant
5	36905819	36905819	G	rs522996776	SNV	intron_variant
5	36905862	36905862	-	rs474507766	INDEL	splice_donor_variant
5	36905918	36905918	A	rs518632821	SNV	5_prime_UTR_variant

5	36905962	36905962	T	rs714598252	SNV	-
5	36905982	36905982	T	rs523598216	SNV	-
5	36905983	36905983	C	rs517118706	SNV	-
5	36906019	36906019	A	rs520706548	SNV	-
5	36906030	36906030	A	rs525741554	SNV	-
5	36906050	36906050	G	rs516268099	SNV	-
5	36906096	36906096	G	rs462944600	SNV	-
5	36906113	36906113	T	rs524828467	SNV	-
5	36906154	36906154	G	rs208148414	SNV	-
5	36906177	36906177	A	rs518303800	SNV	-
5	36906213	36906213	T	rs798410378	SNV	-
5	36906221	36906221	T	rs521881484	SNV	-
5	36906298	36906298	G	rs525384670	SNV	-
5	36906320	36906320	G	rs517475277	SNV	-
5	36906349	36906349	C	rs43434312	SNV	-
5	36906354	36906354	T	rs717139032	SNV	-
5	36906363	36906363	G	rs720479114	SNV	-
5	36906388	36906388	T	rs525998180	SNV	-
5	36906390	36906390	G	rs208890523	SNV	-
5	36906461	36906461	C	rs445538677	SNV	-
5	36906513	36906513	G	rs465686036	SNV	-
5	36906537	36906537	C	rs718970224	SNV	-
5	36906544	36906544	T	rs722004150	SNV	-
5	36906553	36906553	C	rs715088026	SNV	-
5	36906726	36906726	T	rs479220711	SNV	-
5	36906746	36906746	C	rs526644393	SNV	-
5	36906754	36906754	C	rs447795715	SNV	-
5	36906856	36906856	C	rs467442075	SNV	-
5	36906871	36906871	G	rs721900398	SNV	-
5	36906927	36906927	A	rs436081598	SNV	-
5	36907157	36907157	T	rs715970968	SNV	-
5	36907262	36907262	G	rs525756791	SNV	-
5	36907389	36907389	T	rs210225083	SNV	-
5	36907457	36907457	T	rs524356172	SNV	-
5	36907474	36907475	-	rs719277079	INDEL	-
5	36907504	36907504	T	rs456249951	SNV	-
5	36907524	36907524	T	rs715389363	SNV	-
5	36907633	36907633	G	rs719823557	SNV	-
5	36907640	36907640	A	rs516323309	SNV	-
5	36907645	36907645	A	rs521366040	SNV	-
5	36907650	36907650	A	rs523426622	SNV	-
5	36907683	36907683	A	rs516945699	SNV	-
5	36907779	36907779	T	rs520472611	SNV	-
5	36907840	36907840	T	rs525493065	SNV	-
5	36907859	36907859	A	rs517530440	SNV	-

5	36907937	36907937	A	rs521085196	SNV	-
5	36908183	36908183	T	rs721487632	SNV	-
5	36908188	36908188	G	rs43434311	SNV	-
5	36908215	36908215	G	rs518129118	SNV	-
5	36908265	36908265	A	rs521705643	SNV	-
5	36908274	36908274	T	rs526646301	SNV	-
5	36908478	36908478	C	rs517309098	SNV	-
5	36908481	36908481	A	rs431978755	SNV	-
5	36908629	36908629	A	rs722637349	SNV	-
5	36908646	36908646	G	rs716184630	SNV	-
5	36908799	36908799	T	rs382074283	SNV	-
5	36908899	36908899	C	rs721842619	SNV	-
5	36908958	36908958	T	rs452260769	SNV	-
5	36908963	36908963	G	rs133401419	SNV	-
5	36908995	36908995	C	rs719917709	SNV	-
5	36909047	36909047	T	rs525930631	INDEL	-
5	36909245	36909246	AG	rs519376927	INDEL	-
5	36909318	36909318	-	rs719148879	INDEL	-
5	36909326	36909326	G	rs383806517	SNV	-
5	36909424	36909424	T	rs524417450	SNV	-
5	36909454	36909454	A	rs109132492	SNV	missense_variant
5	36909533	36909533	T	rs383804177	SNV	synonymous_variant
5	36909551	36909551	C	rs377988920	SNV	missense_variant
5	36909590	36909590	T	rs43434309	SNV	synonymous_variant
5	36909751	36909751	C	rs383012608	SNV	missense_variant
5	36909753	36909753	C	rs378070686	SNV	missense_variant
5	36909762	36909762	G	rs381232339	SNV	missense_variant
5	36909773	36909773	A	rs715089688	SNV	stop_gained
5	36909827	36909827	G	rs385050983	SNV	synonymous_variant
5	36909851	36909851	C	rs481754405	SNV	synonymous_variant
5	36909855	36909855	G	rs467161525	SNV	missense_variant
5	36909929	36909929	T	rs379546529	SNV	synonymous_variant
5	36910146	36910146	C	rs382197525	SNV	missense_variant
5	36910148	36910148	G	rs385210362	SNV	synonymous_variant
5	36910290	36910290	C	rs440683077	SNV	missense_variant
5	36910292	36910292	G	rs473494763	SNV	missense_variant
5	36910310	36910310	A	rs463079457	SNV	synonymous_variant
5	36910311	36910311	A	rs439120115	SNV	missense_variant
5	36910330	36910330	C	rs520551048	SNV	missense_variant
5	36910413	36910413	G	rs378919205	SNV	intron_variant
5	36910433	36910433	G	rs382222047	SNV	intron_variant
5	36910492	36910492	C	rs385093196	SNV	intron_variant
5	36910538	36910538	C	rs379392145	SNV	intron_variant
5	36910602	36910602	C	rs381924352	SNV	intron_variant
5	36910688	36910688	G	rs385783483	SNV	intron_variant

5	36910707	36910707	C	rs380382970	SNV	intron_variant
5	36910775	36910775	G	rs518184296	SNV	intron_variant
5	36910857	36910857	A	rs461497288	SNV	intron_variant
5	36910892	36910892	G	rs211069938	SNV	intron_variant
5	36910894	36910895	-	rs383828118	INDEL	intron_variant
5	36910897	36910897	T	rs482085638	SNV	intron_variant
5	36910923	36910923	G	rs385791426	SNV	intron_variant

