

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Polymorfismus genů pro faktory přirozené imunity u
modelové populace skotu**

Diplomová práce

Autor práce: Ing. Bc. Terezie Valčíková

Obor studia: Biotechnologie a šlechtění zvířat

Vedoucí práce: Prof. Ing. Josef Příbyl, DrSc.

© 2017/2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Polymorfismus genů pro faktory přirozené imunity u modelové populace skotu" jsem vypracovala 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 autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Prof. Ing. Josefu Příbylovi, DrSc., Karlu Novákovi, prom.biol., CSc. za odborné vedení a podporu při psaní diplomové práce. Dále Petře Kastlové, Ing. Jan Valčíkovi a celé své rodině za pomoc, ochotu a podporu.

Polymorfismus genů pro faktory přirozené imunity u modelové populace skotu

Souhrn

Přirozená (vrozená) imunita využívá receptory, které se podílejí na rozpoznávání bakteriálních, virových, houbových a parazitárních struktur. Na rozdíl od získané imunity tyto geny netvoří varianty v průběhu vývoje jedince, přesto jejich variabilita v populaci umožňuje adaptaci na změny v infekčním prostředí. Jednou z hlavních součástí vrozené imunity jsou Toll-like receptory, které na povrchu lymfocytů a dendritických buněk hrají klíčovou roli při rozpoznávání antigenních látek. Toll-like receptory (TLR) rozpoznávají struktury asociované s patogeny a dle své specifity jsou děleny primárně na antivirové a antibakteriální.

Diplomová práce se zabývala geny pro receptory TLR1 a TLR4 a pro adaptér MYD88. Je to adaptér, který přímo interaguje s vnitrobuněčnou částí TLR4 a zajišťuje tak přenos signálu dále do buňky.

DNA byla izolována z inseminačních dávek 150 býků pomocí magnetické separační metody. Zvolené geny byly amplifikovány pomocí PCR a produkty byly následně sekvenovány vysokokapacitní metodou (NGS, Next Generation Sequencing) pomocí technologie Pacific Biosciences. Po vyhodnocení polymorfismu na úrovni populace byly pro jednotlivé strukturní varianty navrženy genotypovací reakce. S jejich pomocí byly předpokládané mutace validovány a byly určeny genotypy v populaci krav.

Polymorfismy s možnými funkčními dopady v bílkovinném produktu byly zhodnoceny pomocí predikčních programů.

Klíčová slova: Toll-like receptory, Přirozená imunita, Český strakatý skot, NGS, Geny Imunity

Gene polymorphism of innate immunity factors in cattle model population

Summary

Innate (native) immunity uses receptors contributing in recognition of bacterial, viral, fungal and parasitic structures. Unlike adaptive immunity those genes do not vary during the development of an individual, nevertheless their variability in population allows adaptation to infectious environment. Toll-like receptors are one of the main part of innate immunity, playing key role in antigens recognition on the lymphocyte and dendritic cells surface. Toll-like receptors (TLR) recognize characteristic structures associated with pathogens. They are split primarily to antiviral and antibacterial.

Scope of this diploma thesis are the TLR1 and TLR4 receptors and the MYD88 adapter. The MYD88 adapter interacts with the TLR4 inner body and ensures signal transfer deeper into a cell.

DNA was isolated from blood of 150 bulls by means of magnetic separation method. Chosen genes were amplified with PCR in the population of bulls and the products were afterward sequenced by Next Generation Sequencing (NGS), using the Pacific Biosciences technology. In the next step particular genotype reactions were used for polymorphism assessment within the studied population. The genotyping reactions were used to validate expected mutations and to define genotypes of the given cow population.

Polymorphisms with potential functional impact on protein products were assessed with the software prediction tools.

Keywords: Toll-like Receptors, Innate immunity, Fleckvieh breed, NGS, Immunity Genes

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Cíl práce	3
3.	Přehled literatury (literární rešerše)	4
3.1	Plemeno českého strakatého skotu (ČESTR)	4
3.2	Druhy imunitní reakce organismu	6
3.2.1	Získaná imunita	6
3.2.2	Vrozená imunita	7
3.3	Bovinní Toll-like receptory	8
3.3.1	Struktura a diverzita TLR	9
3.3.2	TLR1	10
3.3.2.1	Struktura genu TLR1 a produktu	10
3.3.2.2	Strukturní a funkční variabilita TLR 1 u skotu	13
3.3.3	TLR4	16
3.3.3.1	Struktura bovinního genu TLR4 a produktu	16
3.3.3.2	Strukturní a funkční variabilita genu TLR4	19
3.3.4	Molekula MyD88	24
3.3.4.1	Struktura genu MyD88 a produktu	24
3.3.4.2	Diverzita a funkční interakce s MyD88	29
3.3.5	Signalizační kaskáda receptorů Toll-Like	32
4	Materiál a metody	34
4.1	Izolace DNA	34
4.1.1	Kontrola preparátů DNA	35
4.2	Standardizace preparátů DNA	36
4.3	Amplifikace vybraných genů pomocí PCR	36
4.4	Návrh amplifikačních primerů	37
4.5	Příprava vzorku pro NGS	39
4.6	Zpracování výsledků NGS	40
4.7	Přímé určení haplotypů	40
4.8	Návrh a provedení genotypovacích reakcí	41
4.9	Analýza populačních dat vycházejících z reakcí SNaPshot	42
4.10	Modelace proteinových produktů a určení dopadů SNP na změnu struktury produktu	43
5	Výsledky	44

5.1	Příprava amplikonů TLR1 a TLR4 pro NGS	44
5.2.1	Amplifikace genu MyD88	44
5.3	Cílené sekvenování populačního vzorku	51
5.3.1	Knihovna gDNA	51
5.4	Zpracování dat NGS	52
5.4.1	Nalezené SNP	52
5.5	Porovnání nalezených polymorfismů s databázemi	54
5.6	Určení haplotypů v jednotlivých genech	58
5.6.1	Haplotypy genu MyD88	58
5.6.2	Haplotypy genu TLR4	63
5.6.3	Haplotypy genu TLR1	65
5.7	Genotypovací reakce	69
5.8	Výpočet populačních charakteristik	71
5.8.1	Gen TLR1	71
5.8.2	Gen TLR4	73
5.9	Struktura proteinů	75
5.9.1	Protein MyD88	75
5.9.2	Struktura proteinu TLR1	77
5.9.3	Struktura proteinu TLR4	80
5.10	Strukturní domény	84
5.10.1	MyD88	84
5.10.2	Protein TLR1	84
5.10.3	TLR4 protein	87
6.	Diskuze	91
6.1	Určení SNP změn	91
6.2	Určení haplotypů	92
6.3	Populační charakteristiky	93
6.4	Struktura proteinů	95
6.5	Ovlivnění proteinových domén aminokyselinovými záměnami	96
7.	Závěr	98
8.	Seznam literatury	100
9.	Seznam použitých zkratk a symbolů	111
10.	Samostatné přílohy	115
10.1	Kompletní přehled nalezených SNP v bovinním TLR1	115

10.2	Kompletní přehled nalezených SNP v bovinním TLR 4 genu	118
10.3	Kompletní přehled nalezených SNP v bovinním genu MyD88	126
10.4	Zdrojový Kód makra určeného pro porovnání SNP s databázemi	138
10.5	MyD88 SNP shodná s databázemi	139
10.6	Zdrojový Kód používaný pro úpravu nukleotidů při určování haplotypů	146
10.7	Výsledná vyhodnocená data z genotypovacích reakcí, gen TLR1	151
10.8	Výsledná vyhodnocená data z genotypovacích reakcí, gen TLR4	154

1. Úvod

Domestikovaná zvířata provází člověka značnou část našich dějin. Centra domestikace na planetě Zemi byla mnohá a zdá se, že mezi prvními domestikovanými zvířaty byl spolu s ovci a kozou také skot. Domestikovaná forma vychází z divokého prapředka pratura (*Bos primigenius*). Existují 2 domestikované taxony z něj vycházející, *Bos taurus* a *Bos indicus*.

V průběhu století prochází populace skotu několikrát významným snížením početnosti populací – tzv. bottlenecky, které výrazně snižují variabilitu uvnitř tohoto taxonu. Obavy ze snížení diverzity jsou spojovány i s moderními postupy v chovu mléčného skotu. Jako příklad uvádí studie (Taberlet et al., 2011) velikost efektivní populace Holštýnského skotu na světové úrovni, která byla vyčíslena na hodnotu okolo 50 jedinců, což odráží důsledky genetickému driftu a ztráty alel. Dále autoři předpokládají, že mnohá genetická onemocnění v současnosti se manifestující, stejně jako silné snížení fertility mohou být dány do souvislosti s omezenou velikostí efektivní populace.

V reakci na tuto situaci byl vytvořen program FAO na zachování genových zdrojů jednotlivých států. V něm si jednotlivé země chrání svá regionální plemena skotu a dalších zvířat s cílem uchovat jejich variabilitu a genetickou informaci pro možné využití v budoucnosti, pokud by se objevily takové podmínky, se kterými by si budoucí populace skotu neuměla poradit. V České republice je u skotu do genových zdrojů zařazeno plemeno český strakatý skot (ČESTR) a česká červinka.

Dnešní chov mléčného skotu využívá ke křížení a plánování budoucích generací mnohá sofistikovaná řešení. Uvedme například současný odhad plemenných hodnot a selekci na základě genomických dat. I když bylo dosaženo obrovského pokroku při zvýšení užitkovosti, zdá se, že se dnešní produkce znatelně přibližuje k fyziologickým limitům. Zvyšující se výskyt produkčních a metabolických poruch výrazně redukuje produkční dlouhověkost krav mléčného skotu. Náklady na léčbu produkčních chorob mají významný ekonomický dopad na mléčný průmysl. V reakci na tento vývoj se do popředí dostává selektivní chov, který se snaží zvýšit rezistenci proti onemocněním (Prajapati et al., 2017). Tento trend se ukazuje jako perspektivní a umožňuje nízkonákladovou a udržitelnou praxi. Ve snaze využít potenciál šlechtění ke zlepšení

zdravotního stavu bylo studováno mnoho kandidátních genů na asociaci k rezistenci nebo náchylnosti k určitým onemocněním.

Tato práce se zaměřila na geny přirozené infekční rezistence (imunity). Její variabilita je nepostradatelná při prvotním průniku patogenů do organismu, respektive při rychlé a adekvátní reakci na ně. Byly vybrány geny, jejichž produkty se přímo účastní rozpoznávání patogenů v organismu, respektive jejich typických strukturních motivů (PAMPs, pathogen associated molecular patterns) a geny dalších signálních molekul, které se aktivně podílí na přenosu tohoto signálu. Vybrané geny tedy mají radikální vliv na reakce přirozené imunity. Za důkaz lze považovat pozorování u modelových organismů (např. myš), kde jejich inaktivace vede k nulové mutaci, tedy úplné ztrátě funkce signalizační kaskády.

Tyto geny byly analyzovány a pro sekvenaci byla využita metoda Next Generation Sequencing, sekvenování nové generace (NGS). Práce vychází nejprve z podrobné analýzy genů v databázových systémech NCBI a Ensembl. Porovnáním referenčních sekvencí se sekvenovanými amplicony genů byl stanoven polymorfismus a četnost alelických variant jednotlivých SNP (single nucleotide polymorphism). V rámci práce byly identifikovány bloky mutací v rámci jednotlivých alel, tzv. haplotypy, na základě dlouhých přečtených úseků technologií PacBio a nezávisle také statistickým postupem na základě rovnováhy genotypů v populaci. Na základě sekvenačních dat byla provedena modelace proteinů ve snaze předpovědět funkční dopady jednotlivých záměn nukleotidů na proteinový produkt. Aplikace metod použitých v práci spolu s daty z prováděné asociační studie budou dále zpracovány pro korelaci genotypových variant a nalezení vztahu s infekční rezistencí.

2. Cíl práce

Cílem práce bylo provést určení variability ve vybraných genech pro složky přirozené imunity u populace plemene český strakatý skot. Na základě dat získaných cíleným resekvenováním pomocí NGS u reprezentativní subpopulace býků tohoto plemene (149 jedinců) mělo být provedeno vyhodnocení polymorfismu SNP (single nucleotide polymorphism, bodové mutace) v genech pro Toll-like receptory 1 a 4 (TLR1, TLR4) a myeloidního diferenciačního faktoru 88 (MyD88) a charakterizovat tak populační parametry těchto genů a haplotypovou strukturu, pokud ji není možné zjistit z výsledků NGS. U vybraných mutací bylo cílem popsat strukturu bílkovinného produktu a pochopit možné funkční změny.

3. Přehled literatury (literární rešerše)

Literární rešerše pojednává o plemeni českého strakatého skotu (dále jen ČESTR), přináší obecný úvod do imunity a následně se více věnuje vrozené imunitě, receptorům toll-like (dále TLR). Shrnuje výzkum na receptorech TLR1 a 4 a signální molekule MyD88, zabývá se popisem kaskády reakcí vedoucí od aktivaci TLR receptorů po proteinové produkty, které se účastní imunitní odpovědi organismu. U jednotlivých genů byly popsány jejich produkty s přihlédnutím k aktuálním informacím v databázích NCBI, Ensembl a BLAST.

3.1 Plemeno českého strakatého skotu (ČESTR)

Český strakatý skot patří do skupiny plemen horského strakatého typu, skupiny skotu čelnatého. Zemí původu plemen je Švýcarsko, údolí kolem řeky Simme v kantonu Bern. Odtud pochází souhrnný název pro tento skot, Simmental (Skládanka et al., 2014).

Jak napovídá popis plemene, hlavním areálem výskytu jsou výše položené a horské oblasti střední Evropy (Mátlová, 2015). Mezi spřízněná plemena řadíme německý strakatý skot (Deutsches Fleckvieh), rakouský strakatý skot (Österreichisches Fleckvieh), slovinský strakatý skot, maďarský strakatý skot (magyartarka), strakatý skot v Itálii (Pezzata rosa), Rumunsku a Bulharsku (Skládanka et al., 2014). Je spřízněn s některými francouzskými plemeny jako je například montbeliardský skot a abondanský skot.

Na počátku vzniku plemene stojí také původní domácí plemena převážně středoevropského červeného brachycerního skotu (dnes česká červinka). Ta byla od 19. století křížena s dovezenými býky švýcarského skotu různých rázů a zasáhly i první importy samičích zvířat. Na Moravě a ve východních Čechách se nejvíce choval skot bernsko-hanácký, kde základem importů byly bernské červeně strakaté varianty alpského strakatého skotu. Na severovýchodní Moravě a ve Slezsku to byl skot kravařský, jenž je typický pro bělohřbetost. Na Moravě se vyskytoval krajinný ráz hřbíneckého skotu charakteristický svou pláštěvě červenou barvou, bílou hlavou a barevnými skvrnami kolem očí. Z hřbíneckého rázu se do současnosti dochovala v programu genetických zdrojů linie LUCIAN (Mátlová, 2015).

Plemeno se dále vyvíjelo spíše izolovaně od ostatních plemen, ojediněle zasáhly importy strakatého plamene z Německa. Ve srovnání s ostatními územími byl jedinečný požadavek šlechtění na kombinovanou užitkovost. Po roce 1950 byly prováděny v rámci ČESTR různé typy křížení za účelem zlepšení mléčné užitkovosti. Výrazně plemeno ovlivnil býk Elsted

Buffon H 4078 plemene Ayshire a v roce 1959 se povedl import dalších deseti býků z Anglie. Toto křížení probíhalo ve východních Čechách (Rokytnice v Orlických horách). V oblasti Českomoravské vrchoviny byl ČESTR křížen s plemenem švédské červenobílé, což se nakonec ukázalo jako slepá ulička. V 70. letech se provádělo křížení s býky červeného holštýnského skotu a s býky Ayrshire. Široké využívání importovaných býků plemen Fleckvieh a dalších po roce 2000 a výrazný tlak selekčního programu vedly postupně k vytěsnění původních českých linií (Mátlová, 2015).

V současné době je původní subpopulace plemene ČESTR spolu s plemenem Česká červinka zařazen do Programu ochrany a využití genetických zdrojů ČR (Mátlová, 2015). Šlechtění českého strakatého skotu spadá pod patronát Svazu chovatelů českého strakatého skotu, jež je členem Evropského sdružení chovatelů strakatého skotu, EVF (Europäische Vereinigung der Fleckviehzüchter) se sídlem v Mnichově (Skládanka et al., 2014).

Svaz chovatelů českého strakatého skotu plemeno dále vede jako kombinované. Plemeno má střední až větší tělesný rámec, dobré osvalení, harmonický zevnějšek a zároveň také zvýrazněné znaky mléčnosti. Plemeno se vyznačuje dobrým zdravotním stavem (zejména mléčné žlázy), pravidelnou plodností, snadnými porody, vitálními telaty a bezproblémovým odchovem, jak na pastvě, tak i ve vysokém příjmu a využití objemných krmiv. Základní parametry chovného cíle jsou shrnuty v tab. 1. A stojí za zmínku, že řada českých předních chovů těchto parametrů již dosahuje (©2008).

Mléčná užitkovost	
prvotetek	5 600 - 6 200 kg
dospělých krav	6 000 - 7 500 kg
obsah bílkovin v mléce nejméně	3,50%
obsah tuku v mléce	4,0 - 4,1 %
délka reprodukčního využití dojnic	4 - 5 laktací
poměr obsahu bílkovin a tuku v mléce	1:1,15 - 1,20

Masná užitkovost	
denní přírůstek ve výkrmu býků	1 300 g a vyšší
jatečná výtěžnost žírných býků	57 - 59 %
třída klasifikace zmasilosti nejhůře R, optimálně U	

Rannost

věk při 1. zapuštění	16 - 18 měsíců
věk při prvním otelení	26 - 28 měsíců

Plodnost		
servis perioda	do 100 dní	
inseminační index	do 1,8	
březost po 1. inseminaci	-jalovice	60 - 70 %
	-krávy	50 - 60 %
mezidobí	380 - 390 dní	

Standard plemene		
hmotnost jalovic ve věku 12 měsíců	340 - 360 kg	
hmotnost býků ve věku 12 měsíců	500 - 530 kg	
hmotnost jalovic při prvním zapuštění	420 - 450 kg	
hmotnost v dospělosti	- krav	650 - 750 kg
	- býků	1200 - 1300 kg
výška v kříži dospělých	- krav	140 - 144 cm
	- býků	152 - 160 cm

Tabulka1: Základní parametry chovného cíle plemene ČESTR. Převzato z (©2008)

3.2 Druhy imunitní reakce organismu

Imunitní systém obratlovců se sestává ze dvou hlavních částí. Vrozené, neadaptivní imunity a antigenně specifické imunity neboli adaptivní či získané imunity.

3.2.1 Získaná imunita

Mechanismy aktivované jednotlivými antigeny jsou mnohem přesnější, ale na rozdíl od přirozené imunity je jejich reakce pomalá, rozvoj imunitní reakce může zabrat i několik dní. Tato část imunitního systému je navíc typická pouze pro obratlovce.

Bývá aktivována pomocnými buňkami, například dendritickými či makrofágy, jež jsou roztroušené ve všech tkáních, i když nejvíce se jich nachází pod povrchem kůže a sliznic. Tyto buňky pohlcují mikroorganismy a jejich molekuly štěpí na malé fragmenty. Ty jsou následně vystaveny na jejich povrchu navázané na MHC proteiny. Zde je rozeznávají klíčové buňky imunitního systému, T-lymfocyty. Po setkání s fragmentem se T-lymfocyt začne měnit na aktivovanou T-buňku. Cytotoxické T_c buňky posléze vyhledávají v těle infikované buňky a zabíjejí je. Další aktivované buňky migrují do nejbližšího mízního uzlu, kde prezentují

antigeny buňkám $CD4^+T$. Dendritické buňky se stimulačními ligandy na povrchu zároveň podporují diferenciaci $CD4^+T$ do T-helper 1 (Th1) buněk nebo Th2 buněk. Th1 buňky produkují interferon γ (IFN γ) podílející se na eliminaci bakteriální a virové infekce. Th2 buňky produkují IL-4 a IL-13, jež jsou zapojeny do odpovědi organismu na infekci helminthy (Akira et al., 2006). V první řadě ale dendritické buňky spolu s aktivovanými T-lymfocyty indukují v B-lymfocytech v produkci velkého množství specifických protilátek (imunoglobulinů).

3.2.2 Vrozená imunita

Oproti získané imunitě je sekce vrozené imunity ve své reakci velmi rychlá, stále připravena k použití. Nazývána je též první linií obrany. Vrozená imunita není doménou pouze savců, je rozšířená napříč živočišným i rostlinným světem.

Hlavními buňkami vrozené imunity jsou buněčné makrofágy a monocyty (Schaut et al., 2016-7-15). (Kang et al., 2016) zmiňuje navíc dendritické buňky, eozinofily a bazofily. Nicméně i epitelální buňky, jež jsou konstantně exponovány antigeny (např. pokožka, GIT) mají na svém povrchu receptory pro rozpoznávání vzorů bakterií, virů a parazitů (Mucha et al., 2009). Rozpoznávají molekulární vzory asociované s patogeny (pathogen associated molecular patterns, PAMP) (Schaut et al., 2016-7-15).

PAMP jsou evolučně konzervované mikrobiální struktury zahrnující virové a bakteriální nukleové kyseliny, peptidoglykany, lipoteichonovou kyselinu, lipoproteiny, lipopolysacharidy a flagelin, stejně jako glukany, chitiny, manázy a proteiny odvozené od houbové buněčné membrány (Kang et al., 2016). PPR vyvolávají prvotní protizánětlivou a antivirovou odpověď organismu. Speciálně Toll-like receptory jsou hlavní třídou PPR, která se kriticky podílí na rozpoznávání bakteriálních a virových PAMPs (Schaut et al., 2016-7-15), (Sharma et al., 2006). (Kang et al., 2016) zmiňují jako další receptory obratlovců tyto: lecitinové receptory typu C (C-type lecitin receptors), cytosolické receptory podobné kyselinou retinovou indukovanému genu I (cytosolic retinoic-acid-inducible gene I-like receptors), receptory oligomerizační domény vázající nukleotidy (nucleotide binding oligomerization domains-like receptors) a intra-cytosolické DNA receptory (intra-cytosolic DNA receptors).

To je také důvod, proč jsou geny modulující přirozenou imunitu považovány za velmi vhodné kandidátní geny na zlepšení hostitelské obranyschopnosti u nemocí postihujících hospodářská zvířata.

3.3 Bovinní Toll-like receptory

Toll-like receptory (TLR) byly poprvé objeveny u mušky octomilky (*Drosophila*). Zde hraje receptor zvaný Toll důležitou roli při vývoji zárodku. Pokud se u něho objeví mutace, díky které se stane neaktivní, larva se vyvíjí zmateně (německy toll). Následně se zjistilo, že tento receptor v dospělosti pomáhá při obraně proti plísňovým a kvasinkovým infekcím.

TLR jsou umístěny na různých imunitních buňkách zahrnujícím makrofágy, dendritické buňky, B buňky, specifické typy T buněk, a je možné je nalézt na neimunitních buňkách, jako jsou fibroblasty a epitelální buňky (Akira et al., 2006).

TLR řadíme do rodiny typu I transmembránových glykoproteinů. V současnosti je známo 10 TLR u lidí, 12 TLR u myší (Kang et al., 2016), 9 v genomu *Drosophila* (Novák, 2014). TLR existují i v primitivních živočiších, např. *Caenorhabditis elegans* má jeden TLR pojmenovaný jako Toll-1 (Akira et al., 2006). Bovinní genom obsahuje celkem 10 TLR genů, jež je lokalizováno na 7 chromozomech (Novák, 2014), (Sharma et al., 2006), (Lakshmi et al., 2016). TLR1, 6 a 10 vytvářejí cluster na bovinním chromozomu 6 (Opsal et al., 2006), TLR 7 a 8 spolu s TLR pseudogenem jsou lokalizovány blízko sebe na pohlavním chromozomu X (Novák, 2014).

Toll-like receptory jsou primárně zapojeny v rozpoznávání molekulárních vzorů asociovaných s patogeny, PAMPs. Dle nich je možné receptory rozdělit do dvou hlavních skupin a sice TLR 1, 2, 4, 5, 6 a 10, jež se podílejí na rozpoznávání bakteriálních struktur (antibakteriální TLR), a TLR 3, 7, 8 a 9, které rozpoznávají struktury specifické pro viry (antivirové TLR) (Novák, 2014), (Akira et al., 2006), (Fisher et al., 2011). (Baravalle et al., 2015) uvádí, že TLR jsou schopny rozpoznat i nepatogenní molekuly jako jsou rostlinné deriváty a proteiny spojené se stresem, jako jsou proteiny teplotního šoku a β -defensin. Níže uvádím souhrn organických látek, které jednotlivé TLR rozpoznávají.

Microbial Components	Species	TLR Usage
Bacteria		
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
Fungus		
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
Parasites		
tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
Viruses		
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
Host		
Heat-shock protein 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

ND = not determined, nezjištěno

Tabulka 2: Rozpoznávání mikrobiálních komponent TLR, převzato z (Akira et al., 2006)

Další dělení vychází z umístění TLR receptoru. Zatímco TLR 1, 2, 4, 5, 6 a 10 jsou umístěny na povrchu buněk, kde rozpoznávají komponenty mikrobiální buněčné stěny (LTA, LPS, flagellin), druhá skupina TLR je výlučně umístěna na endoplazmatickém retikulu, endozomech, lyzozomech a endolyzozomech, tedy v intracelulárním regionu. Sem řadíme TLR 3, 7 – 9 (Kang et al., 2016), (Novák, 2014).

3.3.1 Struktura a diverzita TLR

Strukturně je možné v TLR popsat tyto části; extracelulární doména obsahující různý počet leucinových opakování (leucine-rich-repeat, LRR), cytoplazmatická signální doména homologní k interleukin 1 receptoru (IL-1R), jež je ukončena Toll IL-1R homologní TIR doménou (Akira et al., 2006), (Ruiz-Larrañaga et al., 2011).

LRR motiv je lokalizován na N'-koncovém regionu TLR a je složen z přibližně 20 LRR opakování (Novák, 2014). (Akira et al., 2006) uvádějí 19 – 25 LRR majících motiv

XLXXLXLXXL skládající se z 24 – 29 aminokyselin (AMK). Každý z LRR se skládá z β -listu a α -helix spojených smyčkou. LRR doména je formována do tvaru koňské podkovy, přičemž ligandy se navazují na její konkávní povrch (Akira et al., 2006). (Novák, 2014) uvádí, že se ligandy váží v závislosti na jejich kategorii na obě strany podkovy, na konvexní i konkávní stranu.

Cytoplazmatická IL-1R doména, obvykle intracelulární je C'-koncem TLR. Je zodpovědná za spuštění kaskády reakcí. Region obsahuje vysoce konzervovanou homologní doménu receptoru pro interleukin 1 (toll interleukin 1 receptor, TIR) (Novák, 2014), (Akira et al., 2006).

3.3.2 TLR1

3.3.2.1 Struktura genu TLR1 a produktu

Dle databáze NCBI je gen TLR1 umístěn na chromozomu 6. Referenční sekvence nese označení NM_001046504.1 a sestává se z 2319 bp. Samotný gen je umístěn v oblasti 1 – 2319, kódující region je 30 – 2213. Protein ID nese označení NP_001039969.1. U této varianty je popsáno celkem 5 konzervovaných domén, a sice: 463 – 516 LRRCT (Leucine rich repeat C-terminal domain), 575 – 718 Tir – Toll-Interleukine 1 – resistance, 10 – 33 LRR_1 (Leucine-rich repeat, strukturální motiv), 291 – 312 LRR_RI (Leucine Rich Repeat – strukturální motiv) a 8 – 65 LRR_8 (Leucine Rich repeat).

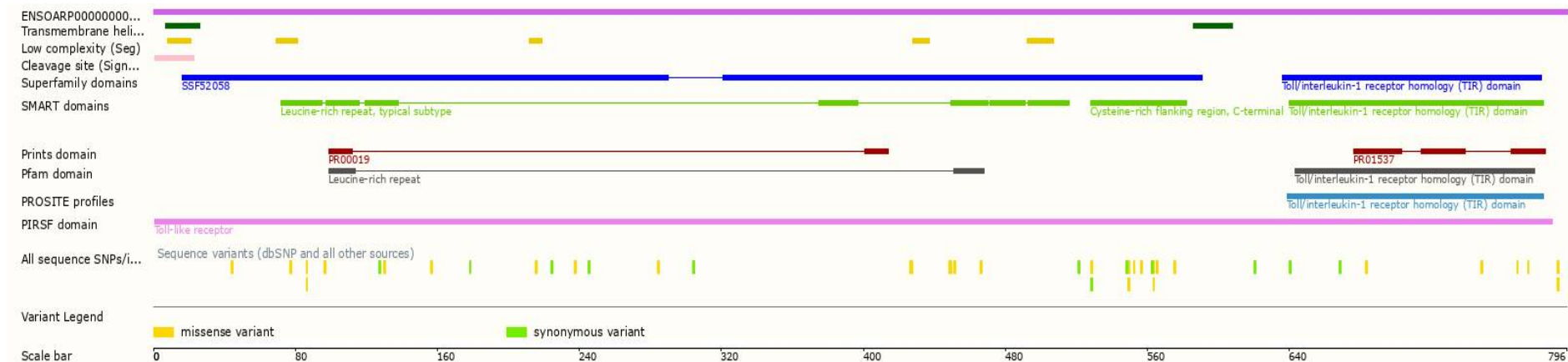
Informace o genu TLR1 z programu BLAST pro hledání homologů v databázi NCBI (Zhang et al., 2000).:

Organismus	gen	shoda
<i>Bos indicus</i>	TLR1	99 %
<i>Bos mutus</i>	TLR1	99 %
<i>Bison bison</i>	TLR1	99 %
<i>Bubalus bubalis</i>	TLR1	98 %
<i>Bos grunniens</i>	TLR1	99 %
<i>Ovis aries</i>	TLR1	97 %
<i>Capra hircus</i>	TLR1	97 %

Tabulka 3: Porovnání sekvencí pro gen TLR1. Vyhodnoceno programem BLAST (Zhang et al., 2000).

Gen TLR1 není k současnému dni (11.04. 2018) v databázi Ensembl přítomen. Proto byl použit gen TLR1 od druhu ovce domácí (*Ovis aries*), který dle programu BLAST (Zhang et al., 2000) vykazuje shodu 97 % s genem TLR1 u *Bos taurus*. Ensembl databázi (Aken et al., 2016) u ovce domácí (*Ovis aries*) je TLR 1 gen určený jako reverzní řetězec sestávající se z 2391 párů bazí a proteinový produkt má 796 aminokyselin. Gen má v databázi jeden transkript TLR1-201 označený jako ENSOART00000000573.1. Gen má v databázi celkem 84 ortologů a patří do 1 Ensembl proteinové rodiny.

Gen je transkribován jako celý objekt, nemá žádný exon. V proteinových produktech byly popsány tyto varianty konzervovaných domén:



Obrázek 1: TLR1 druhu ovce domácí (*Ovis aries*), souhrnná informace o proteinu. Převzato z Ensembl databáze (Aken et al., 2016)

TLR1 spolu s TLR6 a 10 tvoří cluster na bovinním chromozomu 6. Správný genetický pořádek je shodný s tím u člověka 5' – TLR6-TLR1-TLR10 - 3'. Všechny 3 geny mají největší úroveň exprese v krvi a lymfatických uzlinách, střední úroveň exprese je ve slezině a slabě se exprimují v játrech, plicích a alveolárních cisternách mléčné žlázy. U všech tkání pořadí exprese je TLR1>TLR6>TLR10 (Opsal et al., 2006).

Porovnání TLR1 proteinové domény za použití *B. taurus*, *B. indicus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Canis familiaris* a *Gallus gallus* odhalilo jeden cluster LRR vzoru, který je konzervovaný napříč druhy (Seabury et al., 2007).

3.3.2.2 Strukturní a funkční variabilita TLR 1 u skotu

TLR podrodina zahrnující TLR 1, 6 a 10 má schopnost tvořit heterodimery s TLR2 k rozšíření repertoáru rozpoznatelných ligandů. TLR1/2 komplex zprostředkuje buněčnou odpověď na přírodní triacylované lipoproteinové struktury, které jsou součástí buněčné stěny gram pozitivních a gram negativních bakterií. TLR6/2 komplex rozšiřuje rozpoznávání ligandů na diacylované lipoproteiny, ačkoli bovinní TLR1/2 komplex může být jimi také aktivován (Russell et al., 2012), (Lakshmi et al., 2016).

Mucha et al., (2009) zmiňuje u heterodimeru TLR1/2 navíc rozpoznávání dalších bakteriálních komponentů buněčné stěny jako lipopolysacharidy a kyselina teichová. Identifikovali 2 genotypy v genu TLR1, ale nebyla nalezena jejich asociace s *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

Navíc TLR2 ve spojení s TLR1 může rozpoznat 19 kDa lipoprotein asociovaný s buněčnou stěnou a sekretovat antigen k *M. tuberculosis*, což je také potentní cytokinin - aktivátor makrofágů (Akira et al., 2006).

Úplná délka boTLR1 mRNA transkriptu obsahuje 5 exonů a 4 introny (Russell et al., 2012) exonů s celkovou délkou mRNA 2743 bp (Opsal et al., 2006). (Seabury et al., 2007) udává shodnou délku mRNA a informuje o tom, že poslední exon je 2621 bp dlouhý a kóduje protein o 727 aminokyselinách. Celkově v jeho ráci bylo identifikováno 92 SNP, což je průměrná hustota 1 SNP na každých 123 bp sekvenovaných.

Nesyonymní SNP (nsSNP) vedoucích k záměně aminokyselin v kódovaném produktu, byly detekovány ve všech hlavních proteinových doménách v bovinním TLR1, přičemž záměna zasáhla LRR, v transmembránovou část i TIR doménu. Pouze 1 nsSNP se záměnou aminokyseliny byl pozorován u plemen krav odvozených od *B. taurus* (523Ile/Val), zatímco ostatních 5 nsSNPs byla pouze u *B. indicus*. Při hledání zdravotních QTL, které by šly s polymorfismem na BTA6 (TLR10, TLR1, LR6) spojit, byl identifikovány dva bovinní QTL, jmenovitě QTL pro klinickou mastitidu a druhá genomově důležitá QTL ovlivňující bovinní spongiformní encefalopatii (Seabury et al., 2007).

Mechanismus signalizace TLR je zpravidla studován pomocí umělých ligandů. Pam₃CSK₄ je umělý ligand interagující s TLR2/1 heterodimerem. Práce (Conejeros et al., 2015) zjistila zvýšenou koncentraci intracelulárního vápníku u bovinních buněk vystavených Pam₃CSK₄ v koncentraci 10 µl/ml (ale ne nižší). Zvýšená koncentrace intracelulárního vápníku je časnou odpovědí v aktivaci bovinních PMN (polymorfonukleárních neutrofilů) a řídí některé funkční odpovědi, jako je produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) produkce, degranulace a výrazné změny v adhezi molekul.

Seabury et al., (2007) uvádí, že TLR1 jako heterodimer TLR1/2 rozpoznává mykobakteriální produkty. Oba geny jsou proto kandidátními geny pro kontrolu rezistence k paratuberkulóze. Stejně tak nesynonymní mutace v TLR1 a TLR2 snižovaly odpověď krav na *Mycobacterium avium* spp. *Paratuberculosis* (MAP).

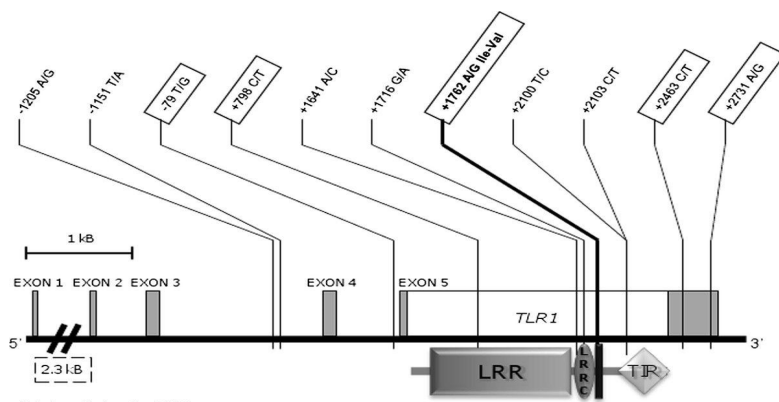
(Ruiz-Larrañaga et al., 2011) ve své studii analyzovala 24 SNP v genech TLR1,2 a 4 na jejich spojení s MAP infekcí u španělské populace Holštýnského plemene. Bohužel sledovaný SNP c.658G>A v TLR1 genu byl nalezen jako monomorfní pro alelu G.

(Sun et al., 2012) prováděli průzkum vzorků krve u 586 holštýnských krav původem z Číny. U SNP TLR1 G6159A SNP byl statisticky významný rozdíl mezi genotypy zvířat infikovaných a neinfikovaných bovinní tuberkulózou (bTB) (p=0,001). Důvod pro pozorovanou signifikantní asociaci může být konverze Ile na Val, který může následně překážet v rozpoznávání mykobakteriálních PAMPs. Studie prokázala, že GA nebo AA genotypy mají větší relativní risk k nákaze bTB ve srovnání s GG genotypem.

(Prakash et al., 2014) zkoumali 2 SNP v lokusu TLR1: (1446C/A a 1380G/A) ve vztahu k náchylnosti k infekci brucelózy. I když u obou SNP nenastala žádná aminokyselinová změna (jednalo se o synonymní mutace), výsledky naznačují, že CC genotyp v SNP 1446C/A lokusu je zodpovědný za zvýšený relativní risk u bovinní brucelózy. Proto selekce proti CC genotypu může redukovat seroprevalenci brucelózy u skotu. Pro SNP1380G/A je statistický poměr AG a AA genotypu proti GG genotypu 0,15 a 0,26, což ukazuje, že GG homozygoti jsou statisticky četnější u brucelózou postižených.

(Russell et al., 2012) provedli resekvenování bovinního TLR1 ve stádě Holštýnského skotu (n=246) a odhalil 11 SNP, přičemž 5 z nich bylo nových. 8 SNP bylo exonových, 6 lokalizováno v CDS, ale pouze 1 z nich vedl k nesynonymní změně (+1762A>G, Iso>Val).

Ta byla překvapivě umístěna v transmembránové doméně. 2 SNP byly lokalizovány v nekódujícím 3'UTR a 3 neexonové SNP byly identifikovány v intronech 5'UTR.



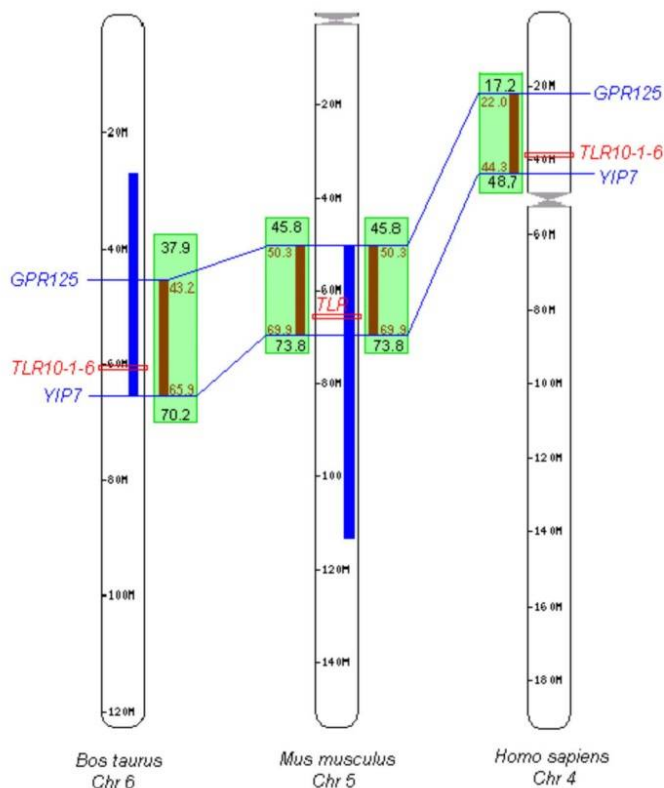
Obrázek 2: Schématický diagram ukazující pozice identifikovaných SNP v bovinním TLR1 genu. Převzato z (Russell et al., 2012)

V této studii bylo vyhodnoceno 5 SNP v exonových a neexonových regionech boTLR1 na vztah k náchylnosti k chronické mastitidě (CM). Byla identifikována významná asociace mezi tagging SNP -79T>G a 3'UTR SNP +2463 C<T a náchylnosti k CM. První SNP je tzv. tagging SNP, což znamená, že zastupuje celý haplotyp několika SNP v genetické vazbě. Není jasné, zda statistická asociace odráží funkční souvislost mezi obsahem mléčného tuku, proteinovou koncentrací a náchylností k mastitidě. Rapidní imunitní odpověď spuštěná neefektivnější variantou -79TT může snížit škodlivost onemocnění.

Epiteliální a stromální buňky mají roli ve vrozené imunitě a dokáží spustit zánětlivou odpověď na širokou škálu bakterií, jež mohou infikovat endometrium. (Turner et al., 2014) testovali hypotézu, že bovinní endometriální a stromální buňky umocňují protizánětlivou odpověď na bakteriální lipopeptidy v důsledku TLR2, TLR1 a TLR6 signalizace. Bovinní endometriální buňky produkují IL-6 a IL-8 v odpovědi na triacylované lipopeptidy a tato odpověď byla oslabena za použití malé interferenční RNA (siRNA) se zacílením na TLR2 nebo TLR1. Na rozdíl od lidských a myších buněk, byly bovinní endometriální buňky v odpovědi na diacylované lipopeptidy využívaly nejen TLR1, ale i TLR2 a TLR6.

Jann et al., (2009) spojují chromozomovou lokalizaci TLR1 s kvantitativním lokusem (QTL) pro náchylnost k bakteriálním infekcím u krav (klinické mastitidy) a u myši (patogen *Listeria monocytogenes*), což je ve shodě s předpokládanou funkcí TLR1 a 6. Polymorfismy uvnitř

těchto genů jsou také spojovány s náchylností k tuberkulóze a malárii u lidí. Na základě této studie TLR1 stále zůstává jako kandidátní gen pro odolnost k mastitidě.



Obrázek 3: Pozice clusteru TLR1 rodiny a překryv s QTL pro mastitidu u skotu, myši a člověka. QTL pozice jsou označeny modře, zeleně je vyznačena lokalizace konzervovaného bloku uvnitř těchto druhů. Vzhledem k tomu, že QTL souvisí se stejnými lokusy, je možné provést porovnání tohoto regionu v segmentech dlouhých přibližně 20 Mb (hnědá linie uvnitř bloku). 2 lokusy (*GPR125* and *YIP7*, vyznačeny modře) vymezují překryv QTL pro náchylnost ke klinickým mastitidám u krav s QTL pro listeriózu u myši s náchylností k tuberkulóze u lidí (polymorfismus červeně). Převzato z (Jann et al., 2009)

3.3.3 TLR4

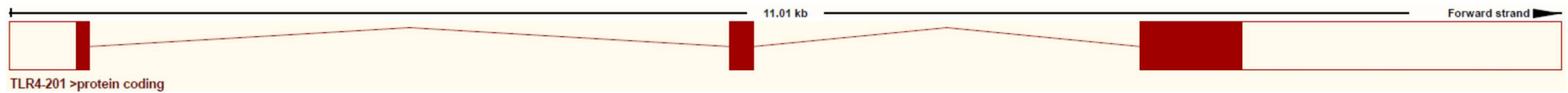
3.3.3.1 Struktura bovinního genu TLR4 a produktu

Gen TLR4 je umístěný na chromozomu BTA8. Při genotypování celého chromozomu pod označením AC_000165.1 se vyskytuje v pozici 107 125 019 – 110 605 777. Molekula mRNA nese označení NM_174198 a sestává se z 379 bp. Kódující sekvence je v oblasti 471 – 2996, identifikátor proteinu je NP_776623.5. Ve struktuře je rozlišeno celkem 5 konzervovaných domén. 675 – 816 TIR (Toll-Interleukine 1 – resistance), 373 – 581 LRR_RI (Leucine rich repeats, ribonuclease inhibitor). LRR jsou reziduální sekvenční motivy dlouhé 20 – 29 aminokyselin. Vyskytují se v mnoha různých proteinech a podílejí se na interakcích proteinu

s jiným proteinem. Mohou mít rozdílné funkce i rozdílnou buněčnou lokalizaci. LRR koresponduje se strukturními jednotkami sestávající se z β řetězce (LXXLXLXXN/CXL konzervovaný motiv) a α helix. Toto uspořádání obsahuje 12 řetězců β korespondujícími s 11 plnými opakováními. Region 375 – 400 odpovídá LRR_RI (leucine rich repeat, strukturní motiv), 57 – 114 LRR_8 a 579 – 626 TPKR_C2 (tyrosine protein kinase receptor C2 Ig-like domain). V Trosin protein kinázovém receptoru NTRK1 tato doména interaguje s nervovým růstovým faktorem β (β -nerve growth faktor, NGF).

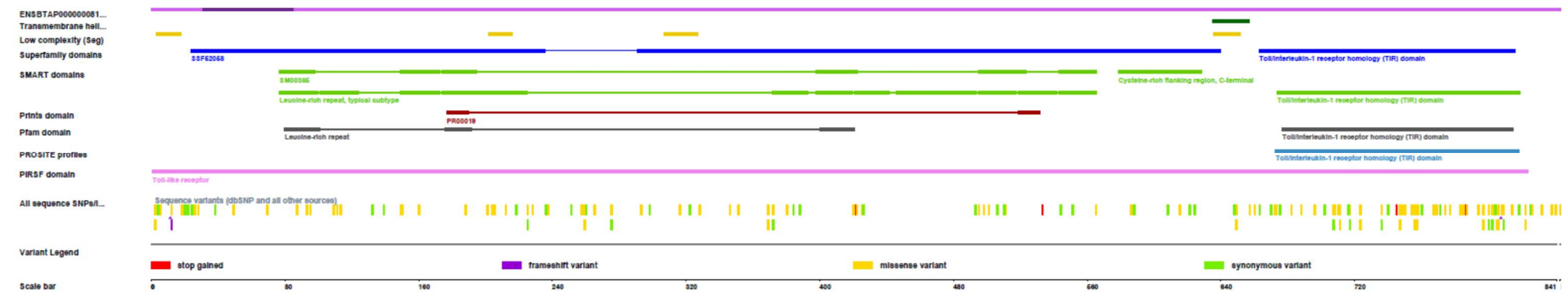
V databázi Ensembl (Aken et al., 2016) je TLR4 zastoupen jako forward řetězec. V databázi byla přítomna pouze jedna varianta, která obsahuje 3 exony. Celkově má gen délku 3716 bp a protein se skládá z 841 aminokyselin.

pojmenování	Sekvence od	Sekvence do	Délka úseku
1. Exon	108 828 899	108 829 461	563
Intron 1-2	108 829 462	108 834 008	4547
2. Exon	108 834 009	108 834 175	167
Intron2-3	108 834 176	108 836 924	2749
3. Exon	108 836 925	108 839 910	2986



Obrázek 4: Oblast chromozomu 8, kde se nachází proteinový produkt TLR4. Převzato z Ensembl databáze (Aken et al., 2016)

Níže následuje ukázka konzervovaných domén, jež protein TLR4 obsahuje.



Obrázek 5: TLR4, souhrná informace o proteinu. Převzato z Ensembl databáze (Aken et al., 2016)

Gen TLR4 a jeho srovnání napříč druhy dle BLAST (Zhang et al., 2000):

Organismus	gen	shoda
<i>Bos indicus</i> Sahival	TLR4	99 %
<i>Ovis aries</i>	TLR4	95 %
<i>Bison bison</i>	TLR4	99 %
<i>Bos mutus</i>	TLR4	99 %
<i>Bubalus bubalis</i>	TLR4	98 %
<i>Pantholops hodgsonii</i>	TLR4	96 %
<i>Odocoileus virginianus</i> <i>texans</i>	TLR4	95 %
<i>Bos frontalis</i>	TLR4	99 %
<i>Bos grunniens</i>	TLR4	99 %
<i>Capra hircus</i>	TLR4	96 %
<i>Bosophalus trogocamelus</i>	TLR4	97 %
<i>Physeter carodon</i>	TLR4	89 %
<i>Orcinus orca</i>	TLR4	89 %
<i>Sus scrofa</i>	TLR4	83 %

Tabulka 4: Porovnání sekvencí pro gen TLR4. Vyhodnoceno programem BLAST (Zhang et al., 2000).

3.3.3.2 Strukturní a funkční variabilita genu TLR4

Celkem gen TLR4 obsahuje 160 variant (SNP), 38 domén a funkcionalit (Aken et al., 2016).

Dobře prostudovaný TLR4 je exprimován na makrofázích a epiteliálních buňkách v normálních plicích, buňkách GIT, játrech, slezině, ledvinách a rohovce, což bylo demonstrováno u různých zvířat zahrnujících prasata, psy a skot (Novák, 2014).

(Lakshmi et al., 2016) odhalil 99 % shodnost genomické sekvence TLR4 mezi evropskými plemeny s *Bos taurus spp. taurus* a malajským plemenem Vechur a stanovil na ni důležité motivy jako TATA, CAT, E-box, NF- κ B, CRE a CpG regiony vyžadované pro regulaci transkripce TLR4. Signalizace přes TLR4 je spojena s aktivací transkripčního faktoru NF- κ B faktoru v určitých typech buněk. Zvýšená aktivita NF- κ B byla nalezena v mléku a vnitřních

epiteliálních buňkách mléčné žlázy u krav trpících mastitidou. Ačkoli promotorová sekvence TLR4 neukázala žádný polymorfismus u sekvencí *Bos taurus* spp. *taurus*, sekvenování odhalilo 2 heterozygotní zvířata u plemene Vechur.

TLR4 je důležitý příklad receptoru, který rozpoznává endotoxiny asociované s gram negativními bakteriálními infekcemi (Sharma et al., 2006). Bakteriální LPS (lipopolysacharid), který je také znám jako endotoxin, je obecně nejúčinnější imunostimulant mezi komponenty buněčné stěny (Lakshmi et al., 2016). Lipidová část LPS, označována jako „lipid A“, je zodpovědná za nejvíce patogenní účinek asociovaný s gram negativní bakteriální infekcí, endotoxický šok. Signalizace probíhá tak, že LPS uvolněný z gram negativních bakterií, kde je asociován s LPS vázebným proteinem (LPS binding protein), se pohybuje v akutní fázi vázaný v krevním řečišti, kde se naváže na CD14 glykosylfosfatidylinositol (GPI) vázebný protein, který se exprimuje na povrchu buněk fagocytů. LPS je potom přenesen do MD-2, který se váže na extracelulární část TLR4. Následuje oligomerizace TLR4, jako klíčové molekuly pro LPS signalizaci.

V souladu s předpokládanými mechanismy pro vazbu PAMP, substituce aminokyselin během evoluce savčích TLR se probíhala hlavně v regionu mezi LRR10 a LRR15. Předpokládaný region interakce ligandů v extracelulárním regionu TLR4 (AMK 274 – 368) je charakterizován 4x nižším stupněm aminokyselinové konzervace než oba dva přilehlé regiony. Tento nedostatek konzervace může reflektovat proměnlivou interakci s koreceptory MD-2 a CD-104 nebo s endogenními ligandy jako hsp60, hyalouran, oligosacharidy a β -defensin.

Předpokládá se, že TLR4 je také zapojený do komplexu bovinních respiračních onemocnění asociovaných s *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* infekcí (Novák, 2014). Toll-like receptor 2 (TLR2) a TLR4 geny vyžadují specifickou sadu molekul jako MyD88 a TRIF, aby aktivovaly MyD88-dependentní a TRIF-dependentní signalizační dráhy, které vedou k sekreci zánětlivých cytokinů, interferonů typu I (IFN), chemokinů a antimykobakteriálních peptidů. Tyto způsobí aktivaci neutrofilů a makrofágů a indukci IFN-stimulovaných genů. Výsledkem je potom přímé usmrcení infekčních patogenů a aktivace adaptivní imunity (Bhaladhare et al., 2016).

Mykobakteria jsou intracelulární bakterie, které přežívají v hostitelových makrofázích díky množství komplikovaných mechanismů. Čisté komponenty mykobakteriální buněčné stěny preferenčně aktivují TLR2 a v menší míře TLR4 (Akira et al., 2006).

Několik charakteristických houbových PAMPs je lokalizováno v buněčné stěně nebo na buněčném povrchu hub a mohou je rozpoznat TLR2 nebo TLR4 (Carvalho et al., 2008). V ochraně proti houbám je kritická odpověď Th1 (pomocné buňky lymfocytů CD4). TLR2 a 4 rozpoznávají konidie, zatímco hyfy jsou rozpoznávány pouze TLR2.

Komponenty protozoálních parazitů jsou také detekovány TLR. Studování protozoální parazité zahrnují *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* a *Plasmodium falciparum*. Molekuly z trypanosom, jako glykosylfosfatidylepirositol – mucin (tGPI-mucin), glykoinositolfosfolipidy (GIPLs) a genomická DNA aktivují TLR2, TLR4 a TLR9 v tomto pořadí.

Některé obalové virové proteiny mohou být rozpoznávány TLR4 nebo TLR2. Detekce vede hlavně k produkci protizánětlivých cytokinů, ale ne typu I IFNs, z čehož vyplývá, že odpověď vede k zánětu spíše než ke specifické antivirové odpovědi (Akira et al., 2006).

TLR2 a TLR4 geny jsou silně vyjádřeny během mastitidy způsobené *Streptococcus aureus*. V souvislosti s tím, že TLR4 je zahrnut v PAMP rozpoznávání, mutace v TLR4 může omezovat imunitní odpověď hostitele na určité patogeny. Z toho důvodu je TLR4 je vysoce polymorfní u dobytka a zvýšená exprese TLR4 je asociována s IMI. Tento gen proto může být potenciální kandidát pro využití v marker-assistované selekci na zvýšenou rezistenci k mastitidám u mléčného skotu (Sharma et al., 2006). Mutace v TLR1 a TLR4 genech způsobuje slabší imunitní odpověď na lipopeptidy, lipopolysacharidy, komponenty mikrobiální buněčné stěny a zvýšenou náchylnost k invazivní aspergilóze (mykotické pneumonie) (Mucha et al., 2009).

Všechny umělé ligandy TLR4 použité ve studii (Conejeros et al., 2015) indukují rapidní změnu ve velikosti buněk a morfologii bovinních PMN (polymorphonuclear neutrophils, jaderné polymorfní neutrofily). Ta je opravdu časná, neboť nastává 10 s po začátku stimulace. Dále ovlivňují změnu v buněčné velikosti u buněk exponovaných ultra čistému LPS (ligand TLR4). Práce z humánní medicíny potvrzují hypotézu, že TLR ligandy mohou navodit přímou aktivaci PMN a v důsledku zvýšit schopnost zabíjení bakterií a protizánětlivou odpověď.

(Schaut et al., 2016) demonstrovali, že různí agonisté TLR4, tak jako agonisté TLR2, byli omezeni ve své schopnosti zahájit pro zánětlivou sekreci cytokininu v MDM ϕ (monocyty a buněčné makrofágy) po infekci BVDV2 (bovine viral diarrhoea virus).

2 SNP lokusy, jeden v TLR4 a jeden v TLR10 byly asociovány se sníženou odpovědí na infekci MAP (*Mycobacterium avium subspecies spp. paratuberculosis*), když se zvýšily koncentrace minoritních alel u 3 holštýnských stád, které zahrnovaly 68 případů a 270 zvířat v kontrolní skupině (Fisher et al., 2011).

Záměrem studie (Sharma et al., 2006) bylo detekovat SNP v domnělém promotorovém regionu TLR4 a prokázat možné asociace SNP v promotorové oblasti se zdravotními znaky jako SCS (počet somatických buněk, somatic cell score) a s délkou laktace (LP) u kanadských holštýnů ze souboru 388 býků. 3 SNP, které byly detekovány, zahrnovaly změnu C \leftrightarrow G na pozici 226 bp v domnělém promotoru (P-226) a 2 záměny C \leftrightarrow T SNP na pozici 1656 bp v exonu 3 (E3+1656) a pozici 2021 bp v exonu 3 (E3+2021). Mutace P-226 byla asociovaná s LP, zatímco C alela byla asociovaná s vyšší LP ve srovnání s alelou G. Haplotypy obsahující C alelu také vykazují vyšší SCS, což je indikace větší náchylnosti ke klinickým mastitidám. Nejčastější haplotyp (Hap3) obsahoval příznivé alely ve všech 3 místech (GCC), byl nejvíce odolný ve srovnání s ostatními haplotypy. Druhý nejfrekventovanější haplotyp Hap4 (32 %) byl asociován s nízkým LP, takže selekce proti tomuto haplotypu může příznivě ovlivnit zdraví u holštýnů a příbuzných plemen.

(Mucha et al., 2009) našli v genu TLR4 varianty TLR4_I a TLR4_II. 14 jedinců vykazujících zřejmé klinické symptomy neslo 1 missence mutaci (Ile680Val) v TLR2 genu a 4 mutace v TLR4 genu (Gly298 [Arg,Trp], Asp229Asn, Gly389Ser). Asp229Gly a Thr399Ile vedly ke snížené schopnosti odpovídat na bakteriální infekci. Obě aminokyselinové záměny byly lokalizovány poblíž centrálního ECD regionu. Byla nalezena missence mutace Asp229Asn vyskytující se u MAP infikovaných zvířat. Stejně tak transverzní mutace z G892C/T, Gly892Arg/Trp byla asociovaná s MAP infekcí.

(Bhaladhare et al., 2016) pracovali se vzorky od 245 ks domorodých plemen skotu z Indie, nepopsaných plemen a kříženců. TLR2 a 4 geny byly zvoleny jako kandidáti pro výzkum asociace náchylnosti/rezistence bovinní tuberkulóze. Byla prokázána asociace polymorfismu rs 43706434 v genu TLR2 s náchylností k bTB, ale efekt prověřovaných 4 SNP v TLR4 nebyl prokázán.

Cílem studie (Baravalle et al., 2015) bylo prozkoumat účast TLR2 a TLR4 a MyD88 na aktivaci NF- κ B v bovinní mléčné žláze ošetřené preparátem ženšenu (PG, *Panax ginseng* – ženšen) při zastavení produkce mléka. Imunohistologické barvení za použití protilátek pro TLR2 a 4 potvrdilo zvýšenou expresi genů podle přítomnosti molekul TLR2 a TLR4 molekul v mléčné žláze. Intramamární inokulace PG byla schopna podstatně zvýšit expresi TLR2 a TLR4 na úrovni mRNA i proteinů ve tkáni mléčné žlázy.

(Yang et al., 2015) zkoumali úlohu TLR signálů v odpovědi na *Cryptosporidium parvum* u bovinních střevních epitelálních buněk skotu. Výsledky prokázaly zvýšenou úroveň mRNA pro TLR2 a TLR4 v případě elicitace buněk *C. parvum*. Výsledky ukazují, že *C. parvum* může indukovat produkci IL-8, aktivaci NF- κ B a expresi cytokinů u obou bovinních buněk transfekovaných jak TLR2, tak i BoTLR4/MD-2. Z toho lze usuzovat, že bovinní TLR2 a TLR4 jsou zapojeny do rozpoznávání *C. parvum*.

Ruiz-Larrañaga et al., (2011) studovala 24 SNP v genech TLR1, 2 a 4, které byly analyzovány pro asociaci s MAP infekcí u španělské populace holštýnů. Polymorfní SNP v TLR4 genu s výjimkou c.1601C>G byly nalezeny ve vazebné nerovnováze ($D' = 0,933$ k 1,000; $r^2 = 0,168$ k 0,986) a formují haplotypový blok, pro nějž bylo detekováno 11 různých haplotypů. Statistické analýzy SNP a haplotypových frekvencí v tomto genu neodhalily žádný statisticky významný rozdíl mezi infikovanými a neinfikovanými zvířaty v populaci.

V práci (Prakash et al., 2014) bylo nalezeno v genech SLC11A1 a TLR4 celkem 5 genotypů významně asociovaných s incidencí k bovinní brucelóze. V SNP 10C/T byla frekvence alely C versus T byla statisticky významně vyšší u brucelózou postižených zvířat. Frekvence genotypů CT a CC v SNP 10C/T byly oproti TT genotypu statisticky významně nižší k 0 % u brucelózou postižených krav. Heterozygoti (CT) měli statisticky významně vyšší frekvenci v kontrolní než v postižené populaci, což naznačuje, že selekce heterozygotů může přispět rezistenci k bovinní brucelóze. Také zvířata s CC genotypem v 10C/T lokusu měli statisticky významně vyšší riziko brucelózi skotu. Na druhou stranu u SNP 399C/T byl statistický poměr CT genotypu oproti CC genotypu byl 8,15, což ukazuje, že CT genotyp má statisticky významně vyšší náchylnost k bovinní brucelóze.

Výzkum (Cronin et al., 2012) sleduje infekci endometria gram negativní *Escherichia coli* a asociaci s přítomností lipopolysacharidů (LPS, endotoxin) v děloze. Pouze exprese TLR4 byla zvýšená u zvířat s onemocněním dělohy. Nefunkčnost TLR4 nebo MyD88 redukuje IL1B, IL-

6 a IL-8 mRNA expresi a IL-6 proteinovou akumulaci v supernatantu buněk vystavených LPS. Rovněž stromální buňky hrály roli u vrozené imunity v endometriu.

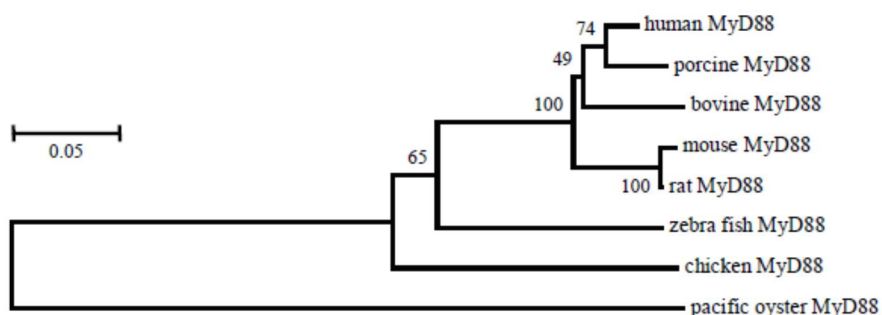
Ve studii (Carvajal et al., 2013) byla zkoumána asociace dříve identifikovaných polymorfismů v TLR4 genech (P-226 a 2021) a v LF genu (P-28) s podmínkami mastitid a SCS u mléčných plemen skotu používaných v Chile. Efekt polymorfismu, TLR4 P-226 (C>G), potvrdil důležitou roli tohoto SNP v regulaci transkripce mRNA z genu TLR4. U většiny plemen je nejfrekventovanější alela C alela, ale u holštýnů je převládající alelou alela G (56 %). Polymorfismus TLR4 2021 (C>T) má jako nejčastěji nalezenou variantu u holštýnů, plemene monbelinarde a overo colorado alelu C (89 %). Naproti tomu u Jersey byla alela T převládající (57 %) a Jersey bylo jediné plemeno vykazující TT genotyp.

Carvalho et al., (2008) demonstrovali ve studii na lidech, že TLR4 zprostředkované signály mohou vymizet během zrání patogena *Aspergillus*. Změna fenotypu může být mechanismus, kterým patogen uniká imunitnímu systému. Byl nalezen Asp299Gly polymorfismus (TLR4), jež byl vysoce asociovaný s infekcí CCPA (chronic cavitary pulmonary aspergillosis). U tohoto SNP nebylo dříve pozorováno, že by mělo asociaci s invazivní aspergilózou. Pravděpodobný mechanismus pro asociaci s onemocněním bude narušení funkce TLR4 v extracelulární doméně, která zprostředkuje mikrobiální rozpoznávání.

3.3.4 Molekula MyD88

3.3.4.1 Struktura genu MyD88 a produktu

Protein MyD88 je esenciální cytoplazmatický protein, kritický pro přenos signálů receptorů typu Toll-like. Bývá spojován s TLR signalizační dráhou s výjimkou TLR3, s nímž pravděpodobně neinteraguje (Li et al., 2009). MyD88 protein se sestává z 396 aminokyselin a mezi jeho rozpoznané regiony řadíme: N-koncový krátký region (N), death doména (DD) a prostřední region (INT) a C-koncová TIR doména. Předchozí výzkumy indikují, že TIR doména interaguje s TLR, zatímco DD je zapojena do následné signalizační kaskády (Nishiya et al., 2007), (Tohno et al., 2007). Aminokyselinová sekvence ukazuje, že MyD88 je vysoce konzervovaná molekula podle sekvencí ostatních druhů (Tohno et al., 2007).



Obrázek 6: Fylogenetický strom MyD88 aminokyselinových sekvencí. Strom byl vystavěn za použití sousedních spojení při narovnání MyD88 aminokyselinových sekvencí. Čísla zobrazují poměry (%) získané při 1000 opakováních. Měřítka ukazují rozdělení v čase. Převzato z (Tohno et al., 2007)

Dle informací získaných z databáze NCBI, gen MyD88 leží na chromozomu 22 v oblasti 11 528 889 – 11 777 107 bází. Transkript má identifikační číslo XM_005222379.3. Kódující oblast se sestává ze 4 částí, a sice: 685 – 1276, 2155 – 2289, 2979 – 3070 a 3340 – 3360. Molekula mRNA byla odvozena z automatické počítačové analýzy za použití metody predikce genů BestRefSeq, Gnomon. Identifikátor proteinu je XP_005222436.1.

NCBI databáze také u této molekuly zaznamenala 2 konzervované domény, a sice oblast 160 – 294 pojmenovanou jako TIR (Toll-Interleukin 1 – Rezistance) a oblast 29 – 106 pojmenovanou jako Death MyD88 doménu.

Gen MyD88 je v databázi určen jako forward řetězec, v databázi jsou přítomny 2 transkripty (MyD88-201 a MyD88-202) lišící se počtem bází a počtem exonů. Varianta MyD88-201 protein coding obsahuje 5 exonů, 10 domén a funkcionalit a varianta MyD88-202 protein coding obsahuje 4 exony, 10 domén a funkcionalit, 79 variant (SNP). Obě verze proteinů se od sebe liší jedním exonem. Celkem má gen 82 ortologů, které jsou členem jedné proteinové rodiny podle Ensembl.

Varianta MyD88-201 protein coding obsahuje 5 exonů, 10 domén a funkcionalit.

pojmenování	Sekvence od	Sekvence do	Délka úseku
1. Exon	11 646 791	11 647 154	364
Intron 1- 2	11 647 155	11 648 032	878
2. Exon	11 648 033	11 648 167	135
Intron 2 - 3	11 648 168	11 648 505	338
3. Exon	11 648 506	11 648 686	181

Intron 3 – 4	11 648 687	11 648 856	170
4. Exon	11 648 857	11 648 948	92
Intron 4 – 5	11 648 949	11 649 217	269
5. Exon	11 649 218	11 651 003	1786

Varianta MyD88-202 protein coding obsahuje 4 exony, 10 domén a funkcionalit, 79 variant (SNP).

pojmenování	Sekvence od	Sekvence do	Délka úseku
1. Exon	11 646 791	11 647 154	364
Intron 1 – 2	11 647 155	11 648 505	1351
2. Exon	11 648 506	11 648 686	181
Intron 2 – 3	11 648 687	11 648 856	170
3. Exon	11 648 857	11 648 948	92
Intron 3 -4	11 648 949	11 649 217	269
4. Intron	11 649 218	11 651 003	1786

Bylo provedeno porovnání sekvencí jednotlivých genů uvnitř databáze NCBI pomocí srovnávacího algoritmu v programu BLAST (Zhang et al., 2000).

Pro gen MyD88 byla nalezena podobnost pro tyto organismy:

Organismus	gen	shoda
<i>Bos indicus</i>	MyD88	99 %
<i>Bos mutus</i>	MyD88	99 %
<i>Bison bison</i>	MyD88	99 %
<i>Bubalus bubalis</i>	MyD88	97 %
<i>Capra hircus</i>	MyD88	93 %
<i>Odocoileus virginianus</i> <i>texans</i>	MyD88	92 %
<i>Pantholops hodgsonii</i>	MyD88	92 %
<i>Sus scrofa</i>	MyD88	88 %

<i>Balaenoptera oculatorostrata scammoni</i>	MyD88	84 %
<i>Capra hircus</i>	MyD88	96 %
<i>Homo sapiens acetyl CoA acyltransferaze 1</i>	ACAA1	77 %
<i>Homo sapiens</i>	MyD88	77 %
<i>Ovis aries</i>	MyD88	96 %

Tabulka 5: Podobnost sekvencí pro gen MyD88. Vyhodnoceno programem BLAST (Zhang et al., 2000).



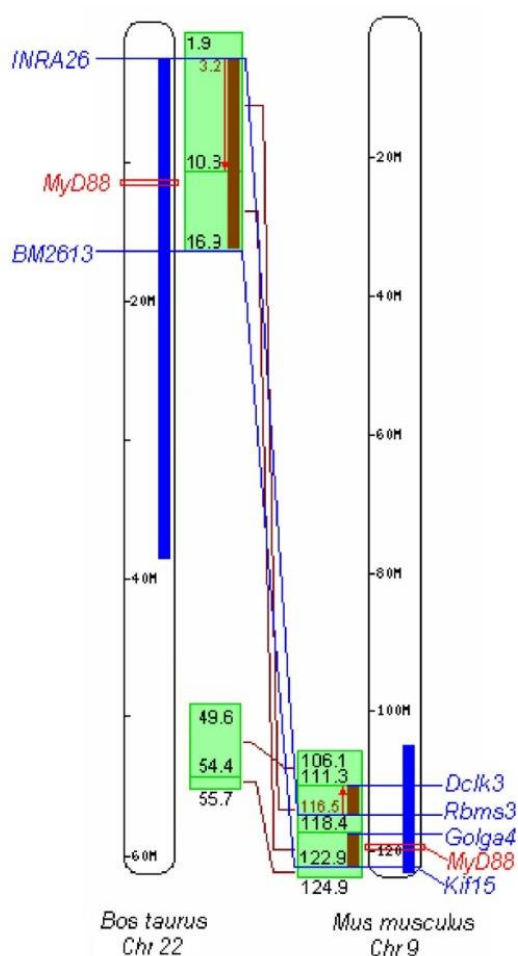
Obrázek 7: MyD88 splice varianty. Přečteno z Ensembl databáze (Aken et al., 2016)

Domain source	Start	End	Description	Accession	InterPro
Smart	19	109	Death domain	SM00005	IPR000488
Prosite_profiles	32	109	Death domain	PS50017	IPR000488
Pfam	37	104	Death domain	PF00531	IPR000488
Superfamily	5	125	Death-like domain	SSF47986	IPR011029
PIRSF	8	296	Myeloid differentiation primary response protein MyD88	PIRSF037756	IPR017281
Superfamily	156	295	Toll/interleukin-1 receptor homology (TIR) domain	SSF52200	IPR000157
Prosite_profiles	159	296	Toll/interleukin-1 receptor homology (TIR) domain	PS50104	IPR000157
Smart	160	296	Toll/interleukin-1 receptor homology (TIR) domain	SM00255	IPR000157
Pfam	163	291	Toll/interleukin-1 receptor homology (TIR) domain	PF01582	IPR000157

Tabulka 6: Souhrn domén, které obsahuje proteinový produkt MyD88. Přečteno z Ensembl databáze (Aken et al., 2016)

3.3.4.2 Diverzita a funkční interakce s MyD88

Studie (Jann et al., 2009) se zabývala studiem průniku QTL pro protozoální infekce a lokalizace genů imunity u různých druhů. Na základě studia genů MyD88 (dále také TLR1, 2, 4 a další) v běžných zvířecích modelech se podařilo srovnat strukturu genu MyD88 a popsat shodnou část vyskytující se v nich. Eviduje zde 4 konzervované regiony mezi bovinním chromozomem 22 a myším chromozomem 9, které jsou rozdílně uspořádány a orientovány mezi oběma druhy. Dohromady obsahují přibližně 10 MB uvnitř překryvu v parazitně příbuzných QTL u myši a u skotu a obsahují 979 – 1000 genů v rámci této sekvence



Obrázek 8: Překryv genů MyD88 a QTL u krávy a myši. Rozsah QTL je zvýrazněn tlustou modrou čarou. Zelené boxy ukazují lokalizaci syntetických bloků, jež jsou konzervovány napříč druhy. Inverze v genomovém pořadí jsou zvýrazněny červenými šipkami. Lokusy na hranicích překryvu mezi zdravotními QTL u krávy (rezistence k *Trypanosoma*) a u myši (*Plasmodium chabaudi* původce malárie) jsou označeny modře. Podle předpokladu, že tyto QTL jsou způsobené stejnými lokusy, byl tento region narovnaný do segmentů a zkombinován do délky přibližně 10 Mb (hnědá čára v syntetickém bloku). Převzato z (Jann et al., 2009)

Při stimulaci TLR váží MyD88 přes interakci TIR-TIR. MyD88 potom aktivuje molekuly v kaskádě níže, zejména molekulární IL-receptor kinázu (IRAK) s TLR přes DD-DD interakci. (Li et al., 2009).

(Wang et al., 2015) sledoval, zda NF- κ B indukce závisí na MyD88. Buňky přesycené MyD88 vykazovaly podstatně vyšší LAMPs (lysozomal-associated membrane protein) dependentní IL-1 β indukci ve srovnání s kontrolními buňkami, zatímco DN-MyD88 přesycené podstatně snížily expresi IL-1 β . Saturace TLR2 a MyD88 znatelně zvýšila LAMPs dependentní indukci IL-1 β ve srovnání s kontrolními buňkami. MyD88 dependentní IL-1 β indukce následující stimulaci LAMPs byla podstatně snížena v buňkách, které byly opracovány monoklonální protilátkou proti TLR2.

Studie (Li et al., 2002) prokázala, že úroveň exprese nebo funkční mutace v MyD88 genu jsou spojována s důležitým fenoménem, jako je endotoxinová tolerance.

(Li et al., 2009) izoloval genomickou DNA sekvenci prasečího MyD88 genu a analyzoval rozdělení tkáně, chromozomovou mapu, polymorfismy a strukturní charakteristiky. Také zkoumal 1 SNP v 1. intronu prasečího MyD88 pomocí PCR-RFLP. Data odhalila MyD88 genotypovou expresi ve všech zkoumaných tkáních. Tato exprese je nízká ve tkáni příčně pruhovaného svalstva. DNA MyD88 byla vysoce konzervovaná, ale i tak obsahovala 16 potenciálních SNP: 797T/C, 813A/G, 1721T/G, 1755C/A, 2130T/A, 2461C/T, 2468G/A, 2519G/A, 2743A/G, 2757C/T, 3076A/G, 3258A/G, 3291T/A, 3298C/T, 3345A/G a 3485G/A. Polymorfismus 797T/C byl dále studován PCR-RFLP metodou. Analýza frekvence alel odhalila vyšší frekvenci alely T u 5 čínských místních plemen než u Landrace a Yorkshire. Nicméně data nepodpořila podstatnou asociaci mezi tímto SNP a imunitnímu znaky.

(Jann et al., 2009) zkoumal překryvy QTL u MyD88 vztahujícímu se k protozoálním infekcím u skotu a myši. Efekt QTL na náchylnost k infekci *Trypanosoma congolense* u skotu a k infekci *Plasmodium chabaudi* u myši může být podobný, protože obě nemoci jsou výsledkem protozoální infekce, která pravděpodobně vnáší podobné PAMPs a aktivuje shodné dráhy. MyD88 je asociován s protektivním efektem během infekce *Trypanosoma* a *Toxoplasma*. Hypotetický polymorfismus MyD88 ovlivňující genovou funkci může balancovat ochranu proti protozoálním parazitům, ačkoli v současnosti není žádný důkaz k dispozici.

Studie (Capparelli et al., 2013) našla významnou asociaci polymorfního místa MyD88 A625C s aktivní tuberkulózní infekcí (ATI) u skotu ($p=0,84$). Polymorfní místo A625C je lokalizováno v intronu 1 MyD88 genu. Asociace byla velmi robustní (i když byla detekována za použití malého souboru zvířat) a ukázala stratifikaci (rozvrstvení) podle formy infekce (aktivní nebo latentní). Pro lepší průkaznost heterozygotnosti a rezistence k ATI byla práce zopakována na větším a nezávislém vzorku skládajícím se z 300 kontrolních a 150 případů ATI a 150 případů LTI. Experiment prokázal, že A a C jsou předávána jako kodominantní alely. Výsledky ukazují na asociaci MyD88 markerů s ATI, ale ne s latentní infekcí (LTI). Zvířata heterozygotní v MyD88 A625C polymorfním markeru mají výhodu v 5 x nižším riziku nákazy ATI. Redukovaný risk ale není stejný pro latentní TI. Heterozygoti poskytují optimální úroveň zánětu. Deficience TNF- α , TNF - γ a NOS je naopak výhodná pro tuberkulózu.

(Cronin et al., 2012) testuje hypotézu, že TLR4 a MyD88 dependentní signalizace je nezbytná pro odpověď na LPS u epitelálních a stromálních buněk bovinního endometria. Inhibice mRNA MyD88 pomocí siRNA redukovala expresi mRNA MyD88 v epitelálních a stromálních buňkách. Studie prokazuje, že ne pouze epitelální buňky, ale i stromální hrají roli v projevech vrozené imunity v endometriu.

(Nishiya et al., 2007) popisuje rozdílné role TIR a non-TIR regionů v intracelulárním zesilování přenášeného signálu MyD88 a v interakci MyD88 se specifickými TLRs a TIR adaptory. Existují 2 faktory, které určují specifické partnery pro MyD88; mechanický faktor (tj. specifická TIR-TIR doménová interakce) nebo prostorový faktor (například určitá mezibuněčná distribuce TLR a TIR adaptorů). MyD88 byl přítomen v kondenzované, morfologicky rozdílné formě v cytoplazmě. MyD88-YFP (kondenzovaný MyD88) je přítomen jako monomer a/nebo homodimer v cytoplazmě, je přítomen ve váčkovitých strukturách nebo asociovaný s tubulárními nebo fibrilárními strukturami. Celý non-TIR region hraje kritickou roli v lokalizaci MyD88 uvnitř buňky. MyD88 se asociuje se signální molekulou umístěnou níže v kaskádě, jako je interleukin-1-receptor-asociovaná kináza 1 (IRAK1) a IRF-1 skrze DD. Nicméně správnou celulární lokalizaci, nezbytnou pro aktivaci signalizačních událostí, se nepodařilo nalézt. Interakce mezi MyD88 a specifickými TLRs je spíše určena konformačními charakteristikami každé TIR domény. Specifická interakce MyD88 a TIRAP vyžadovaná TLR4 signalizací je spíše závislá na prostorových a časových

faktorech. Výsledky studie Tohno et al., (2007) poukázaly na fakt, že death doménová superrodina hraje důležitou roli v přenosu death signálu, regulaci apoptózy a zánětlivých odpovědí. V důsledku stimulace jsou molekuly IRAK-1 zapojovány do komplexu aktivního receptoru přes spojení s MyD88 a umožňují oligomerizaci IRAK-1. Vazebná interakce MyD88 s IRAK-1 je umožněna death doménou MyD88 s TIR a IL-1 β byla v poMyD88 vysoce konzervovaná. Navíc byly v sekvenci aminokyselin poMyD88 identifikovány 2 vymezené a zpřeházené regiony, které umožňují jednomu regulačnímu regionu nebo proteinu vázat mnoho typů molekul. Schopnost asociace s mnoha molekulami, které zahrnujících jak proteiny, tak i aminokyseliny je zásadní pro signalizaci přes membránu buňky i intracelulární signalizaci. Exprese MyD88 je rovněž regulována v ontogenezi. Úroveň exprese MyD88 se různí v orgánech novorozenců, kde je nejvyšší hladina ve slezině a mezenterálních mízních uzlinách (MLNs) a nižší v intestinálních buňkách. Úroveň exprese MyD88 v intestinálních buňkách byla nižší než ta v MLNs a slezině dospělců. U dospělců jsou na rozdíl od novorozenců intestinální buňky neustále vystaveny intestinálním mikrobiálním antigenům.

3.3.5 Signalizační kaskáda receptorů Toll-Like

Toll-like receptory vyžadují specifický set molekul jako MyD88 a TRIF a aktivují MyD88-dependentní a TRIF-dependentní dráhu (Conejeros et al., 2015) vedoucí k sekreci zánětlivých cytokinů, typ I interferonů (IFN), chemokinů (např. CXCL8) (Russell et al., 2012) a antimikrobiálních peptidů (Baravalle et al., 2015). Tyto odpovědi způsobí rekrutment neutrofilů, aktivaci makrofágů a indukci IFN stimulovaných genů a výsledkem je přímé zabití infekčních mikrobiálních patogenů a zapojení adaptivní imunity (Bhaladhare et al., 2016).

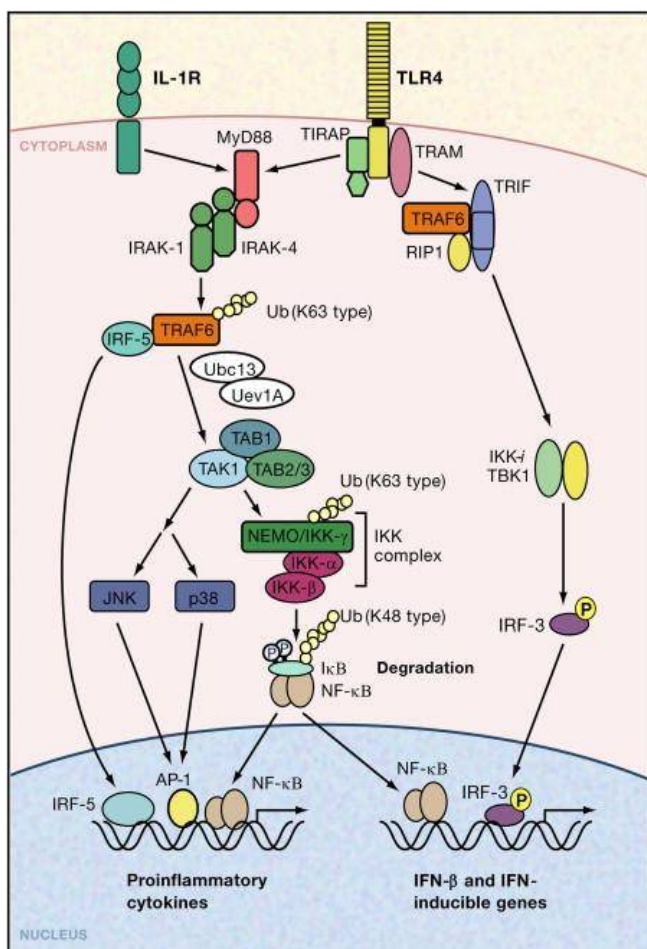
Stimulace buněk TLR ligandy vyžaduje adaptorové proteiny obsahující TIR doménu. (Akira et al., 2006) uvádí tyto 4 adaptorové proteiny: MyD88 (myeloidní diferenciacní faktor 88), TIR-asociovaný protein (TIRAP)/MyD88-adaptor-podobný (MAL), TIR-doménu obsahující adaptorový protein indukující IFN- β (TRIF)/TIR-doménu obsahující molekulu 1 (TICAM1) a s TRIF-asociovaná adaptorová molekula (TRAM). (Kang et al., 2016) uvádí navíc adaptorovou molekulu SARM.

Navázání ligandu na TLR receptor zapříčiní spuštění signalizační kaskády. Hlavní buněčná exprese TLR zahrnuje antigenně receptorové buňky (APCs), jako jsou dendritické buňky a makrofágy, které internalizují a degradují proteiny. Po navázání ligandů TLR dimerizuje a

prochází konfiguračními změnami vyžadující zapojení TIR domén obsahujících adaptorové molekuly v TIR doméně TLR. (Akira et al., 2006).

MyD88 je kriticky nezbytný pro signalizaci všech TLR s výjimkou TLR3 (Akira et al., 2006), (Baravalle et al., 2015), (Conejeros et al., 2015), (Li et al., 2009).

Obecně, aktivace TLRs pomocí ligandů vede k aktivaci NF- κ B. NF- κ B je normálně inaktivovaný v cytoplazmě rodinou inhibičních proteinů známých jako inhibitory NF- κ B. Pokud je jednou aktivován NF- κ B disociuje ze svých inhibičních proteinů I κ B α a přemístí se z cytoplazmy do jádra, kde může ovlivnit transkripci specifických cílových genů (Yang et al., 2015).



Obrázek 9: TLR signalační dráha, převzato z (Akira et al., 2006)

4 Materiál a metody

4.1 Izolace DNA

Izolace DNA se prováděla ze zmražených inseminačních dávek či vzorků krve. Inseminační dávka v pejetě byla rozmrazena při 37 °C a následně přenesena na led. Zatavený konec byl odstřižen ve vertikální poloze a obsah přenesen do mikrozkušavky 1,5 ml. Alikvota 50 µl byla zcentrifugována ve zkumavce 1,5 ml při 8000 ot/min ve stolní centrifuze při 4°C po dobu 5 minut. Sediment byl promyt 1 x 100 µl fosfátového fyziologického roztoku (PBS) s opakovanou centrifugací. Lýze byla prováděna přidáním 225 µl lyzačního pufru ze soupravy MagSep (Eppendorf) pro tkáň. Použití většího výchozího objemu inseminačních dávek (až 10 µl) vedlo k viskozitě konečného preparátu DNA, která již bránila pipetování. Protože při automatickém pipetování na stanici EpMotion chybí vizuální kontrola, změna vlastností preparátu vedla k chybám a zvyšovala riziko kontaminace.

Byla přidána rovněž proteináza K v objemu 25 µl (ze soupravy MagSep) a 22 µl 1M DTT pro konečnou koncentraci 80 mM. Po počátečním resuspendování lyzační směsi vortexováním po dobu 1 min. byla směs inkubována při 56 °C přes noc, případně 16 hodin s občasným vortexováním po dobu několika vteřin.

Lyzát byl centrifugován při 11 000 g při pokojové teplotě po dobu 5 minut. 225 µl supernatantu bylo převedeno do 2 ml mikrozkušavek s kulatým dnem (Eppendorf) a použito jako vstup do izolačního programu MagSep – Tissue na stanici EpMotion. Podstatou metody je lýze buněk v lyzačním pufru v přítomnosti proteázy K a následné oddělení DNA z roztoku na afinitních feromagnetických partikulích. Po třikrát opakovaném promývání vázané DNA je získán čistý preparát pomocí elučního pufru. Program na přístroji je plně automatizován, tedy vysoce reprodukovatelný. Výtěžek izolace se pohyboval kolem 20 µg v celkovém objemu eluátu 100 µl.

Zásobní roztok 1M dithiothreitolu (DTT) byl připraven rozpuštěním 1,545 g DTT v 10 ml vody. Roztok byl zfiltrován přes předběžně navlhčený sterilní nitrocelulózový filtr s póry 0,2 µm pomocí injekční stříkačky a skladován v alikvotách při -20 °C.

Při izolaci DNA z krve se lišila příprava vzorků. Krev z terénních odběrů o objemu přibližně 1,0 ml byla skladována v mikrozkušavkách o objemu 1,5 ml při -20 °C. Protože byla v řadě případů sražená, byl zvolen postup pro izolaci DNA, kdy se vzorky nejprve zcentrifugovaly

při 2500 rpm po dobu 2 – 3 minuty za účelem očištění víčka před otevřením a zabránění kontaminaci. Následně bylo do vzorku přidáno 20 µl Na₂EDTA o koncentraci 10 % jako antikoagulans.

V dalším kroku byl vzorek homogenizován vortexováním s inertním materiálem. Byla testována jemná i hrubá balotina a křemičitý písek, přičemž materiály byly před tím autoklávované pro zabránění případné kontaminaci cizí DNA. Nejlepších výsledků bylo dosaženo po přidání písku. Po rozmrazení vzorku na vodní lázni se s ním dále pracovalo na ledu. Vzorky se zvortexovaly nejprve zběžně a poté důkladně – po dobu nejméně jedné minuty na jednu zkumavku. Písek a nečistoty byly odstraněny centrifugací při otáčkách 1500 – 2000 rpm po dobu 1-2 minut při 4 °C. 200 µl supernatantu bylo použito pro izolaci DNA metodou MagSep-Blood na automatické pipetovací stanici EpMotion. Výtěžek izolace se v tomto případě pohyboval kolem 1 µg v celkovém objem 50 µl eluátu. I když se jedná asi o pětinový výtěžek ve srovnání s izolací z nesražené krve, množství je postačující pro následné genotypovací reakce. Preparáty DNA byly skladovány při -20 °C.

4.1.1 Kontrola preparátů DNA

Pro ověření výtěžku a kvality preparátů DNA se využívají 2 metody, metoda měření optické absorbance v UV oblasti a gelová elektroforéza.

Vzorek (DNA rozpuštěná v elučním či Tris pufu) se naředí 50 - 100 x vodou, přenesení do mikrokvyety v objemu vyšším než 50 µl a absorbance se stanoví při třech vlnových délkách. Zatímco absorbance pro 260nm určuje koncentraci DNA, absorbance při 280 nm indikuje proteiny a při 230 nm rozptylující nečistoty. Poměr OD₂₆₀/OD₂₈₀ by se měl pohybovat nad 1,8, nicméně ze vzorků se nám podařilo dostat výtěžnost 0,7 - 1,2.

Metoda měření absorbance nám řekne, zda je ve vzorku přítomna DNA, ale neřekne nám, v jakém je stavu. Předpokládáme, že po pipetování a separaci je DNA ve vzorku nalámána na zhruba 20 kbp dlouhé fragmenty, ale mohou samozřejmě být i kratší. Proto se elektroforeticky zjišťuje rozdělení fragmentů DNA podle hmotnosti. Očekáváme 1 výrazný pruh kolem hodnoty 20 000 bp. Degradční fragmenty se zobrazí jako rychleji migrující oblast. Je také možné, že ve vzorku zůstaly bílkoviny, ty by se potom na gelu projeví jako pruh v oblasti startu.

Agarózový gel byl připraven rozpuštěním 0,6 % (w/w) práškové agarózy pro molekulární biologii v pufu TBA pomocí vaření v mikrovlnné troubě. Přímo do gelu bylo přidáno

fluorescenční barvivo GelRed (Biotium, Fredmont, USA) pro detekci DNA v pracovní koncentraci 10 μl dodávaného zásobního roztoku na 100 ml gelu. 120 ml roztoku agarózy bylo použito pro přípravu jednoho gelu v systému horizontální elektroforézy Liberty. Po vytvoření a zchlazení gelu (60 minut) byly elektrodové komory zaplněny předchlazeným pufrům TBE, prostor nad gelem zaplněn předchlazenou vodou (4 °C) o tloušťce vrstvy 2 cm. Elektrodové komory a gelový kompartment jsou v tomto systému propojeny jen samotným gelem. V tomto uspořádání se dosahuje vyššího gradientu napětí v gelu a omezuje se přehřívání. Poté byly do hřebeny vytvořených jamek nanášeny vzorky genomické DNA (aliquoty 1 – 2 μl v 5 – 7 μl nanášecího pufru koncentrovaného 6 x, který byl před použitím 5 x zředěn). Jako standard byl použit žebříček standardů GeneRuler 100 bp+ (Fermentas, Vilnius Litva). Gely byly dokumentovány fluorescenční kamerou SynGene po rozdělení po dobu 30 minut při napětí 200 V. Vzhledem k téměř shodnému spektru se standardním barvivem ethidium bromid byl použit stejný emisní filtr a excitace UV světlem při 254 nm.

4.2 Standardizace preparátů DNA

Vzorky DNA byly z jednotlivých mikrocentrifugačních zkumavek převáděny na formát mikrotitračních destiček pro vysokokapacitní zpracování. Současně byla nastavena zadaná koncentrace DNA 20 ng/ μl , která umožňuje standardizovat další postup a zvyšuje reprodukovatelnost dalších reakcí.

Vypočtené objemy vody a DNA pro ředění na základě spektrofotometricky určených koncentrací DNA byly importovány do přístroje jako soubor ve formátu csv. Původní program potom zajistil pipetování z formátu 24 zkumavek na mikrotitrační destičku o 96 jamkách.

4.3 Amplifikace vybraných genů pomocí PCR

Vybrané úseky genů obsahující kódující sekvence byly vymezeny pomocí dvojic oligonukleotidů, tzv. primerů, komplementárních s vazebnými místy na genomické DNA. Ty byly na základě dodaných návrhů sekvencí syntetizovány a dodány po odsolení v lyofilizované podobě firmou Eurofins. Lyofilizované primery byly dle uvedeného výtěžku syntézy rozpuštěny a ředěny na výchozí koncentraci 100 μM ve vodě, následně 10 x zředěny

na pracovní koncentraci 10 μM a skladovány ve formátu 96 jamkových mikrotitračních destiček.

Pro amplifikaci DNA fragmentů byly použity dva druhy termosenzitivních DNA polymeráz, standardní od výrobce Fermentas (Vilnius, Litva) pro fragmenty určené ke genotypování a kapilární sekvenování a nízkochybová polymeráza, tzv. Phusion polymeráza, od výrobce New England Biolabs pro fragmenty určené pro vysokokapacitní sekvenování nové generace.

Standardní amplifikační reakce v objemu 10 μl obsahovaly 0,03 jednotek/ μl Taq polymerázy v 10 mM TRIS pufru, pH 8,8, obsahujícím 50 mM KCl, 0,08 % Nonidet, 2mM MgCl_2 , čtyři deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP) v koncentraci 0,2 mM, oba primery jednotlivě v koncentraci 0,4 μM a templátovou DNA v koncentraci 0,5 ng/ μl . Sekvence amplifikačních primerů jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Preparativní reakce (v objemu 20 μl) pro NGS obsahovala Phusion „high-fidelity“ DNA polymerázu (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) v koncentraci 0,1 jednotky/ μl v prostředí firemního HF pufru, který obsahoval 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP, každý primer v koncentraci 0,5 μM a 0,1 ng/ μl templátové DNA. Amplifikační reakce připravené v jamkách mikrotitračních destiček byly vzhledem k nízkým objemům překryty vrstvou minerálního oleje (Sigma – Aldrich) a následně uzavřeny PCR fólií.

Amplifikační program byl adaptován dle (White at al, 2003) a obsahoval počáteční denaturační krok při 95 $^{\circ}\text{C}$ v trvání 1 minuty, poté 5 cyklů při 95 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 s, anelační krok při teplotě dle tab. Č12 po dobu 30 s a 72 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 minuty, poté 38 identických cyklů s anelační teplotou (T_a) sníženou o 2 $^{\circ}\text{C}$. Závěrečný extenzivní krok 6 minut při 72 $^{\circ}\text{C}$ zajišťoval dosyntetizování komplementárních vláken DNA.

Produkty PCR byly skladovány při 4 $^{\circ}\text{C}$.

Elektroforetická kontrola výsledku PCR byla prováděna shodně s postupem u gDNA. Rozdíl spočíval pouze v 1,6 % koncentraci agarózového gelu. Z reakční směsi byl na kontrolu použit 1 μl .

4.4 Návrh amplifikačních primerů

Amplifikační primery pro PCR (tabulka 7) byly pro TLR1 a TLR4 převzaty z literatury (White at al. 2003), (Seabury et al. 2007) a jejich požití bylo dodatečně optimalizováno (Novák et al. 2017). Použité amplifikační reakce plně pokrývají kódující oblasti obou genů.

Amplikon (číslování pro všechny TLR)	Primer - celý název	Primer pracovně	Sequence	Délka (párů bází)	Teplota pro PCR, enzym Taq- Fermentas (°C)
1	TLR1 01F	T1 01F	ATGCCTGACA TCCTCTCACT	21	62/60
	TLR1 01R	TL 01R	AGTTCCAGAC TCACTGTGGT G	23	
2	TLR1 02F	TL 02F	TCCAGTGTGC AGTCAATCAC	21	62/60
	TLR1 02R	T1 02R	AGAACCTTGA TCTGAGGAGG T	23	
3	TLR1 03F	TL 03F	TGACCCAGGA AATGAAGTCT	21	62/60
	TLR1 03R	T1 03R	CCGTGTTAAT GTATTTCTGC TG	24	
10	TLR4 ex1 F	T4 1F	CGGGGAGAGA CGACACTACA	26	64/62
	TLR4 ex1 R	T4 1R	TGTTTGCAAA TGAACCTAAC CA	28	
11	TLR4 ex2 F	T4 2F	TCTTTGCTCG TCCCAGTAGC	26	64/62
	TLR4 ex2 R	T4 2R	AAGTGAATGA AAAGGAGACC TCA	29	
12	TLR4 ex3 1F	T4 3 1F	GGAGACCTAG ATGACTGGGT TG	28	62/60
	TLR4 ex3 3R	T4 3 3R	AAGAAGGGCT TGTAGACTTC CT	28	
13	TLR4 ex3 2F	T4 3 2F	TGTATTCAAG GTCTGGCTGG T	27	58/56
	TLR4 ex3 4R	T4 3 4R	AAGACAATGC GGATGTTGGT	26	
14	TLR4 ex3 3F	T4 3 3F	TTTCAAGGGG TGCTGTTCTC	26	58/56
	TLR4 ex3 5R	T4 3 5R	TGCACACATC ATTTGCTCAG	26	
15	TLR4 ex3 6F	T4 3 6F	AGCCCAGACA GCATTTTAC	25	62/60
	TLR4 ex3 1R	T4 3 1R	GCCGCAGGAG AGACTTCT	24	
16	TLR4 ex3 4F	T4 3 4F	GTCAGTGTGC TCCTGGTGTG	26	62/60
	TLR4 ex3 6R	T4 3 6R	CTATAGGGCT CGCGTACCAC	26	
17	TLR4 ex3 5F	T4 3 5F	ATGAGATTGC CCAGACCTG	25	62/60
	TLR4 ex3 6R	T4 3 5R	ATGAGATTGC CCAGACCTG	25	
18	TLR4 PCR-F	T4 P-F	TGCATTTGCT TGTGTTTGTG	26	62/60
	TLR4 PCR R	T4 P R	CGCCCTCCTC CAAGTTCTT	22	

Tabulka 7: Pimery pro geny TLR1 a TLR4 pro vytvoření amplikonů na sekvenování další generace

Pro gen MyD88 byly navrhovány zcela nové primery. Z literatury se nepodařilo dopátrat kompletní sadu primerů pro tento gen. Běžně se stanovují primery tak, že se vezmou oblasti exonů a primery se navazují na sekvence kolem nich. Vzhledem k nízkému počtu nukleotidů celého genu pro MYD 88 bylo možné zahrnout celý gen. Naše PCR sekvence tak obsahovaly i oblasti intronů, na které není vyvíjen takový selekční tlak a byla v nich očekávána větší variabilita.

Funkce navržených primerů byla ověřována s oběma používanými polymerázami tak, že byla sledována shoda v hmotnosti PCR produktů s očekávanou hodnotou podle horizontální elektroforézy.

Pro usnadnění amplifikační reakce v případě oblastí bohatých na GC v první polovině genů byl s DNA polymerázou Phusion použit GC pufr místo pufru HF podle doporučení výrobce a do reakční směsi byl přidáván dimethylsulfoxid v koncentraci 5 %.

Po analýzu vlásenkové struktury v GC-bohaté oblasti byl použit The UNAFold Web Server (Zuker, 2003). Nová řada testovaných primerů byla navrhována mimo rozsáhlé hybridizované úseky.

4.5 Příprava vzorku pro NGS

Vzorky genomické DNA býků z normalizované knihovny o koncentraci 20 ng/μl byly spojeny do směsného vzorku populace v ekvimolárním množství. Amplikony tří studovaných genů byly připraveny s DNA polymerázou Phusion v preparativních reakcích. Po kontrole a kvantifikaci produktů byl připraven směsný vzorek, který obsahoval ekvimolární koncentraci, neboť byl zohledněn jak výtěžek jednotlivých reakcí, tak i hmotnost fragmentu.

Směsný vzorek byl přečištěn na kolonkách NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren, SRN) ve verzi PCR clean-up Gel extraction. Při postupu v pěti krocích podle instrukcí od výrobce bylo 540 μl vzorku smícháno se dvěma objemy pufru NTI (bez ohledu na kontaminaci minerálním olejem). Směs byla pipetována na silikátovou membránu kolonky a kolonka na zkumavce 20 ml byla centrifugována 30 s při 11 000 g. Poté následovalo promytí 700 μl pufru NT3 s opakováním centrifugace. Opakované promytí pufrům NT3 je klíčové pro minimalizaci chaotropních solí, které jinak interferují s přípravou knihovny pro PacBio sekvenování. Opakovanou centrifugací po dobu 1 minuty na 11 000 g bez roztoku na nové zkumavce je membrána dosušena, aby nedocházelo k přenosu stop ethanolu do preparátu. Eluce DNA je prováděna přidáním 30 – 50 μl pufru NE s následnou inkubací při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Eluát je jímán do standardní 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky při centrifugaci při 11 000 g po dobu 1 minuty.

Míra přečištění vzorku je určována podle absorbance (ukazatelé OD_{260}/OD_{230} , OD_{260}/OD_{280}) 20 x zředěného vzorku.

Pokud vzorek splňoval požadavky servisní laboratoře (nejméně 1200 ng, $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,9$, $OD_{260}/OD_{230} \geq 1,7$), byl odeslán ve zmrazeném stavu při -20 °C k dalšímu zpracování. To bylo provedeno týmem servisní laboratoře a spočívalo v přípravě knihovny pro tzv. consensus circular sequencing (CCS) na přístroji PacBio RSII.

4.6 Zpracování výsledků NGS

Výsledky sekvenace byly získány zpět jako komprimovaný archiv obsahující výsledky tří běhů přístroje. Protože nebyla technická možnost použít software, který zpracovává primární sekvenační data ve formátu H5, byly pro navazující práci používány již připravené soubory ve formátu FastQ a FASTA. Mapování jednotlivých čtených úseků, tzv. readů, bylo prováděno na referenční sekvenci v programu Geneious verze R11.0.5, zpravidla pomocí implementovaného algoritmu Geneious. Mapování probíhalo v 5 iteracích pro zvýšení přesnosti.

V porovnaných sekvencích byly hledány strukturní varianty pomocí implementovaného algoritmu. Byly uvažovány pouze varianty s frekvencí výskytu v populaci nad 5 %. Seznam strukturních variant exportovaný ve formátu CSV byl použit pro porovnání s výskytem v databázích NCBI a Ensembl. Na vyhodnocení byly použity aktivní tabulky a makra v programu Excel (viz příloha č. 10.4). Do porovnání získaných NGS dat s databázemi Ensembl a EBI (dříve NCBI, dnes archiv) byla zahrnuta všechna nalezená SNP bez ohledu na jejich přesnost a pravděpodobnost výskytu.

4.7 Přímé určení haplotypů

Technologie NGS Pacific Biosciencesdovoluje sekvenovat dlouhé úseky DNA, až 20 000 bází, proto lze výsledky v některých případech použít pro přímé určení haplotypů. Je tak možné obejít určování haplotypů pomocí statistické rekonstrukce z populačních dat. Limitující je délka ampliconů, neboť ty byly navrhovány s ohledem na možnost kapilárního sekvenování. Kombinace obou metod umožňuje určit jejich současný výskyt na jednom vlákně, což se navenek projevuje jako genetická vazba.

Úseky mezi nalezenými SNP byly v souboru s porovnanými sekvencemi ve formátu FASTA deletovány, takže zbyla matice nukleotidů, kde sloupce odpovídaly jednotlivým polymorfismům a řádky jednotlivých původním sekvencím (readům). Po abecedním seřazení řádků bylo možné odečítat jednotlivé haplotypy, i když v řadě případů byla nutná manuální editace zjevně chybně umístěných nukleotidů. I pro tuto funkci bylo vyvinuto makro v programu Excel (viz příloha č. 10.6), které umožnilo tyto manuální zásahy zautomatizovat a urychlit tak vyhodnocení haplotypů.

Částečná znalost haplotypů, alespoň v rozsahu jednotlivých amplikonů, dovolila určit tzv. diagnostické (tagging) SNP (tagSNP), které, pokud jsou genotypovány přednostně, dovolují určit další SNP, které s nimi jsou v prakticky absolutní vazbě. Tak lze snížit počet genotypovacích reakcí, pracnost a finanční náklady pro následné genotypování jednotlivých zvířat.

4.8 Návrh a provedení genotypovacích reakcí

Soubory nalezených SNP, respektive tagSNP, byly použity pro návrh genotypovacích reakcí typu extenze primeru, v používané komerční variantě označované jako reakce SNaPshot (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). V této metodě reakční směs obsahuje oligonukleotid, který 3' koncem přiléhá k variabilnímu místu templátové DNA, a směs fluorescenčně značených dideoxynukleotidtrifosfátů, které se inkorporují na variabilní místo působením DNA polymerázy, podle principu komplementarity. Protože dideoxynukleotidy působí jako terminátory polymerázové reakce, k inkorporaci dalších značených prekurzorů nedochází. Jednoznačně označené produkty reakce jsou následně odečítány na kapilárním sekvenátoru s pětikanálovou fluorescenční detekcí.

Sekvence přiléhající k místu polymorfismu zleva nebo zprava byla upravena na délku 21 – 27 nukleotidů, přičemž mění se počet bazí měl kompenzovat proměnlivé zastoupení bazí GC. Za optimální je považovaný 60 % obsah GC v daném úseku. Podle obsahu GC nebo podle překryvu s dalšími polymorfními místy byla vybrána pro další návrh přímá nebo reverzní sekvence. V případě reverzní sekvence byl použit reverzní komplement, protože v genotypovací reakci musí reagovat s opačným vláknem templátové DNA.

Navržené sondy pro reakci extenze primeru byly následně sdruženy do skupin – multiplexů pro racionalizaci reakce. Reakce SNaPshot byla prováděna v těchto skupinách v jednom reakčním objemu. Aby bylo možné produkty jednotlivých reakcí spolehlivě odlišit, byla hmotnost primerů záměrně odstupňována přidáním extenze polyT na 5' konec. Hmotnosti primerů v jednom multiplexu se potom lišily vždy nejméně o 5 nukleotidů.

Jako substrát pro reakci SNaPshot sloužily příslušné amplikony, které byly získány v PCR reakci s gDNA jednotlivých zvířat. Pro genotypování byla z úsporných důvodů použita standardní DNA polymeráza (Fermentas), nikoli nízkochybová polymeráza určená pro NGS.

Výchozí fragmenty v objemu 10 μ l byly přečištěny enzymatickým odstraněním nespotřebovaných jednovlákných primerů a deoxyribonukleotid fosfátů pomocí směsi 1 U/ μ l exonukleázy I a 0,3 U/ μ l alkalické fosfatázy FAST (Fermentas), tzv. směs EXOSAP, a to po dobu 1 hodiny při 37 °C. Poté byly enzymy inaktivovány při 75 °C po dobu 15 minut.

Reakční směs pro reakci SNaPshot obsahovala z 60 % firemní směs (SNaPshot Ready Reaction Mix) v základní koncentraci, z 30 % přečištěný PCR produkt a z 10 % extenzní primery v celkové koncentraci 0,02 μ M. Reakce byla prováděna v celkovém objemu 10 μ l po převrstvení minerálním olejem a uzavření fólií v PCR destičkách na termocykleru Primus 96+ (MWG Biotech). Jako program pro amplifikaci vyhovoval standardní doporučený program pro použití soupravy SNaPshot: 25 x 96 °C 10 vteřin, 50 °C 5 vteřin a 60 °C 30 vteřin, následně zchlazení na 4 °C.

Z reakční směsi byly odstraněny nespotřebované fluorescenčně značené primery působením 0,3 U/ μ l alkalické fosfatázy FAST (Fermentas) po dobu 1 hodiny při 37 °C s následnou inaktivací enzymu při 75 °C po dobu 15 minut.

Fluorescenční produkty byly přeneseny do formamidu a doplněny fluorescenčně značenými standardy GeneScan 120 LIZ (Thermo Fisher Scientific) v poměru 8,5 μ l formamidu na 1 μ l vzorku a 0,5 μ l standardů. DNA byla denaturována zahřátím na 5 minut při 95 °C a rychlým zchlazením. Následně byly vzorky děleny na kapilární elektroforéze (sekvenátoru) ABI 3130 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) na kolonkách o délce 36 cm obsahujících polymer POP7. Pět použitých fluoroforů bylo rozlišeno sadou filtrů E5. Po kalibraci matricovým standardem DS-02 obsahujícím fluorescenční barviva dR110, dRGG, dTAMRA, dROX a LIZ od výrobce Applied Biosystems. Primární elektroforegramy byly zpracovány programem PeakScanner (Thermo Fisher Scientific).

4.9 Analýza populačních dat vycházejících z reakcí SNaPshot

Po zpracování dat o populaci býků byl použit program GenAIEx (Peakall et Smouse, 2012) pracující jako add-in v programu Microsoft Excel. Data bylo nejprve třeba převést do numerického kódování, aby bylo možné přistoupit k jejich vyhodnocení.

4.10 Modelace proteinových produktů a určení dopadů SNP na změnu struktury produktu

Byly použity webové servery Phyre 2 (Kelley et al., 2015), Swiss Model (Biasini et al., 2014) a Yasara, Yasara Biosciences (2017). Program Phyre 2 (Kelley et al., 2015) posloužil také k predikci vazebných míst a vytvoření souboru PDB, se kterým pracuje program Yasara, Yasara Biosciences (2017). Yasara umožnila modelaci strukturních změn na základě záměny SNP a tedy aminokyselin v bílkovinném řetězci. Prokázané strukturní změny převedené do pořadí aminokyselin byly také testovány programem Protein Blast (Altschul, 1997), aby bylo možné zjistit, jak strukturní změny ovlivní funkci proteinových domén.

5 Výsledky

5.1 Příprava ampliconů TLR1 a TLR4 pro NGS

Primery pro geny TLR1 a TLR4 byly navrhovány nezávisle na diplomové práci odborným školitelem. Primery pro TLR4 byly publikovány v práci (Novák et al., 2016). Pro vlastní diplomovou práci byly převzaty. Bylo provedeno jejich standardní nařazení dle manuálu od dodavatele, připravila se PCR reakce. Amplicony byly vizualizovány na gelu a přečištěny pro potřeby sekvenování. Vzhledem k jejich použití poskytovaly standardní výtěžek reakce a nebyla nutná rozsáhlá optimalizace, nicméně byly upraveny anelační teploty u některých ampliconů podle aktuálních výsledků, a to jak pro použití polymerázy Fermentas, tak i Phusion. Amplicon č. 16 z genu TLR4 byl použit jako pozitivní kontrola v procesu optimalizace teplot a reakčních podmínek pro primery genu MyD88.

Pro přípravu směsného vzorku pro vysokokapacitní sekvenování byl nejdříve vytvořen směsný vzorek z genomické DNA z populace býků ČESTR. Celkem 168 vzorků gDNA bylo smícháno ekvimolárně do směsného vzorku 1. úrovně.

Populační vzorek gDNA byl následně použit jako templát pro amplifikaci všech fragmentů genů TLR1 a TLR4 podle tabulky č. 12. Všechny amplicony byly kvantifikovány na základě intenzity fluorescence produktů v gelové elektroforéze v porovnání se známými standardy a přibližný údaj o koncentraci byl použit pro vytvoření ekvimolárního směsného vzorku 2. úrovně. Pro dosažení ekvimolárnosti byla zohledněna molekulární hmotnost jednotlivých fragmentů.

Směs fragmentů TLR1 a TR4 byla následně spojena se směsným vzorkem amplifikačních fragmentů genu MyD88 z téže populace a po přečištění a kontrolách výtěžku a čistoty předán k sekvenování technologií PacBio jako jeden vzorek.

5.2.1 Amplifikace genu MyD88

Porovnáním referenční genomické sekvence mRNA genu MyD88 bylo nalezeno 5 exonů (označených jako exon 1 – 5) o celkové délce 2563 bází.

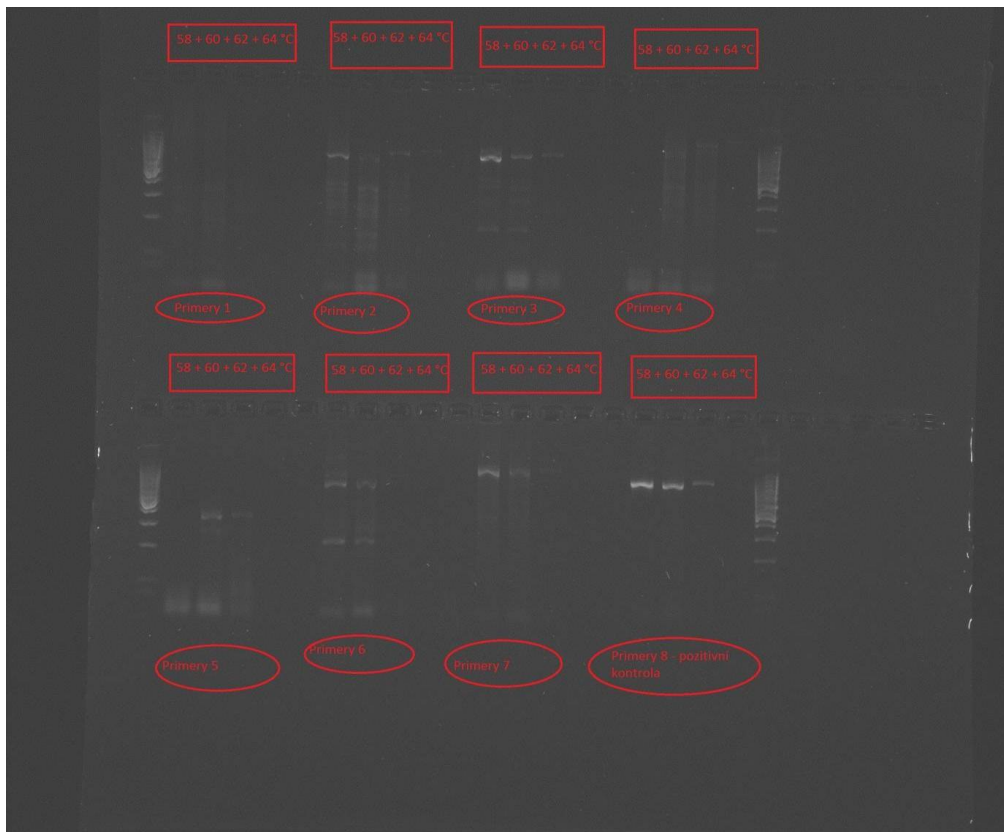
exon	začátek DNA	konec DNA	délka	Začátek RNA	Konec RNA
1	243	607	364	1	365
2	1486	1621	135	366	501
3	1960	2141	181	502	683
4	2312	2404	92	684	776
5	2674	4457	1783	777	2563

Tabulka 8: Exony genu MyD88

Při prvním pokusu se primery navrhovaly ručně a bylo vybráno celkem 5 párů primerů pro celý gen. Nicméně při optimalizaci teploty pro PCR reakce se ukázalo, že tyto primery mají malý výtěžek a ne všechny fungují. Proto se přistoupilo k výběru nových primerů pro tento gen, nyní pomocí on-line programů, které jsou k dispozici: BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design (2009), Primer3 Fragmentize & Loop Version – Overlap (1998), GenScript DNA Sequencing Primers Design Tool (2017), Primer3web: version 4.0.0 (2013). Následně byly tyto primery zkontrolovány v programech Tm Calculator od firmy Thermo Fisher Scientific (2017) a OligoAnalyzer 3.1 (2017) pro porovnání anelační teploty, teploty tání, možnosti tvorby vlásenkových struktur (hairpin) a vlastních dimerů.

Vzhledem k obtížím při amplifikaci GC bohatých oblastí v první polovině genu (až 70 % GC) byl proveden druhý návrh, v němž bylo vybráno 7 párů primerů.

Pro optimalizaci teploty pro PCR reakce byly vybrány teploty 56/58 °C, 58/60 °C, 60/62 °C a 62/64 °C, které pokrývají běžný rozsah teplot, při kterých primery většinou fungují. V PCR se spustí program uvedený v části Materiály a metody, výsledné produkty se poté vizualizují na gelové elektroforéze.



Obrázek 10: Optimalizace teploty pro PCR produkty primerů genu MyD88, gelová elektroforéza

- Jak je vidět z obrázku č. 10, primery č. 1 nebylo možné použít. Použijí se tedy primery z první série navrhovaných primerů, které fungovaly dobře při teplotách 58 a 60 °C.
- Primery č. 2 v první várce byly optimální při teplotě 64 °C, při teplotě 62 °C byly nespecifické. V druhém měření se ukazuje jako lepší zvolit teplotu 62 °C.
- Primery č. 3 vykazovaly dne 14.8. optimální signál při 60 °C, dne 18.8. vyšla lépe teplota 60 °C.
- Primery č. 4 zde na obrázku 10 z měření 18.8. 2017 nejsou viditelné, ale ze 14.8. byla ideální teplota 64 °C, signál při 62 °C byl slabší.
- Primery č. 5 dnes lepší při 62 °C, dne 14.8. také ideální při 62 °C.
- Primery č. 6 dnes pracují shodně při 58 a 60 °C, dne 14.8. byl shodný signál u 60 a 62 °C.
- Primery č. 7 dnes 58 nebo 60 °C, dne 14.8. byla ideální teplota 60 °C.

- Fragmenty nebyly pro kontrolu sekvenovány pomocí kapilární elektroforézy, ale dodatečně byla správnost fragmentů ověřena podle četností příslušných ekvencí přečtených při NGS.

Navržené primery a teploty, při kterých pracují:

Pořadové číslo	Název primeru	Sekvence (5'→3')	Aelační teplota PCR [°C]
1	MY_1F	GACTCTAGTGGACTGATGGGTGG (23)	60
2	MY_1R	AGCTGACAGTCTTGGAAATCTCAGGT (26)	60
3	My_2Fn	AGCAAGGGAGACATTGGAGA (20)	62
4	MY_2Rn	GCCTTTACCCACAGTCAGGA (20)	62
5	MY_3Fn	GCATCAGCAGTGGATCCTAGA (21)	60
6	MY_3Rn	CCCGAGACAAGCCCTAGTAG (20)	60
7	MY_4Fn	AGTCCAACCTCTAGTTTCGCA (21)	62
8	MY_4Rn	GTTCAGGGCATGGACAGG (18)	62
9	MY_5Fn	GAAGAAAGAGTTCCCCAGCA (20)	62
10	MY_5Rn	CCACCATCCTGGCTGATAAC (20)	62
11	MY_6Fn	TTCCTGGTTGAGAGCCATC (20)	60
12	MY_6Rn	AAGATGCCTGTATGTCTGTGC (21)	60
13	MY_7Fn	GGTTTCTGGGGCTAGGTCAT (20)	60
14	MY_7Rn	AGGATACAGAAGGGGGCAAT (20)	60

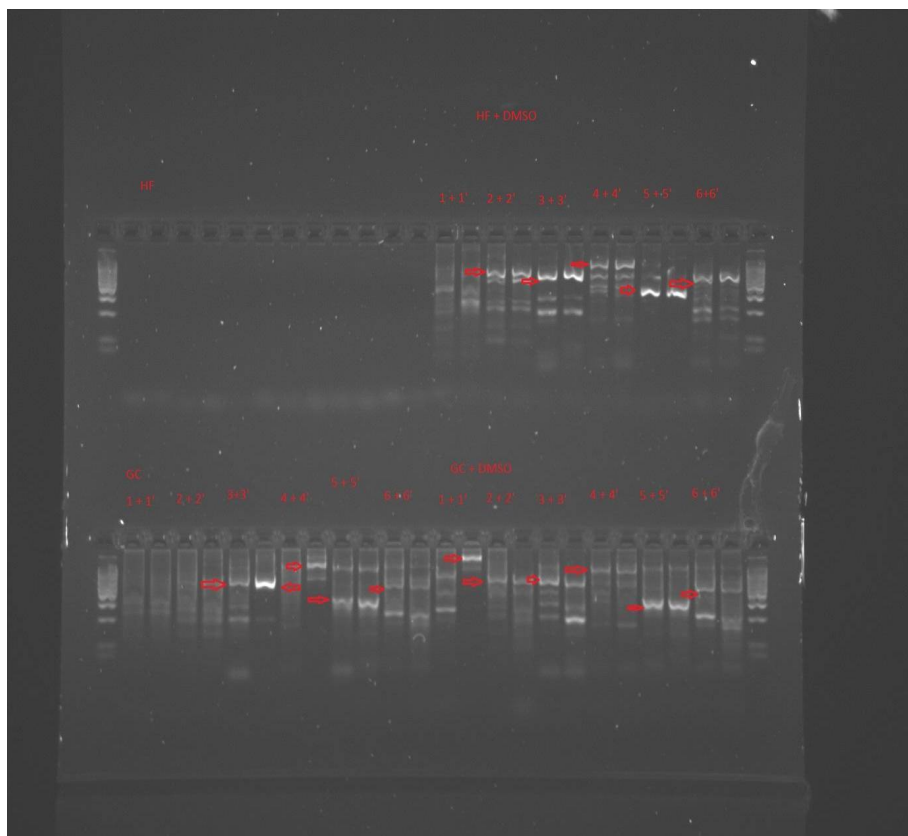
Tabulka 9: Navržené primery (2. návrh) a optimální teplota pro PCR fragmentů genu MyD88

Pro vyřešení amplifikace chybějících amplikonů byla testována polymeráza Phusion, která by měla poskytovat vyšší výtěžek PCR reakcí, generovat méně chyb pro NGS. Nicméně po první reakci se ukázalo, že PCR reakce proběhly ve shodě s výsledky polymerázy Taq Fermentaz.

Opakovaný neúspěšný výsledek mohl být důsledkem chybného programu termocykleru nebo negativního vlivu oblastí bohatých na GC. Bylo třeba pokusit se o získání všech fragmentů úpravou reakční směsi a amplifikačního programu.

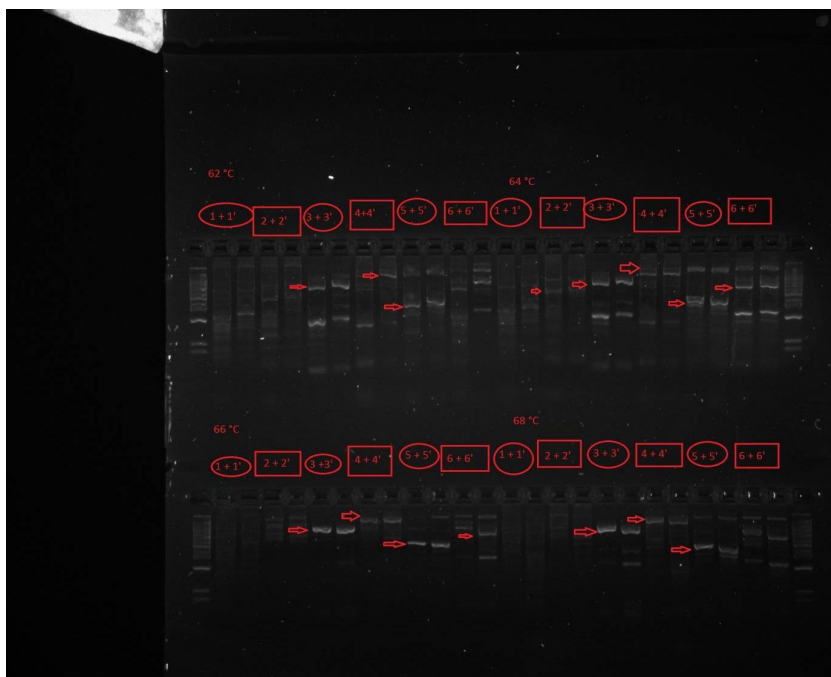
V prvním kroku byl porovnán použitý program v PCR přístrojích s doporučeními dodavatele Phusion polymerázy (web New England Biolabs, 2017), nicméně zásadní chyba nebyla nalezena.

Optimalizace koncentrace Mg^{2+} nebyla prováděna. Zvýšením koncentrace by se zvýšil výtěžek, ale zhoršila by se specifita reakcí. V souladu s doporučením výrobce (New England Biolabs) pro amplifikaci obtížných GC-rich úseků, což je případ genu MyD88, byl použit pufr GC ze soupravy místo standardního pufru HF a do reakční směsi byl přidán dimethylsulfoxid (DMSO) v doporučené koncentraci 3 %.



Obrázek 11: Vliv koncentrace DMSO na výtěžek amplifikace GC-bohatého genu MyD88

Jak je z obrázku č. 11 patrné, velmi dobré výsledky poskytuje kombinace HF + DMSO a také GC+ DMSO. Problém s GC je takový, že je zde nižší specifita reakcí, proto je vidět větší množství fragmentů. Proto byla v další práci použita kombinace pufru HF + DMSO a přistoupilo se k optimalizaci teploty. Pro PCR se použil upravený program se zvýšenou denaturační teplotou a dalšími denaturačními kroky. Byly připraveny nové reakce, v nichž bylo testováno 6 dvojic primerů při teplotách T_a 62, 64, 66 a 68 °C. Výsledek optimalizace je dokumentován na obr. č. 12.



Obrázek 12: Výsledek optimalizace T_a pro amplifikační reakce genu MyD88. Byla použita polymeráza Phusion v pufru GC s přidavkem 3 % DMSO a cyklovací program s podpořenou denaturací.

Po vyhodnocení gelů z optimalizace T_a reakce s polymerázou Phusion vyplynulo, že pro dvojici primerů MY1 a MY2n je vhodné provádět PCR při 64 °C a pro ostatní dvojice primerů při 66 °C.

Protože ani cestou optimalizace podmínek PCR nebylo dosaženo úplného pokrytí všech exonů amplikony z prvního a druhého návrhu, byla navržena třetí série PCR reakcí, a to na základě vlásenkové struktury genu. Ta byla vytvořena programem The UNAFold Web Server (Zuker, 2003). Vlášenková struktura (obr. č. 13) jasně ukazuje, proč primery navržené původně pro přední (5') část genu nemohly fungovat. Objevuje se zde spousta GC oblastí, které se automaticky párují s jinými částmi genu a vytváří tak obtížně denaturovatelnou strukturu.

Oblast genu, která byla pokryta amplikony 1, 2, 3 a částečně 4 vytváří téměř souvislé vlásenky, které díky bohatosti GC se po denuraci ihned vrací do své původní struktury a pro primery je obtížně na danou strukturu nasednout.



$dG = -680.13$ 17Nov14-06-20-13

Obrázek 13: Vlášenková struktra genu MyD88. Modelováno za pomoci serveru The UNAFold Web Server (Zuker, 2003)

Třetí návrh primerů proto vzal tuto okolnost v úvahu a amplifikační primery byly umístěny so smyček, které nehybridizují s komplementárními úseky genu. Návrh třetí sady amplifikačních primerů pro MyD88:

Primers	start	length	Seq.	Reverse complement
1Fn2	7	20	AGTGGACTGATGGGTGGAGC	
1Rn2	786	23	GACTAGTTCCTCTTTCAATACCG	GGTATTGAAAGAGGGAACTAGTC
2Fn2	741	22	GCAAGGGAGACATTGGAGACAG	
	126			
2Rn2	4	22	CTTCTCATAGCCAGAACACC	GGTGTCTGGCTATGAGAGAAG
	114			
3Fn2	1	23	CTTTCATGCTCTGCTCGCATCAG	
	147			
3Rn2	1	26	GTCTCTCCCTACAGAGGAGGACTGC	GCAGTCCTCCTCTGTAGGGAAGAGAC

Tabulka 10: Návrh nových primerů pro gen MyD88 na základě vlásenkové struktury.

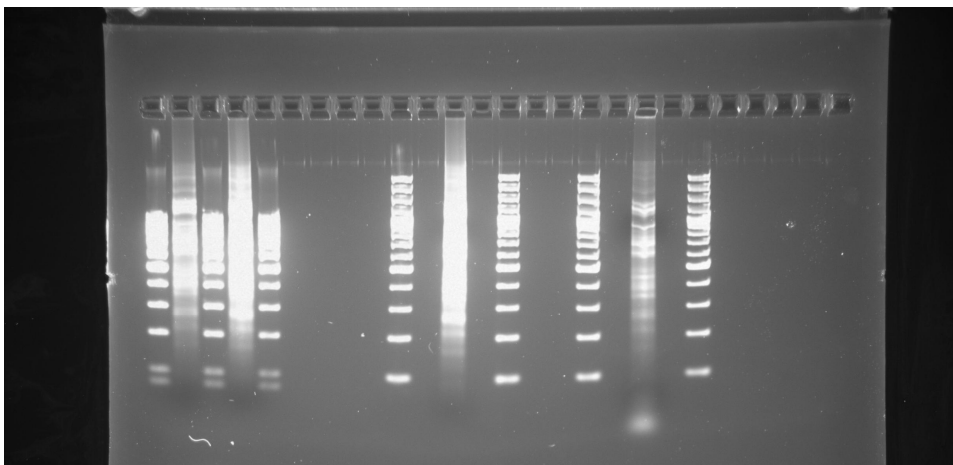
I když nové fragmenty nebyly z důvodu postupu práce využity ve směsném vzorku pro NGS, jsou v současné době testovány pro generování fragmentů, které jsou nezbytné jako vstupní materiál pro genotypovací reakce.

5.3 Cílené sekvenování populačního vzorku

5.3.1 Knihovna gDNA

Z inseminačních dávek býků plemene ČESTR, odebraných v období 2002 – 2017, byly úspěšně izolovány preparáty genomické DNA. Ty byly po kontrole na výtěžek, kontaminaci a degradaci naředěny na standardní koncentraci 20 ng/μl a skladovány ve formátu 96 jamkových mikrotitračních destiček pro efektivně navazující práci. Kvalita DNA pro následující enzymatické reakce byla ověřena amplifikací fragmentu č. 16 genu TLR, neboť tato dvojice primerů vykazuje spolehlivou reprodukovatelnost reakcí a případná absence produktu by signalizovala degradaci či přítomnost inhibitorů v genomické DNA.

Amplikony ze tří sledovaných genů byly připraveny v preparativních reakcích s nízkochybovou TaQ-polymerázou Phusion s použitím směsného ekvimolárního vzorku pro přípravu NGS knihovny a sekvenování. Směsný vzorek po přečištění na kolonkách NucleoSpin vykazoval hodnotu A_{260}/A_{280} rovnou 1,82, což je hodnota blízká doporučenému limitu servisní laboratoří pro technologii Pacific BioSciences. Ta požaduje čistotu 1,7 a vyšší. Rozložení hmotností amplikonu ve směsném vzorku, absence degradace a kontaminací byla doložena obrázkem z gelové alaktroforézy (obr. č. 14)



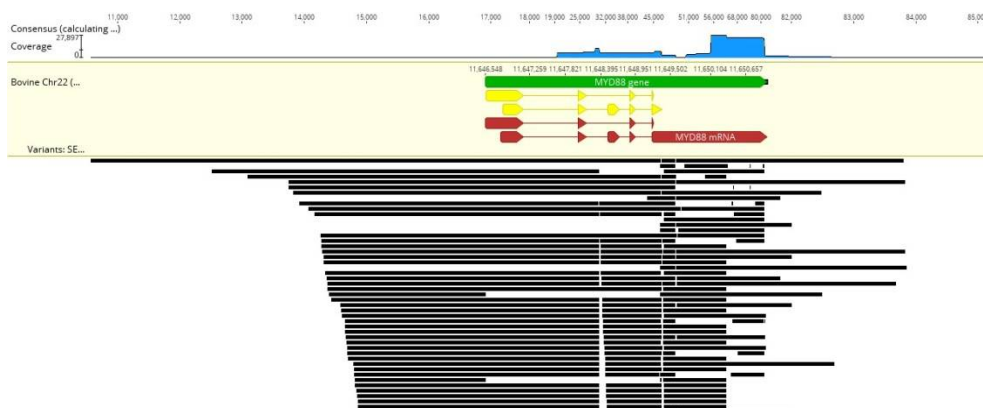
Obrázek 14: Kontrola čistoty u směsného vzorku připraveného pro NGS genotypování u firmy Pacific BioSciences

5.4 Zpracování dat NGS

5.4.1 Nalezené SNP

Po importování obdržených readů do programu Geneious, které firma nechala proběhnout celkem 3 x (celkem tedy 767 183 readů), byla využita funkce Align/Assemble, Map to reference, kde byla jako referenční sekvence použita aktuální verze bovinního chromozomu 22 pro gen MyD88, bovinního chromozomu 6 pro gen TLR1 a bovinního chromozomu 8 pro gen TLR4. Na těchto chromozomech byly geny nalezeny a daná oblast porovnána se všemi ready, aby se mohlo přistoupit k dalším krokům.

U genu MyD88 byl takto výborně pokryt koncový region genu, poněkud méně region střední části genu a ukázalo se, že se nepodařilo nalézt žádnou shodu v přední části genu. Celkem se s některou částí genu MyD88 shoduje 48 237 readů. Navíc byl proveden alignment pouze s kódující sekvencí, kde se přiřadilo celkem 6453 readů a s velkou přesností je pokryta koncová část kódující sekvence, s menší potom prostřední část.



Obrázek 15: Alignment readů z Pacific Biocienses. Print screen z programu Geneious 11R. Celý gen MyD88.

S genem TLR 1 našlo shodu 123 351 readů a byla pokryta oblast dvou třetin přední části genu. V koncové oblasti genu nebyla nalezena shoda.

U genu TLR4 byly pokryty kódující oblasti mRNA a shoda je v 38 208 readech. Následně byl proveden shodný allignemnet i s kódující oblastí DNA, zde je shoda v 35 538 readech.



Obrázek 16: Alignment readů z Pacific Biosciences. Print screen z programu Geneious 11R. Kódující oblast genu TLR4.

Jako další krok bylo využito vyhodnocení SNP variant, které program nabízí. Bylo nalezeno velké množství SNP s rozdílnou přesností. Tu hodnotíme pomocí hodnoty Variant P-Value (approximate) a strand bias. Pro všechny tři geny pracujeme s odlišnou přesností, která nám určuje, které SNP se v našem vzorku skutečně vyskytují. U genu MyD88 pracujeme s hodnotou P value menší než 10^{-250} , u genu TLR1 jde o hodnotu 10^{-275} a hodnotu strand bias 57 % a vyšší. A u genu TLR4 jsme stanovili hodnotu P value 10^{-270} a nižší a hodnota strand bias 57 % a vyšší u SNP, které měly hodnotu P-value 0,0. Celkem se nám podařilo identifikovat tyto SNP, které se vyskytují ve vzorcích býků u plemene ČESTR.

TLR1 – příloha č. 10.1

TLR4 – příloha č. 10.2

5.5 Porovnání nalezených polymorfismů s databázemi

Nalezené SNP byla porovnána s SNP zaznamenanými v databázi dbSNP u NCBI a databázi SNP v databázi Ensembl.

Po srovnání dat ze vzorků a jednotlivými databázemi proběho také porovnání databází mezi sebou. I zde byly nalezeny některé shody, není jich ale tolik, kolik jsme předpokládali. Tato SNP byla následně konfrontována s přesností, kterou jsme požadovali na potvrzení výskytu SNP.

U genu MyD88 se podařilo identifikovat celkem 72 shod mezi nalezenými SNP a databázemi. Přehled shodných SNP uvádím v příloze 10.5. Pouze u 4 SNP bylo dosaženo požadované přesnosti, abychom s jistotou mohli pohlásit, že jsou prokázány i v NGS datech. Jmenovitě se jedná o řádky označené modře (shoda pouze s databází Ensembl) a fialové (shoda s EBI a Ensembl). Tyto SNP uvádím v tabulce níže:

NGS data			Ensembl						
Poloha na chromozómu 22	Změna	Báze v ref. sekven ci	Frekvence varianty	Variant ID	Poloha	Variantní alela	Alely	Typ změny	Transkript
11647950	T -> G	T	8.1%	rs43744697 6	22:1164 7950	A	T/A/ G	intron variant	ENSBTAT0000 0048711.3
11648472	A -> G	A	6.9%	rs45456342 4	22:1164 8472	G	A/G	intron variant	ENSBTAT0000 0000735.3
11649096	A -> G	A	51.9%	rs41995876	22:1164 9096	G	A/G	intron variant	ENSBTAT0000 0000735.3
11649252	C -> A	C	7.4%	rs45263371 4	22:1164 9252	A	C/A	stop gained	ENSBTAT0000 0048711.3

Tabulka 11: Prokázaná shoda NGS dat a databáze Ensembl

NGS data			EBI			
Poloha na chromozómu 22	Změna	Báze v ref. sekvenci	Frekvence varianty	Název sekvence	Jméno	Poloha ve vytvořené konsesní sekvenci
11648472	A -> G	A	6.9%	454563424	A/G	11648472
11649096	A -> G	A	51.9%	41995876	A/G	11649096
11649252	C -> A	C	7.4%	452633714	A/C	11649252

Tabulka 12: Prokázaná shoda NGS dat a databáze EBI (dříve NCBI)

Gen TLR1 a porování s databází EDB (NCBI) je uvedený níže.

**NGS
Data**

EBI (NCBI)

Poloha	Změna	Typ polymorfismu	Frekvence varianty	Název sekvence	Jméno	Poloha ve vytvořené konsesní sekvenci
467	T -> G	SNP (transversion)	5.7%	435314992 (reversed)	T/G	455
472	C -> A	SNP (transversion)	7.7%	473070844 (reversed)	C/A	467
475	C -> A	SNP (transversion)	7.8%	473070844 (reversed)	C/A	467
452	G -> A	SNP (transition)	8.5%	211470340	A/G	452
2051	G -> A	SNP (transition)	8.8%	798908901 (reversed)	G/A	2051
2554	C -> A	SNP (transversion)	37.3%	432146366 (reversed)	C/A	2554
2854	G -> C	SNP (transversion)	19.8%	466488170 (reversed)	G/C	2854

Tabuka 13: Prokázaná shoda NGS dat a databáze EBI (dříve NCBI)

Průniku porovnání dat z databáze EBI a nalezeného souboru SNP při požadované přesnosti shody neodpovídá žádné SNP. Tento vzácný případ může ukazovat na posun referenční sekvence nukleotidů při vyhodnocování dat ukládaných v EBI. Nicméně tento předpokládaný rozdíl v referenčních sekvencích se nepodařilo prokázat, tudíž nemohla být provedena korekce v lokalizaci SNP z obou zdrojů.

U genu TLR4 bylo porovnání s databázemi o něco úspěšnější než v případě genu TLR1, ale zdaleka ne tak úspěšné jako v případě genu MyD88. Byla nalezena shoda v celkem 22 SNP, přičemž 19 z nich ospovídalo databázi Ensembl a zbylé v databázi EBI.

Při porovnání dat z NGS s databázovými daty se nepodařilo prokázat s dostatečně zvolenou přesností žádné SNP z databáze EBI a pouze 4 z databáze Ensembl.

NGS Data

Ensembl

Poloha na chromozomu 8	Identifikátor proteinu	Změna aminokyseliny	Kodon v kódující sekvenci	Poloha v kódující sekvenci	Poloha v kodonu	Změna	Báze v referenční sekvenci	Frekvence variant	Identifikátor varianty	Poloha	Alely	Typ polymorfismu	Předpokládaný efekt
108839108	NP_776623.5	A -> G	815	2444	2	C -> G	C	6.8%	rs432553192	8:108839108	C/G	missense variant	deleterious
108836877						T -> C	T	5.9%	rs435152510	8:108836877	T/C	intron variant	-
108836897						G -> A	G	21.7%	rs43578100	8:108836897	G/A	intron variant	-
108836893						T -> A	T	7.9%	rs437810046	8:108836893	T/A	intron variant	-
108839056	NP_776623.5	W -> G	798	2392	1	T -> G	T	5.9%	rs440855431	8:108839056	T/G	missense variant	deleterious
108836999	NP_776623.5	N -> T	112	335	2	A -> C	A	5.1%	rs444660651	8:108837004	A/C	missense variant	tolerated
108836993	NP_776623.5	T -> R	110	329	2	C -> G	C	5.5%	rs462096397	8:108836993	C/G	missense variant	deleterious
108836855						G -> T	G	6.1%	rs464675299	8:108836855	G/T	intron variant	-
108839144	NP_776623.5	T -> K	827	2480	2	C -> A	C	7.0%	rs474584439	8:108839144	C/A	missense variant	tolerated - low confidence
108837443	NP_776623.5	L -> W	260	779	2	T -> G	T	7.1%	rs475783986	8:108837443	T/G	missense variant	deleterious
108839073	NP_776623.5		803	2409	3	G -> T	G	5.3%	rs477217454	8:108839073	G/T	synonymous variant	-

108837278	NP_776623.5	N -> T	205	614	2	A -> C	A	6.1%	rs480079138	8:108837278	A/C	missense variant	deleterious
108838928	NP_776623.5	A -> G	755	2264	2	C -> G	C	5.5%	rs481275800	8:108838934	C/G	missense variant	tolerated
108838941	NP_776623.5	Q -> H	759	2277	3	G -> T	G	5.6%	rs483203346	8:108838941	G/T	missense variant	deleterious
108833985						A -> G	A	15.3%	rs8193046	8:108833985	A/G	intron variant	-
108837492	NP_776623.5		276	828	3	C -> T	C	6.8%	rs8193051	8:108837492	C/T	synonymous variant	-
108837831	NP_776623.5		389	1167	3	T -> G	T	35.5%	rs8193057	8:108837831	T/G	synonymous variant	-
108838320	NP_776623.5		552	1656	3	C -> T	C	19.1%	rs8193060	8:108838320	C/T	synonymous variant	-
108838685	NP_776623.5	T -> I	674	2021	2	C -> T	C	7.4%	rs8193069	8:108838685	C/T	missense variant	tolerated

Tabulka 14: Porovnání nalezených SNP genu TLR4 s databází SNP Ensembl. Modře označená je shoda mezi databázemi EBI a Ensembl

Polymorphism Type	Original seq.	Change	Variant P-Value approx.	Strand-Bias	Ref. Freq.	Variant Freq.	protein id	AA Change	CDS Codon Nr.	CDS Interval	CDS Position	Position Within Codon	Protein Effect
SNP (transversion)	108837278	A -> C	8.3E-272	59.1%	81.3%	6.1%	NP_776623.5	N -> T	205	3	614	2	Substitution
SNP (transversion)	108837443	T -> G	0.0	57.5%	73.0%	7.1%	NP_776623.5	L -> W	260	3	779	2	Substitution
SNP (transition)	108837492	C -> T	0.0	57.0%	86.1%	6.8%	NP_776623.5		276	3	828	3	None
SNP (transition)	108838685	C -> T	0.0	61.2%	81.0%	7.4%	NP_776623.5	T -> I	674	3	2021	2	Substitution

Tabulka 15: Shoda s daty NGS a databází Ensembl na požadované přesnosti, gen TLR4

NGS Data

EBI (NCBI)

Poloha na chromozomu 8	Aminokyselino vá záměna	CDS kodonové číslo	CDS pozice kodonu	Pozice v kodonu	Změna	Referenční báze	Frekvence varianty	Označení sekvence	Name	Poloha ve vytvořené konsenzí sekvenci
108833985					A -> G	A	15.3%	8193046	A/G	108833986
108837444	L -> F	260	780	3	G -> T	G	7.6%	475783986	G/T	108837444
108838686		674	202	2	C -> T	C	6.0%	8193069	C/T	108838686
108838938	W -> C	758	227	4	G -> C	G	5.4%	469971212	C/G	108838938

Tabulka 16: Porovnání nalezených SNP v genu TLR4 s databází EBI (NCBI). Modře označené SNP jsou shodné mezi databázemi Ensembl a EBI

5.6 Určení haplotypů v jednotlivých genech

Pro gen MyD88 a gen TLR4 byly vybrány SNP s nejmenší pravděpodobností falešných pozitivů a to na základě hodnoty P určované programem Geneious 11R pro detekci strukturních variant. Hodnota P se u genu MyD88 pohybovala pod hodnotou 10^{-250} , u genu TLR4 šlo o hodnotu 10^{-300} . Jako horní limit pro P byla přijata hodnota 0,001. Tyto SNP byly podle polohy přiřazeny ve skupinách ke ampliconům sekvenovaných v celku technologií PacBio. V rámci každého ampliconu se hodnotilo, zda se polymorfismy vyskytují v haplotypech a v jakých. U genu TR1 se vzhledem k nízké přesnosti ukázal problém s hodnotou P, která se vzhledem k algoritmu výpočtu neprojevila a ukazovala se u všech SNP hodnota 0. Proto bylo nutné nalézt jiné selekční kritérium. Tím se nakonec stala hodnota Strand bias. Ta byla odhadem stanovena na hodnotu 60 % a vyšší.

5.6.1 Haplotypy genu MyD88

Hodnocení genu MyD88 probíhalo jako první. Bohužel, z pohledu zpětné retrospektivy zde vzniklo větší množství chyb, které se podařilo dohledat až zpětně. Proto byly některé SNP hodnoceny 2 krát, což vedlo k neúměrně velkým ampliconům.

Amplicon	Umístění na chromozomu	Umístění na genu	Záměna	Variant p-value	Frekvence změny
My_2n	11647703	1155	C->G	0	38,80%
My_2n +	11647731	1183	C->T	1,50E-265	8,10%

3n					
My_2n + 3n	11647770	1222	G->T	2,10E-292	8,60%
My_2n + 3n	11647930	1382	G->C	1,40E-251	7,70%
My_2n + 3n	11647950	1402	T->G	4,70E-274	8,10%
My_2n + 3n	11647954	1406	G->C	8,60E-258	7,80%
My_2n + 3n	11647978	1430	G->T	1,30E-274	8,00%
My_3n	11647999	1451	G->T	1,20E-253	7,60%
My_3n	11648002	1454	G->A	1,60E-264	7,80%
My_3n	11648071	1523	G->A	6,30E-282	8,10%
My_3n	11648124	1576	G->A	4,20E-278	7,90%
My_3n	11648160	1612	C->A	1,1E-316	8,50%
My_3n	11648164	1616	G->A	4,30E-208	6,70%
My_3n	11648164	1616	C->T	4,90E-235	7,20%
My_3n	11648168	1620	G->T	2,60E-270	7,80%
My_3n	11648189	1641	T->C	1,5E-320	8,60%
My_3n	11648194	1646	G->C	1,2E-317	8,60%
My_3n	11648196	1648	C->A	7,1E-310	8,40%
My_3n	11648207	1659	G->T	3,50E-271	7,80%
My_3n	11648209	1661	G->T	1,40E-255	7,50%
My_3n	11648231	1683	G->A	8,50E-250	7,40%
My_3n	11648251	1703	G->T	5,70E-267	7,70%
My_3n	11648253	1705	G->C	4,50E-265	7,70%
My_3n	11648299	1751	A->T	9,40E-274	7,80%
My_3n	11648312	1764	A->C	2,60E-253	5,60%
My_3n	11648314	1766	C->A	6,50E-289	6,00%
My_3n	11648344	1796	T->C	3,00E-269	5,70%
My_3n	11648352	1804	A->C	1,40E-271	5,80%
My_3n	11648355	1807	G->C	6,70E-286	5,90%
My_4n	11648375	1827	G->T	3,20E-263	6,30%
My_4n	11648507	1959	G->C	1,20E-264	8,00%
My_4n	11648735	2187	C->A	7,00E-267	8,10%
My_4n	11648764	2216	C->G	1,30E-254	7,90%
My_4n	11648800	2252	C->A	2,7E-313	8,90%
My_4n	11648853	2305	C	2,70E-299	26,90%
My_4n	11648988	2440	G->C	1,5E-321	9,10%

My_4n	11649039	2491	G->A	2,20E-264	8,10%
My_5n	11649206	2658	T->C	6,50E-268	8,00%
My_5n	11649243	2695	C->A	5,70E-264	7,90%
My_5n	11649333	2785	G->T	1,1E-316	7,50%
My_5n	11649336	2788	C->T	3,70E-296	7,20%
My_5n	11649355	2807	G->C	1,90E-276	7,00%
My_5n	11649375	2827	T->A	2,10E-252	10,80%
My_5n	11649386	2838	C->T	5,70E-238	11,10%
My_5n	11649388	2840	G->T	4,80E-222	10,70%
My_5n	11649390	2842	G->A	9,90E-242	11,20%
My_5n	11649418	2870	C->T	1,90E-239	10,90%
My_5n	11649437	2889	C->A	1,1E-313	12,90%
My_5n	11649455	2907	G->A	7,30E-277	11,90%
My_5n	11649557	3009	G->A	5,00E-202	9,90%
My_5n	11649560	3012	C->A	2,30E-264	11,70%
My_6n	11649573	3025	C	8,00E-205	10,00%
My_6n + 5n	11649600	3052	T->A	3,00E-263	11,60%
My_6n	11649766	3218	G->C	1,10E-276	24,60%
My_6n	11650100	3552	T->A, T->C	8,50E-255	8,30%
My_6n	11650102	3554	A->C	2,00E-275	8,60%
My_6n	11650104	3556	G->A	1,90E-271	7,90%
My_7n	11650556	4008	G->A	0	8,90%
My_7n	11650711	4163	A->G	1,50E-219	5,60%
My_7n	11650711	4163	A->G	1,50E-219	5,60%
My_7n	11650738	4190	C	3,30E-209	5,30%
My_7n	11650770	4222	C->T	3,4E-313	5,40%

Tabulka 17: Hodnocené SNP v genu MyD88 z pohledu haplotypů

Nalezené haplotypy pro gen MyD88 na základě jednotlivých ampikonů jsou uvedeny v následujících přehledech (zobrazeny jsou haplotypy s frekvencí výskytu nad 1 %):

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
CCGGTCG	108	0,0169	1,69
CCGGTGG	275	0,0430	4,30
CCTGTGG	64	0,0100	1,00
GCGCTGG	294	0,0460	4,60
GTGGTGG	286	0,0447	4,47
GTGGTGT	85	0,0133	1,33

GCGGGCG	78	0,0122	1,22
GCGGGGG	269	0,0420	4,20
GCGGTTCG	312	0,0488	4,88
GCTGGGG	83	0,0130	1,30
GCGGTGG	3622	0,5661	56,61
GCGGTGT	304	0,0475	4,75
GCTGTGG	295	0,0461	4,61
GCTGTTCG	156	0,0244	2,44
GTGGGGG	101	0,0158	1,58
GCGCTGT	65	0,0102	1,02

Tabulka 18: Amplikon 2 genu MyD88 a nalezené haplotypy.

V amplikonu č. 3 bylo vybráno celkem 26 SNP, které odpovídaly polohou. Již na základě předběžných výsledků z přiřazení NGS readů byla vyslovena domněnka, že v tomto amplikonu se ready rozpadají, proto nebude možné stanovit haplotypy. Analýza tuto domněnku potvrdila.

U amplikonu č. 4 byly nalezeny následující haplotypy:

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
GGCCCCA	158	0,0171	1,71
GCCCCGG	294	0,0319	3,19
GGACCCGG	391	0,0424	4,24
GCCCCCG	122	0,0132	1,32
GGCCCCG	366	0,0397	3,97
GGCCCCGG	6630	0,7191	71,91
GGCGCCGG	321	0,0348	3,48
GGCCCCGA	325	0,0352	3,52
TCCCCGG	222	0,0241	2,41
TGCCCCGG	391	0,0424	4,24

Tabulka 19: Amplikon 4 genu MyD88 a nalezené haplotypy

V tomto amplikonu se na rozdíl od ostatních amplikonů vyskytovala celkově velmi malá variabilita. Tato oblast genu patří pravděpodobně ke konzervovaným částem genu. Navíc, poslední SNP T->A bylo omylem zařazeno do vyhodnocení haplotypů 5 a 6.

U amplikonu č. 5 byly nalezeny tyto haplotypy:

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
CAGCGTCGGCCGCT	177	0,0193	1,93
CCGCGTCGGCCGCT	390	0,0426	4,26
TAGCGTCGGCCGCT	349	0,0381	3,81

TAGTGTCGGCCGCCT	134	0,0146	1,46
TCGCCTCGGCCGCCT	431	0,0471	4,71
TCGCGACGGCCGCCT	258	0,0282	2,82
TCGCGTCGGCCGACT	122	0,0133	1,33
TCGCGTCGGCCAACT	84	0,0092	0,92
TCGCGTCGGCCGACT	131	0,0143	1,43
TCGCGTCGGCCACCT	131	0,0143	1,43
TCGCGTCGGTGCCT	134	0,0146	1,46
TCGCGTCGGCCGCCA	248	0,0271	2,71
TCGCGTCGGCCGCCT	5056	0,5524	55,24
TCGCGTCGGCAGCCT	119	0,0130	1,30
TCGCGTCGGCCGCGT	109	0,0119	1,19
TCGTCTCGGCCGCCT	111	0,0121	1,21
TCGTGTCGGCCGCCT	354	0,0387	3,87
TCTTGTCGGCCGCCT	206	0,0225	2,25
TCGCGTCTGCCGCCT	207	0,0226	2,26
TCGCGTTGGCCGCCT	161	0,0176	1,76
TCTCGTCGGCCGCCT	371	0,0405	4,05

Tabuka 20: Amplikon 5 genu MyD88 a nalezené haplotypy

V amplikonu 6 se, stejně jako v ostatních, vyskytovalo velké množství haplotypů s frekvencí přibližně 0,5 %. Variabilita je zde tedy velká. Amplikon č. 6 a jeho haplotypy jsou zobrazeny v následující tabulce:

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
ATGTAG	119	0,0165	1,65
ATCTCG	104	0,0144	1,44
ATCTAG	159	0,0220	2,20
CTGTAG	177	0,0245	2,45
CACCAG	129	0,0179	1,79
CACTAG	162	0,0224	2,24
CTCAAG	267	0,0369	3,69
CTCCAA	156	0,0216	2,16
CTCCAG	187	0,0259	2,59
CTCTCA	113	0,0156	1,56
CTCTAA	234	0,0324	3,24
CTCTAG	3795	0,5252	52,52
CTCTCG	160	0,0221	2,21
CTGAAG	129	0,0179	1,79
GTCTAG	167	0,0231	2,31
GACAAA	99	0,0137	1,37

GACTAG	78	0,0108	1,08
GTGTAG	135	0,0187	1,87
GTCTCG	88	0,0122	1,22
GTCCAG	97	0,0134	1,34
GTCAAG	110	0,0152	1,52

Tabulka 21: Amplikon 6 genu MyD88 a nalezené haplotypy

Amplikon č. 7 u genu MyD88 poskytl následující haplotypy:

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
AAACC	12164	0,4630	46,29671919
AAACT	602	0,0229	2,291238487
AAAGC	4046	0,1540	15,39925402
AAATC	776	0,0295	2,953490142
AGACC	719	0,0274	2,736545634
GAACC	4405	0,1677	16,76562381
GAAGC	2583	0,0983	9,831011646
GAATC	315	0,0120	1,198903859
GGACC	329	0,0125	1,252188475
GGAGC	335	0,0128	1,275024739

Tabulka 22: Amplikon č. 7 genu MyD88 a nalezené haplotypy

U haplotypů tohoto amplikonu se třetí SNP ukázalo být monomorfní.

5.6.2 Haplotypy genu TLR4

Ačkoli bylo u TLR4 použito celkem 9 vzájemně se překrývajících amplikonů, hodnocená SNP se pohybovala pouze ve 4 amplikonech a sice T4_3_1, T4_3_2, T4_3_3 a T4_3_5.

Identifikace SNP a jejich umístění na genu TLR4 a na chromozomu 8 je uvedeno níže:

Amplikon	Umístění na chromozomu	Umístění na genu	Záměna	Variant p-value	Frekvence změny
T4_3_1	108836904	8005	C->T	3,30E-306	6,40%
T4_3_1	108836983	8084	T->C	5,1E-311	6,40%
T4_3_1	108837021	8122	G->T	1,00E-305	6,20%
T4_3_1	108837061	8162	G->C	2,20E-303	5,30%
T4_3_1	108837095	8196	T->C	3,5E-323	6,40%
T4_3_1	108837156	8257	C->T	4,40E-305	6,20%
T4_3_1	108837239	8340	A->T	2,70E-308	5,90%
T4_3_1	108837315	8416	T->A	4,2E-320	6,70%
T4_3_1	108837316	8417	A->T	1,10E-302	5,80%
T4_3_1	108837371	8472	A->T	1,30E-209	5,30%
T4_3_1	108837412	8513	C->T	6,4E-317	6,60%
T4_3_1	108837418	8519	G->T	5,70E-308	6,40%

T4_3_2	108837500	8601	G	1,7E-313	25,00%
T4_3_2	108837590	8691	A->T	1,9E-316	5,90%
T4_3_2	108837625	8726	G->A	7,5E-318	6,40%
T4_3_3	108838629	9730	C->T	1,3E-313	7,10%
T4_3_3	108838749	9850	G->A	9,2E-315	6,50%
T4_3_3	108838867	9968	A->T	2,4E-311	7,30%
T4_3_3	108838911	10012	C->T	2,10E-307	7,30%
T4_3_5	108839032	10133	C->T	2,0E-317	7,00%
T4_3_5	108839040	10141	G->A	4,40E-304	6,70%
T4_3_5	108839043	10144	C->A	4,0E-317	6,20%
T4_3_5	108839144	10245	C->A	7,6E-322	7,00%
T4_3_5	108839185	10286	A->C	7,90E-307	6,80%
T4_3_5	108839202	10303	C->T	1,8E-315	6,90%
T4_3_5	108839266	10367	G->T	6,90E-304	6,80%
T4_3_5	108839270	10371	C->A	0,00E+00	6,90%

Tabulka 23: Identifikace SNP v genu TLR4 vybraných pro určení haplotypů

Haplotypy u prvního amplikonu:

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
CTGGTCTTATCG	371	0,0273	2,73
CTGGTTATATCG	435	0,0320	3,20
CTTGTCATATCG	428	0,0315	3,15
CCGGTCATATCG	436	0,0321	3,21
CTGCTCATATCG	533	0,0392	3,92
CTGGCCATATCG	470	0,0346	3,46
CTGGTCAAATCG	278	0,0205	2,05
CTGGTCATATCG	7019	0,5166	51,66
CTGGTCATATCT	449	0,0330	3,30
CTGGTCATATTG	424	0,0312	3,12
CTGGTCAATTCG	187	0,0138	1,38
CTGGTCATTTTCG	222	0,0163	1,63
TTGGTCATATCG	402	0,0296	2,96

Tabulka 24: Amplikon T4_3_1 v genu TLR4 a nalezené haplotypy

Haplotypy amplikonu 2:

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
GAA	829	0,0645	6,45
GAG	11265	0,8763	87,63
GTA	54	0,0042	0,42
GTG	707	0,0550	5,50

Tabulka 25: Amplikon T4_3_2 genu TLR4 a nalezené haplotypy

Amplikon 3 genu TLR4:

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
CAAC	600	0,0653	6,53
CGAC	6877	0,7481	74,81

CGAT	481	0,0523	5,23
CGTC	475	0,0517	5,17
TGAC	511	0,0556	5,56

Tabulka 26: Amplikon T4_3_3 genu TLR4 a nalezené haplotypy

Amplikon 4 v genu TLR4:

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
CACCACGC	315	0,034291313	3,429131287
CGACACGC	423	0,046048334	4,604833442
CGCAACGC	363	0,039516656	3,951665578
CGCCACGA	335	0,036468539	3,646853908
CGCCACGC	5269	0,573590246	57,3590246
CGCCACTC	351	0,03821032	3,821032005
CGCCATGC	340	0,037012846	3,701284563
CGCCCCGC	374	0,04071413	4,07141302
TGCCACGC	395	0,043000218	4,300021772
CAACACGC	83	0,009035489	0,903548879

Tabulka 27: Amplikon T4_3_5 genu TLR4 a nalezené haplotypy

5.6.3 Haplotypy genu TLR1

U genu TLR1 byly celkem 3 amplikony. I v tomto případě byly hodnoceny jednotlivě.

Shrnutí SNP použitých pro určení haplotypů je níže:

Amplikon	Umístění na chromozomu	Umístění na genu	Záměna	Strand Bias	Frekvence změny	Pozn.
1	59728946	499	C->A	63.3%	5.8%	
1	59728949	502	T->A	65.9%	5.5%	
1	59728975	528	T->C	62.6%	5.7%	
1	59729014	567	A->G	60.5%	5.8%	
1	59729049	602	T->G	64.1%	5.6%	
1	59729067	620	C->A	60.3%	5.6%	
2	59729399	952	T->A, T->C	67.3%	5.4%	
2	59729432	985	T->G	64.7%	6.1%	
2	59729438	991	C->T, C->A	63.1%	5.9%	
2	59729471	1024	C->A	61.3%	5.2%	
2	59729514	1067	G->C	60.3%	7.8%	vyločen při zpřísnění pravidel
2	59729568	1121	G->T	60.3%	5.8%	vyločen při zpřísnění pravidel
2	59729570	1123	C->T	60.7%	5.5%	vyločen při zpřísnění pravidel
2	59729636	1189	G->T	64.9%	6.3%	

2	59729639	1192	C->T	62.4%	6.0%	
2	59729644	1197	C->A	60.3%	6.7%	vyločen při zpřísnění pravidel
2	59729645	1198	A->T	61.3%	5.6%	
2	59729650	1203	A->C	61.5%	6.1%	
2	59729683	1236	A->T	63.0%	5.2%	
2	59729707	1260 - 1261	T(4)->T(5)	63.5%	6.6%	vyločen při zpřísnění pravidel
2	59729792	1345	G->A	62.8%	5.2%	
3	59729834	1387	G->A	62.5%	6.7%	
3	59729837	1390	T->A	60.9%	6.7%	
3	59729863	1416	G->A	60.6%	7.1%	
3	59729884	1437	A->T	60.2%	6.5%	
3	59729961	1514	C->T	60.2%	13.9%	
3	59729963	1516	T->A	62.1%	12.7%	
3	59730072	1625	G->T	62.3%	7.7%	

Tabulka 28: SNP genu TLR1 zahrnutých do počítání haplotypů

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
CTTATA	1924	0,0442	4,42
CTTATC	29075	0,6680	66,80
CTTGTC	1760	0,0404	4,04
ATTATC	1942	0,0446	4,46
CATATC	1933	0,0444	4,44
CTCATC	1771	0,0407	4,07
CTTAGC	1227	0,0282	2,82
CTTGGC	118	0,0027	0,27
CTTGTA	167	0,0038	0,38
ATTATA	237	0,0054	0,54
ATTGTC	201	0,0046	0,46
CACATC	232	0,0053	0,53
CATAGC	147	0,0034	0,34
CATATA	276	0,0063	0,63
CATGTC	185	0,0043	0,43
CTCAGC	149	0,0034	0,34
CTCATA	197	0,0045	0,45
CTCGTC	170	0,0039	0,39
CTTAGA	180	0,0041	0,41
ATCATC	174	0,0040	0,40
ATTAGC	153	0,0035	0,35

AATATC	239	0,0055	0,55
--------	-----	--------	------

Tabuka 29: Amplikon č. 1 genu TLR1 a nalezené haplotypy

V druhém amplikonu TLR1 bylo nalezeno celkem 15 SNP. Protože se při vyhodnocení ukázalo, že je tento počet těžce zvládnutelný, bylo přistoupeno k jejich redukcii. Bylo vypuštěno SNP T4 → T5 a dále bylo zpřísněno selekční kritérium na strand bias větší než 61 % (u zbylých dvou aplikonů je 60 %). Celkově se tedy hodnotilo 10 SNP.

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%) %
ATCCGCAAAG	1664	0,0229	2,29
CTCCGCAAAG	11750	0,1618	16,18
TGCCGCAAAG	1325	0,0182	1,82
CTCCGACAG	611	0,0084	0,84
TTTCGCAAAG	1249	0,0172	1,72
TTACGCAAAG	1221	0,0168	1,68
TTCAGCAAAG	1169	0,0161	1,61
TTCCGCAAAA	1779	0,0245	2,45
TTCCGCAAAG	29982	0,4129	41,29
TTCCGCAATG	1036	0,0143	1,43
TTCCGCACAG	1078	0,0148	1,48
TTCCGCTAAG	1017	0,0140	1,40
TTCCGTAAAG	1138	0,0157	1,57
TTCTCAAAG	1137	0,0157	1,57
ATCCGCTAAG	107	0,0015	0,15
ATCCTCAAAG	99	0,0014	0,14
ATTCGCAAAG	159	0,0022	0,22
CGCCGCAAAG	681	0,0094	0,94
CTACGCAAAG	642	0,0088	0,88
CTCAGCAAAG	639	0,0088	0,88
CTCCGCAAAA	715	0,0098	0,98
CTCCGCAATG	550	0,0076	0,76
CTCCGCTAAG	574	0,0079	0,79
CTCCGTAAAG	576	0,0079	0,79
CTCCTCAAAG	599	0,0082	0,82
CTCCTTAAAG	127	0,0017	0,17
CTTCGCAAAG	634	0,0087	0,87
ATACGCAAAG	192	0,0026	0,26
ATCAGCAAAG	116	0,0016	0,16
AGCCGCAAAG	104	0,0014	0,14

ATCCGCAAAA	141	0,0019	0,19
TGTCGCAAAAG	138	0,0019	0,19
TTTCGCTAAG	101	0,0014	0,14
TTAAGCAAAAG	133	0,0018	0,18
TTCCGTAAAG	133	0,0018	0,18
TTCCTTAAAG	288	0,0040	0,40
TTTAGCAAAAG	125	0,0017	0,17

Tabulka 30: Amplikon 2 genu TLR1 a jeho haplotypy

Haplotyp	Počet výskytů	Frekvence	Frekvence (%)
GTGACAG	3168	0,0419	4,19
GTGACAT	901	0,0119	1,19
GTGACGG	823	0,0109	1,09
GTGACTG	49598	0,6556	65,56
GTGACTT	867	0,0115	1,15
GTGATTG	4285	0,0566	5,66
GTGTCTG	2770	0,0366	3,66
AAGACTG	634	0,0084	0,84
GAGACTG	1873	0,0248	2,48
ATGACTG	2704	0,0357	3,57
GTAAGTCTG	3989	0,0527	5,27
GTATCTG	238	0,0031	0,31
GTGATGG	271	0,0036	0,36
GTGTCAG	135	0,0018	0,18
GTGTTTG	221	0,0029	0,29
ATAACTG	250	0,0033	0,33
ATGTCTG	222	0,0029	0,29
GAAACTG	162	0,0021	0,21
GAGATTG	157	0,0021	0,21
GAGTCTG	130	0,0017	0,17
ATGACAG	115	0,0015	0,15
ATGATTG	258	0,0034	0,34
GTAACAG	145	0,0019	0,19
GTAATTG	319	0,0042	0,42

Tabulka 31: Amplikon 3 genu TLR1 a jeho haplotypy

5.7 Genotypovací reakce

Genotypovací reakce byly provedeny v jednotlivých blocích metodou SNaPshot, jak je zmíněno v sekci Materiál a metody. Primery použité pro geny TLR1 a TLR4 jsou shrnuty v následující tabulce:

Gen	PCR fragment	Referenční sekvence gDNA	Poloha a typ SNP	Označení extenzního primeru	Extenzní primer - sekvence 5'→3'	Délka primeru	Objem na reakci 10 uL	Součást multi-plexu
TLR1	1.1	FJ147090	798C>T	T798R	CGCCAAACCA ACTGGAGGAT CGT	23	0,06	A1
TLR1	1.2	FJ147090	1762G>A	T762R	CAGCCCAGGG ACCACAATGG TGA	23	0,13	C1
TLR1	1.2	FJ147090	2097T>C	T097R	(T4)CTCTGGACAA AGTTGGGAGA CAAGAC	30	0,20	C2
TLR4	4.1	AC000135.1	245G>C	T245F	CTTCTTCTTC CTCTAACTTC CCCTC	25	0,19	D1
TLR4	4.1	AC000135.1	610C>T	T610R	(T5)GGGCCAGCA CAGGGAAACT GAGCA	30	0,15	D2
TLR4	4.2	AC000135.1	5087A>G	T087F	(T10)GCTAAGGTGC ATGCAGGAAG ACACC	35	0,11	D3
TLR4	4.2	AC000135.1	5134G>A	T134R	(T13)GATTTTGTAG AGATTCAGCT CCATGCA	40	0,16	D4
TLR4	4.3	AC000135.1	7999A>G	T999F	(T21)GGTTTCCTAT TCAGCAGAAA TATT	45	0,19	D5
TLR4	4.3	AC000135.1	8885A>G	T885F	(T25)GCACTTTTAC TGAGTTTCAG CTACC	50	0,20	D6
TLR4	4.4	AC000135.1	9422T>C	T422F	ACTCGCTCCG GATCCTAGAC TGCAG	25	0,12	E1
TLR4	4.5	AC000135.1	9713G>A	T713F	(T5)CTGTGCTCCT GGTGTCTGTG GTAGG	30	0,15	E2
TLR4	4.5	AC000135.1	9787C>T	T787F	(T10)CAAAAGTATG GCAGGGGCGA GAGCA	35	0,18	E3
TLR4	4.5	AC000135.1	9794T>C	T794F	(T15)ATGGCAGGGG CGAGAGCACC TATGA	40	0,21	E4
TLR4	4.5	AC000135.1	10307T>C	T307F	(T20)CCTCCACCTG AGGAGGAGAA TCCCC	45	0,15	E5

TLR4	4.5	AC000135.1	103010T>G	T010F	(T25)CCACCTGAGG AGGAGAATCC CCTGA	50	0,19	E6
------	-----	------------	-----------	-------	-------------------------------------	----	------	----

Tabulka 32: Přehled diagnostických SNP, specifických reakcí extenze primeru a sdružení do multiplexů pro bovinní geny TLR1 a TLR4

Pro gen MyD88 byly navrženy celkem 3 multiplexy:

chr minimum	Změna	Frekvence varianty	SNP pro SnSh	skupina/a mplikon	Přidání polyT	Označení primeru	Multiplex
11647760	G -> C	16.8%	1213	2	CTTTCCTCCCCCACCCTGC	M213R	C1
11648342	C -> G	17.1%	1795	2	T(6)GCCCTAGTAGCCGTGAGCTAGAC	M795R	C2
11649096	A -> G	87.8%	2549	3	T(11)AAGAACCCTGGTGCCTATTCACC	M549R	C3
11649375	T -> C	16.1%	2828	4	T(17)AAGGCCCTGTCCATGCCCTGAAC	M828F	C4
11649808	T -> C	100.0%	3261	5	T(23)CTGGCCGCTGCTGGGACCAGGG	M261F	C5
11650009	T -> G	63.6%	3462	5	T(32)CCAAGAGTCTGGCCTGCGCTCC	M462F	C6
11650070	A -> G	20.5%	3523	5	GGTTCTCTCAGCTCTGCCCTGCAC	M523F	D1
11650107	T -> G	48.0%	3560	5b	T(5)CGACTTCTGGCCTCTCCATCAAGTT	M560F	D2
11650110	T -> G	14.0%	3563	5b	T(11)CACCATGATGACCTAGCCCCAGA A	M563R	D3
11650381	C -> T	13.6%	3834	5b	T(16)CTACCAGCTGTTTCTGGGAGCTGT	M834R	D4
11650448	G -> A	11.2%	3901	5b	T(20)GGATCCTAACTCTGGACAACAT GG	M901F	D5
11650450	C -> A	14.0%	3903	5b	T(25) GATCCTAACTCTGGACAACATGGGA	M903F	D6
11650453	T -> C	11.6%	3906	5b	T(30) CCTAACTCTGGACAACATGGGACCC	M906F	D7
11650474	T -> C	12.4%	3927	5b	CAGAATCTGGTCCCAGTGAAAAAGG	M927R	E1
11650488	G -> A	10.5%	3941	5b	T(5)CAGTGGTCCTTTCCAGAATCTGGT	M941R	E2
11650582	A -> T	19.2%	4035	5b	T(10)AGGAGAGAAAAACAGCTGTGCGA GC	M035R	E3
11650776	GT -> TC	11.6%	4229	5b	T(15)GGCAAAGCACCTTCCCTCGGGG	M229F	E4
11650849	T -> C	38.2%	4302	5b	T(20)CTTAGCTACCAGGTGCCTATCCCC TT	M302F	E5
11650975	G -> A	53.8%	4428	5b	T(25)GTAATTGCCCCCTTCTGTATCCTA	M428F	E6
11650992	C -> G	75.0%	4445	5b	T(30)CTGTATCCTAGGTTTATAATAAAG AGT	M445F	E7

Tabulka 33: Přehled diagnostických SNP, specifických reakcí extenze primeru a sdružení do multiplexů pro bovinní gen MyD88

Výsledky genotypovacích reakcí spolu s výsledky pro jednotlivé býky plemene ČESTR jsou uvedeny pro geny TLR1 v příloze č. 10.7 a gen TLR4 v příloze č. 10.8. Výsledky

genotypovacích reakcí pro gen MyD88 nejsou v době odevzdání diplomové práce k dispozici, i když již proběhlo ověření funkčnosti navržených genotypovacích primerů a optimalizace reakcí. Využití navržených reakcí se předpokládá jako součást projektu ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Uhřetěvsi.

Data o zastoupení genových variant genů TLR1 a TLR4 u jednotlivých zvířat byla následně zpracována a byla posuzena se shodou s Hardy-Weinbergerovou rovnováhou (HWE), stupněm heterozygotnosti a frekvence alel.

5.8 Výpočet populačních charakteristik

Na základě dat získaných genotypováním býků pomocí SNaPshot bylo možné přistoupit k výpočtu populačních charakteristik, jmenovitě Hardy-Weinbergerovy rovnováhy, frekvence alel a stupně heterozygotnosti. Tyto popisné charakteristiky byly vypočteny v programu GenAIEx (Peakall et Smouse, 2012).

Nejprve bylo třeba převést data z alfanumerického formátu do čistě numerického formátu a vytvořit kontingenční tabulku, se kterou program může pracovat.

Následně byly vypočítány údaje ke genům TLR1 a TLR4 pro býky B1 – B96. Zbylá data nebyla k dispozici.

5.8.1 Gen TLR1

V genu TLR1 byly hodnoceny tři genotypované SNP, jmenovitě 798C>T (v programu GenAIEx označený jako lokus1), 1762G>A (lokus2) a 2097T>C (lokus3). Celkový počet býků byl 96. Výpočet Hardy-Weinbergerovy rovnováhy (HWE) ukázal, že jediný lokus 2 se nenachází v HWE, u zbylých dvou alel není statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 5 %.

Pop	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
Pop1	Locus1	1	0,887	0,346	ns
Pop1	Locus2	1	12,224	0,000	***
Pop1	Locus3	1	0,704	0,401	ns

Key: ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, * P<0.001**

Tabulka 34: Výsledky výpočtu HWE programem GenAIEx (Peakall et Smouse, 2012).

Frekvence alel byla vypočtena z populace celkem 96 býků plemene ČESTR:

Locus	Allele/n	Pop1
Locus1	N	55
	1 (nukleotid C)	0,509
	2 (nukleotid T)	0,491
Locus2	N	74
	3 (nukleotid G)	0,486
	4 (nukleotid A)	0,514
Locus3	N	73
	5 (nukleotid T)	0,678
	6(nukleotid C)	0,322

Tabulka 35: Výpočet frekvence alel v populaci býků. Výpočet proveden na vzorku 96 býků plemene ČESTR, výpočet proveden v programu GenAlEx (Peakall et Smouse, 2012).

Pouze u lokusu 3 vidíme mírnou odchylku od uspořádání alel ve směru alely 5 (nukleotidu T).

Gen TLR1 popsáný populačními charakteristikami:

Mean Allelic Patterns Across Populations

Population	Mean values	Standard Error (SE)
	Pop1	Pop1
Na	2,000	0,000
Na Freq. >= 5%	2,000	0,000
Ne	1,924	0,075
I	0,671	0,022
No. Private Alleles	2,000	0,000
No. LComm Alleles (<=25%)	0,000	0,000
No. LComm Alleles (<=50%)	0,000	0,000
He	0,479	0,021
uHe	0,482	0,021

Tabulka 36: Gen TLR1 popsáný populačními charakteristikami. Výpočet proveden programem GenAlEx (Peakall et Smouse, 2012).

Podobnou shodu jsme obdrželi i při porovnání dat pro různé alely:

	Locus1	Locus2	Locus3
N	55	74	73
Na	2	2	2
Ne	1,999	1,999	1,775
I	0,693	0,693	0,628
Ho	0,436	0,703	0,479
He	0,500	0,500	0,437
uHe	0,504	0,503	0,440
F	0,127	-0,406	-0,098

Tabulka 37: Gen TLR1, jeho alely popsané populačními charakteristikami. Výpočet proveden programem GenAIEx (Peakall et Smouse, 2012).

N = sample size

Na = No. of Different Alleles

Ne = No. of Effective Alleles = $1 / (\text{Sum } \pi^2)$

I = Shannon's Information Index = $-1 * \text{Sum } (\pi * \ln(\pi))$

Ho = Observed Heterozygosity = No. of Hets / N

He = Expected Heterozygosity = $1 - \text{Sum } \pi^2$

uHe = Unbiased Expected Heterozygosity = $(2N / (2N-1)) * He$

F = Fixation Index = $(He - Ho) / He = 1 - (Ho / He)$

Where π is the frequency of the *i*th allele for the population & $\text{Sum } \pi^2$ is the sum of the squared population allele frequencies.

Tabulka 38: Vysvětlivky k předchozím tabulkám, program GenAIEx (Peakall et Smouse, 2012).

5.8.2 Gen TLR4

U genu TLR4 se hodnotilo celkem 12 lokusů. Podobně jako v předchozím případě, jednotlivým SNP byla přiřazena čísla dle následujícího klíče:

245G>C (lokus 1), 610C>T (lokus 2), 5087A>G (lokus 3), 5134G>A (lokus 4), 7999A>G (lokus 5), 8885A>G (lokus 6), 9422T>C (lokus 7), 9713G>A (lokus 8), 9787C>T (lokus 9), 9794T>C (lokus 10), 10307T>C (lokus 11) a 103010T>G (lokus 12).

Porovnání tohoto genu, respektive jeho lokusů s HW modelem dopadlo následovně:

Pop	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
Pop1	Locus1	1	22,336	0,000	***
Pop1	Locus2	1	1,796	0,180	ns
Pop1	Locus3	1	0,356	0,551	ns
Pop1	Locus4	1	0,122	0,727	ns
Pop1	Locus5	1	3,913	0,048	*
Pop1	Locus6	1	3,299	0,069	ns
Pop1	Locus7	1	9,374	0,002	**
Pop1	Locus8	1	0,027	0,869	ns
Pop1	Locus9	1	44,265	0,000	***
Pop1	Locus10	1	87,000	0,000	***
Pop1	Locus11	1	0,370	0,543	ns
Pop1	Locus12	1	19,238	0,000	***

Key: ns=not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,

*** $P < 0.001$

Tabulka 39: stanovení HWE pro jednotlivé vybrané lokusy genu TLR4. Výpočet proveden v programu GenAIEx (Peakall et Smouse, 2012).

Frekvence alel v jednotlivých lokusech byla stanovena:

Locus	Allele/n	Pop1	Locus	Allele/n	Pop1
-------	----------	------	-------	----------	------

Locus1	N	93	Locus7	N	87
	1	0,468		13	0,247
	2	0,532		14	0,753
Locus2	N	88	Locus8	N	86
	3	0,875		15	0,983
	4	0,125		16	0,017
Locus3	N	80	Locus9	N	79
	5	0,563		17	0,082
	6	0,438		18	0,918
Locus4	N	74	Locus10	N	87
	7	0,865		19	0,966
	8	0,135		20	0,034
Locus5	N	84	Locus11	N	85
	9	0,482		21	0,918
	10	0,518		22	0,082
Locus6	N	76	Locus12	N	81
	11	0,947		23	0,025
	12	0,053		24	0,975

Tabulka 40: Frekvence alel ve vybraných lokusech 1 - 12, gen TLR4. Výpočet provedem v programu GenAIEx (Peakall et Smouse, 2012).

Celková heterozygotita uvnitř genu byla stanovena následovně:

Mean Allelic Patterns Across Populations

	Mean values	Standard Error (SE) values
Population	Pop1	Pop1
Na	2,000	0,000
Na Freq. >= 5%	1,750	0,131
Ne	1,397	0,111
I	0,377	0,066
No. Private Alleles	2,000	0,000
No. LComm Alleles (<=25%)	0,000	0,000
No. LComm Alleles (<=50%)	0,000	0,000
He	0,239	0,052
uHe	0,240	0,053

Tabulka 41: Průměrné alelické vlastnosti genu TLR4 napříč populací býků plemene ČESTR. Výpočet proveden v programu GenAIEx (Peakall et Smouse, 2012).

Alelické vlastnosti stanovené v jednotlivých lokusech dopadly následovně:

	Locus	Locus	Locus	Locus	Locus	Locus	Locus	Locus	Locus	Locus	Locus	Locus
--	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

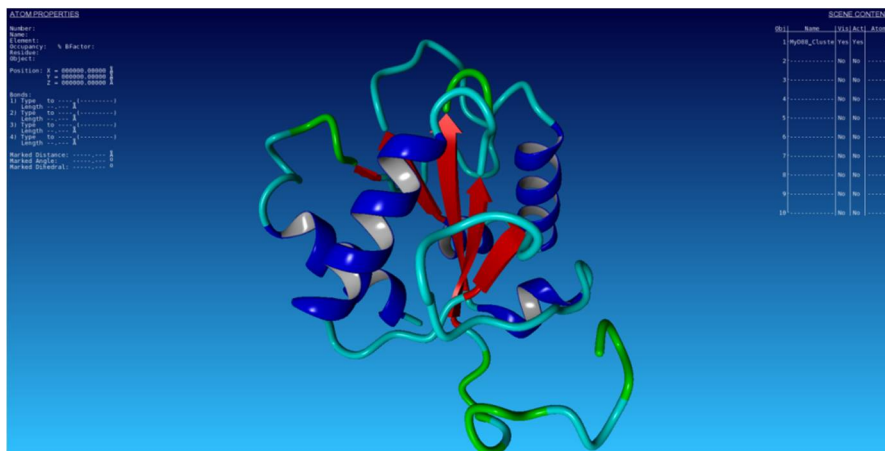
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
N	93	88	80	74	84	76	87	86	79	87	85	81
Na	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ne	1,992	1,280	1,969	1,305	1,997	1,111	1,593	1,035	1,178	1,071	1,178	1,051
I	0,691	0,377	0,685	0,396	0,693	0,206	0,559	0,088	0,284	0,150	0,284	0,116
Ho	0,742	0,250	0,525	0,243	0,607	0,079	0,494	0,035	0,038	0,000	0,141	0,025
He	0,498	0,219	0,492	0,234	0,499	0,100	0,372	0,034	0,151	0,067	0,151	0,048
uH												
e	0,501	0,220	0,495	0,235	0,502	0,100	0,374	0,034	0,152	0,067	0,152	0,048
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,490	0,143	0,067	0,041	0,216	0,208	0,328	0,018	0,749	1,000	0,066	0,487

Tabulka 42: Alelické vlastnosti vybraných lokusů genu TLR4 vztahené k těmto lokusům. Výpočet prováděn v programu GenAIEx (Peakall et Smouse, 2012).

5.9 Struktura proteinů

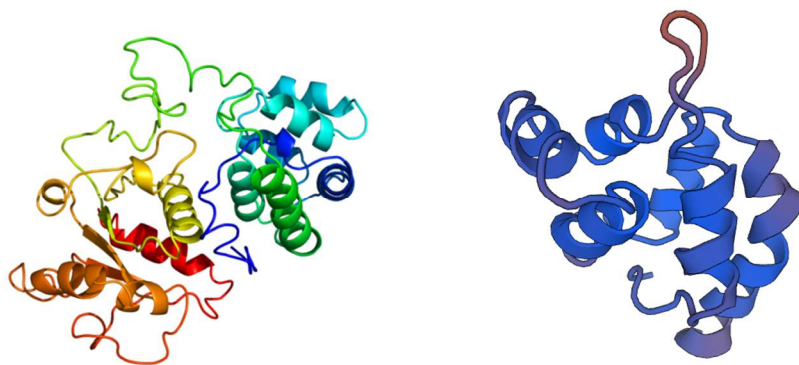
5.9.1 Protein MyD88

3D model proteinu genu MyD88:



Obrázek 17: 3D model proteinu genu MyD88 vytvořený programem Yasara View, Yasara Biosciences (2017)

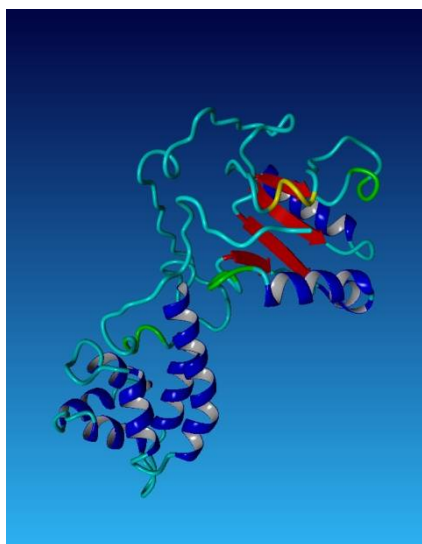
Program Phyre 2 (Kelley et al., 2015) ukazuje poněkud odlišnou strukturu, která se více shoduje se Swiss Model (Biasini et al., 2014) zobrazeným níže. Tento model má pokrytí 82 % s úspěšností vyšší než 90 %. Jako homologní vzor pro tento model sloužil lidský MyD88, který má shodnou sekvenci z 93 %, Death domain komplex genů myd88, irak4, and irak2 se shodnou sekvencí z 95 % a další.



Obrázek 18: 3D struktura proteinu genu MyD88. Modelováno pomocí Phyre 2 (Kelley et al., 2015) v levo a struktura proteinu MyD88 vytvořena pomocí Swiss Model (Biasini et al., 2014) v pravo.

Pomocí on-line modelace proteinů na webu Swiss Model (Biasini et al., 2014) byly nalezeny 2 modely, které se liší v stupni shodnosti. První model vykazuje shodu 92.05 %, druhý pouze 86,73 %.

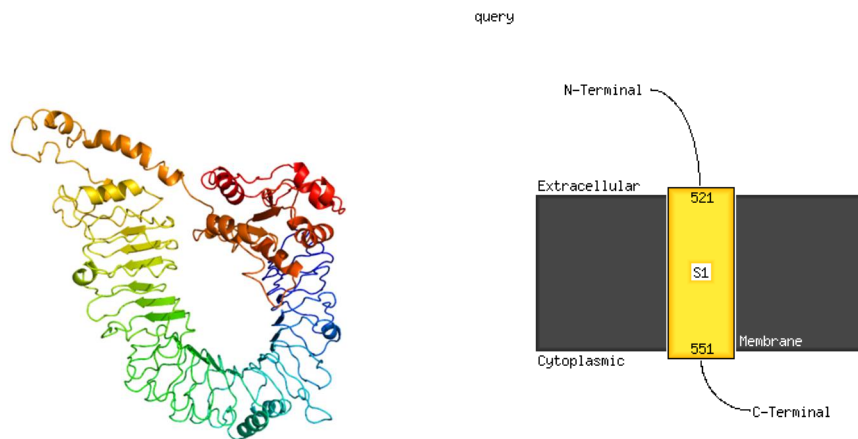
Na základě dat, SNP variant detekovaných programem Geneious 11R byly jednotlivé záměny aminokyselin modelovány v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017). U této molekuly nebyla nalezena žádná varianta, která by ovlivnila výslednou sekundární strukturu proteinu MyD88. Byl nalezen 1 SNP, jmenovitě na pozici 11 649 264 v chromozomální sekvenci DNA, kdy záměna bazí C→A způsobí na pozici aminokyseliny 258 změnu projevující se jako stop kodon, tedy jako tvorba neúplného proteinu MyD88.



Obrázek 19: 3D model proteinu MyD88 zkráceného předčasným STOP kodonem na pozici 258. Vytvořený programem Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

5.9.2 Struktura proteinu TLR1

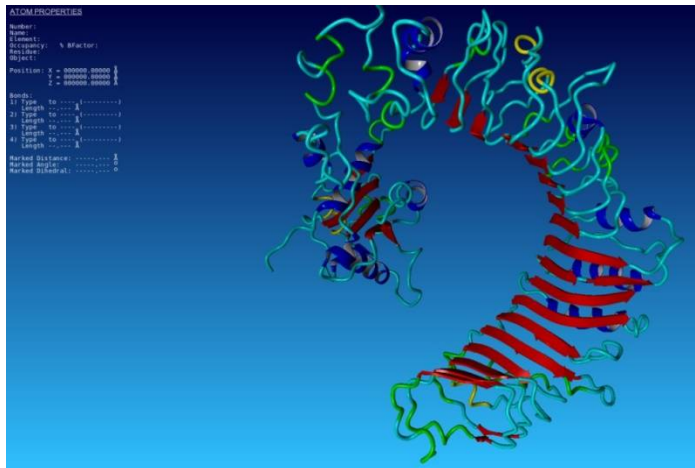
Na základě pořadí aminokyselin bylo možné provést modelování jednotlivých proteinů pomocí systému Phyre 2 (Kelley et al., 2015) a predikci vazebných míst (Wass et al., 2010). Struktura produktu TLR1 modelovaná tímto programem vypadá následovně:



Obrázek 20: Struktura proteinu TLR1. Modelováno za pomoci programu Phyre2 (Kelley et al., 2015) vlevo a Transmembránová charakteristika proteinu TLR1, Phyre2 (Wass et al., 2010) v pravo

Model byl zkonstruován na základě podobnosti s ostatními proteiny běžně se vyskytujícími, jmenovitě s lidským receptorem TLR5, opičím TLR7, TLR3 a dalšími. Celkový model má z 95 % strukturu určenou s přesností více jak 90 %.

Na základě souboru pdb generovaného Phyre 2 bylo možné provést i modelaci proteinu v programu Yasara:



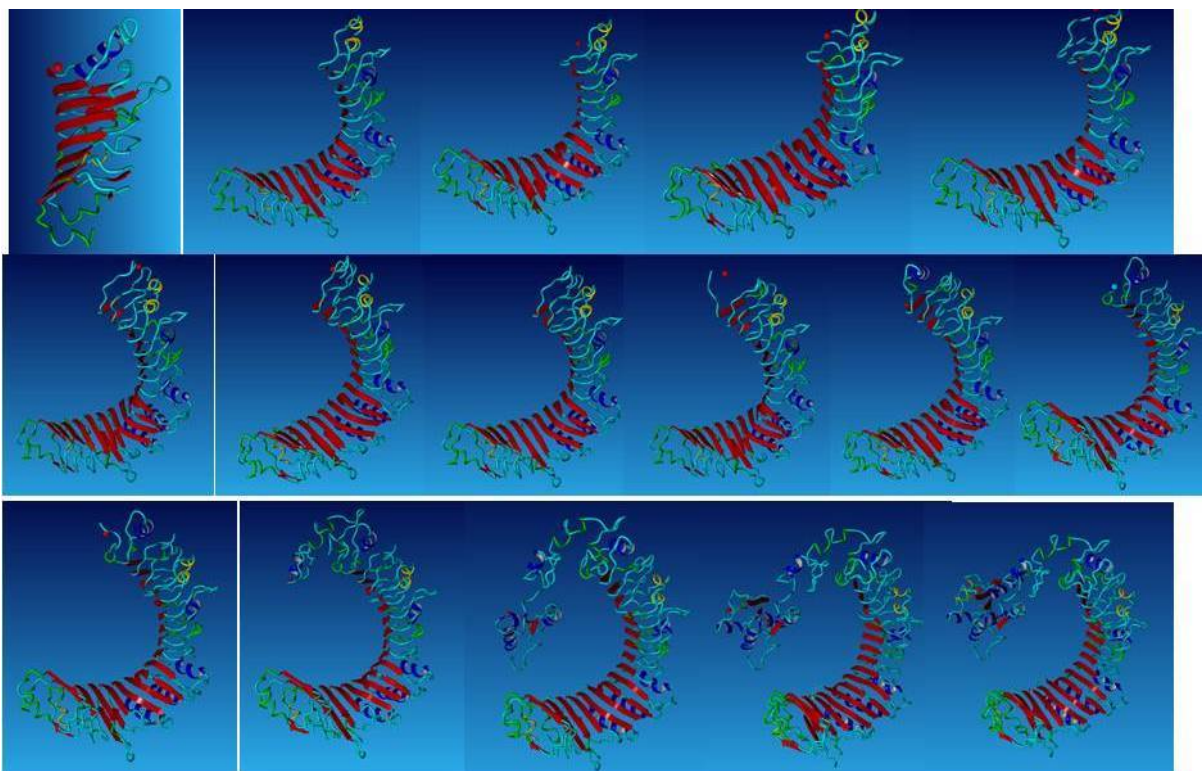
Obrázek 21: 3D struktura proteinu genu TLR1. Vytvořeno v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

Díky SNP změnám se v proteinové struktuře vyskytuje celkem 16 předčasných stop kodonů.

Jsou uvedeny v tabulce níže:

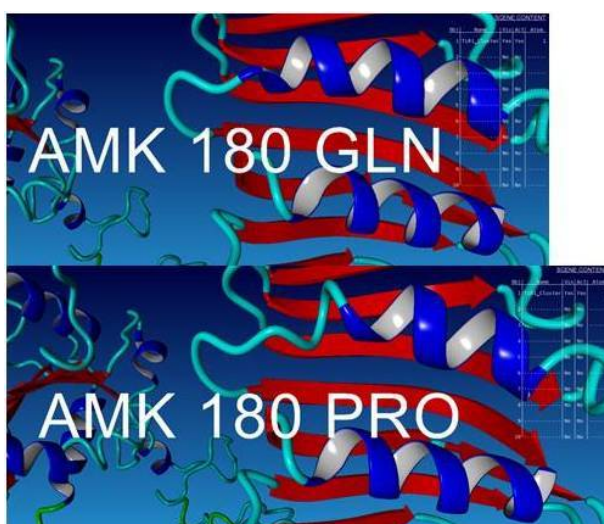
DNA Seq. position	SNP	AMK Position
823	T→A	718
929	G→T	682
1085	G→T	630
1310	C→T	556
1472	G→T	501
1495	T→A	494
1516	C→A	487
1567	C→A	470
1615	T→A	454
1618	G→A	453
1627	G→A	450
1705	C→A	424
1744	C→A	411
1747	G→A	410
1756	C→A	407
2406	A→T	190

Tabulka 43: Seznam SNP a aminokyselinové pozice, kde dochází ke stop kodonům



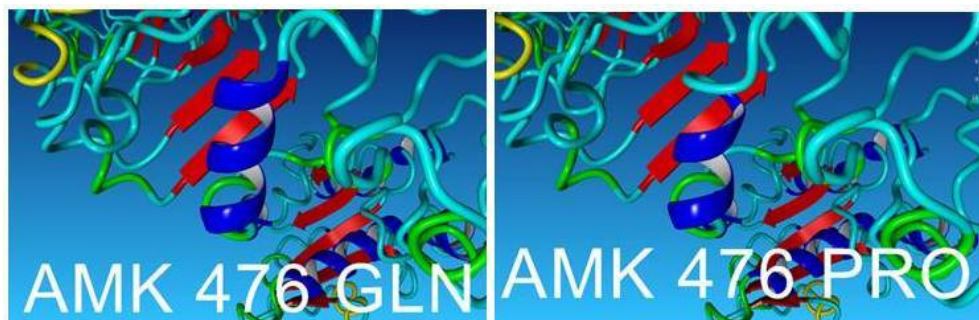
Obrázek 22: TLR1 protein, předčasné ukončení proteinu. Vytvořeno v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

V proteinu se rovněž vyskytují 3 aminokyselinové záměny, které vedou ke změně sekundární struktury proteinu. Jmenovitě jde o záměnu baze T→G v DNA sekvenci 2436, která způsobí záměnu aminokyselin glutaminu za prolin na pozici 180 v aminokyselinovém řetězci. Tato změna se projeví jako zkrácení struktury α -helix ve prospěch řetězce (Coil).

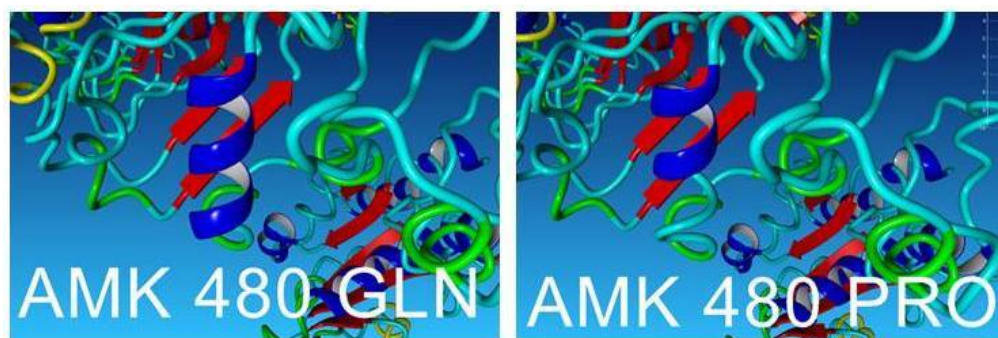


Obrázek 23: Modelace záměny aminokyselin glutaminu za prolin na pozici 180 v proteinu TLR1. Vytvořeno v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

Další dvě záměny se nachází blízko sebe v proteinu, jde o pozici 480 v proteinu, kde záměna glutaminu za prolin vyvolá zkrácení struktury α -helix. Tato změna byla způsobena záměnou bazí T→G na pozici 1536 v DNA sekvenci. Druhá změna ovlivňující stejnou strukturu α -helix je na pozici 476 v proteinu, kdy stejná aminokyselinová záměna (Q→P) byla vyvolaná záměnou bazí T→G v DNA řetězci na pozici 1548.



Obrázek 24: Modelace záměny aminokyselin glutaminu za prolin na pozici v TLR1 proteinu. Vytvořeno v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

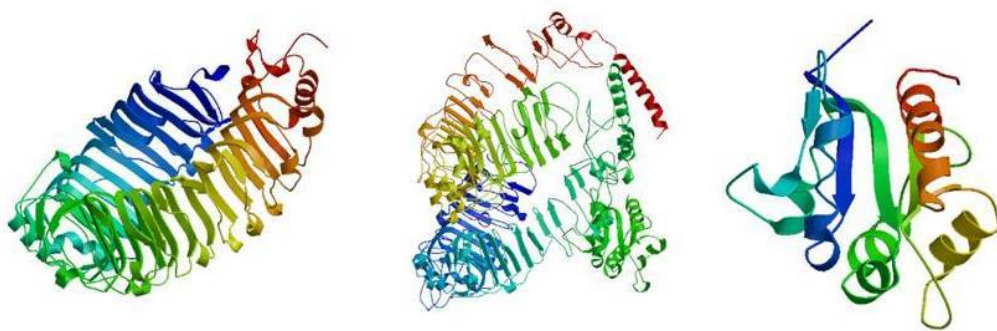


Obrázek 25: Změna sekundární struktury proteinu TLR1 vyvolaná záměnou aminokyseliny glutaminu za prolin na pozici 480. Vytvořeno v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

5.9.3 Struktura proteinu TLR4

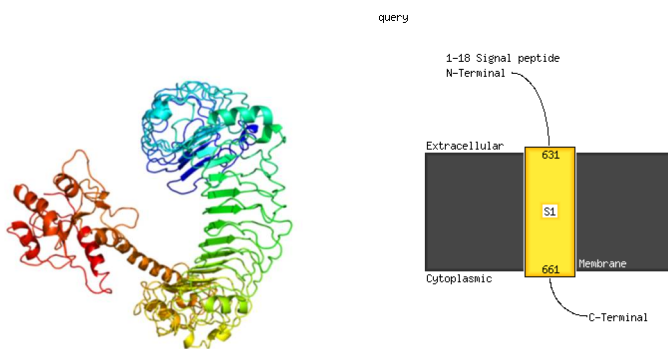
Vlásenkovou strukturu DNA genu TLR4 nelze vytvořit, protože The UNAFold Web Server (Zuker, 2003) umožňuje analyzovat pouze vlásenkovou strukturu do 9000 bazí. Gen TLR4 obsahuje 11015 bazí.

Modelace genu TLR4 z dat obsažených v databázi NCBI se ukázala být nemožná vzhledem k faktu, že obsahuje chybně zadanou aminokyselinu v pořadí aminokyselin. Proto bylo přistoupeno k vyhodnocení na základě dat z databáze Ensembl. Pomocí programu Swiss Model (Biasini et al., 2014) byly v proteinu TLR4 určeny 3 hlavní domény, jejichž obrázky jsou níže. K jejich modelaci bylo použito celkem 13 různých TLR4 modelů, stejně jako modely pro TLR5, TLR3, TLR8, molekulu CD180 a další.

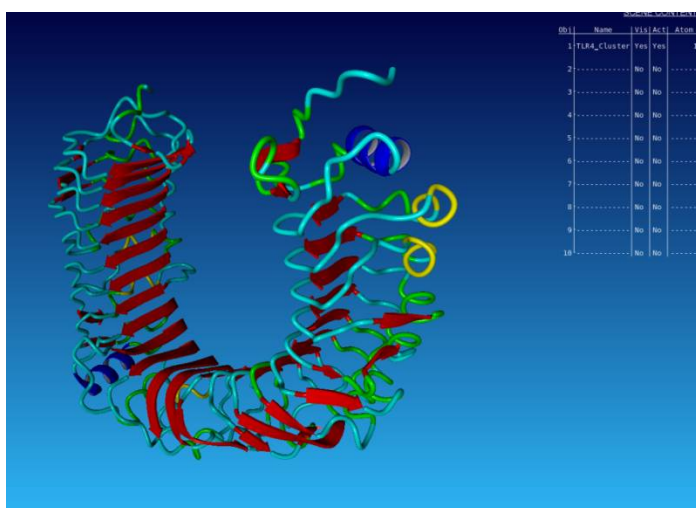


Obrázek 26: Modelace proteinu TLR4 za použití programu Swiss Model (Biasini et al., 2014). Zobrazeny 3 struktury: monomer, homo-dimer a monomer.

Zároveň byla sekvence aminokyselin pro modelování zadána do programů Phyre 2 (Kelley et al., 2015) a Yasara

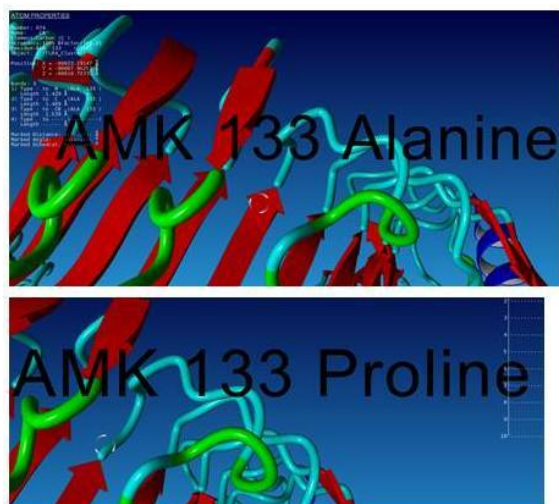


Obrázek 27: 3D struktura proteinu TLR4. Vytvořeno programem Phyre2 (Kelley et al., 2015) vlevo a transmembránová charakteristika proteinu TLR4, Phyre2 (Wass et al., 2010) v pravo



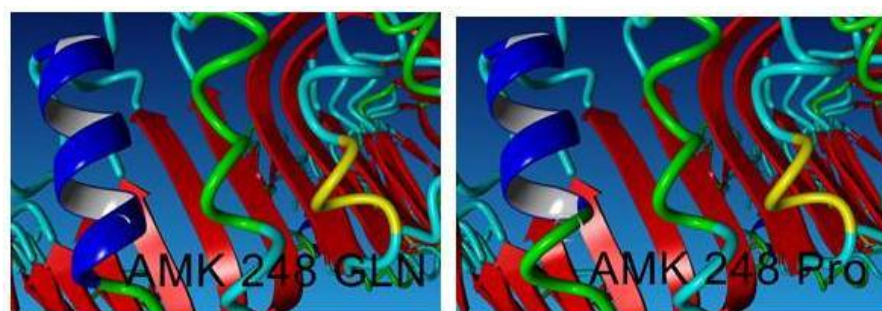
Obrázek 28: 3D struktura proteinu TLR4, modelace v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

V proteinové struktuře TLR4 byly nalezeny tři aminokyselinové záměny přítomné v populaci ČESTR, které ovlivňují sekundární strukturu. V DNA na pozici 108 837 061 SNP záměna G→C způsobí záměnu aminokyselin A→P na pozici 133 a dojde ke zkrácení struktury β -listu a prodloužení části C (coil), jak je znázorněno na obrázku níže:



Obrázek 29: Protein TLR4, záměna aminokyseliny 133 alaninu za prolin a vliv na sekundární strukturu proteinu. Aminokyselina 133. Vytvořeno v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

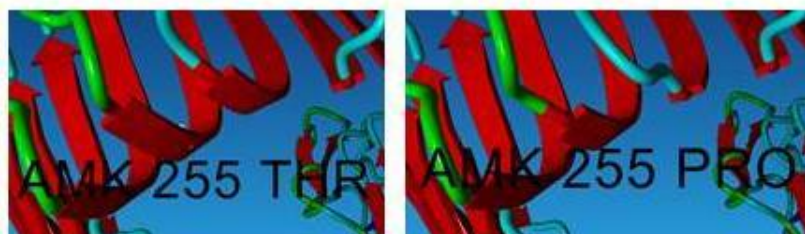
Další taková změna nastala v aminokyselině na pozici 248, kdy záměna aminokyseliny Q→P vedla ke zkrácení α -helix ve prospěch struktury T (turn). Tato změna je způsobena záměnou baze A→C v DNA na pozici 108 837 407.



Obrázek 30: Protein TLR4, záměna aminokyseliny na pozici 248, mění se glutamin na prolin. Vytvořeno v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

Poslední takováto strukturní změna v proteinu TLR4 se objevila na pozici aminokyseliny 255, kdy se threonin mění na prolin a vede ke zkrácení vlastního i sousedního β -listu ve prospěch

struktury C (coil). Tato změna je způsobena SNP záměnou A→C na pozici 108 837 427 v DNA.

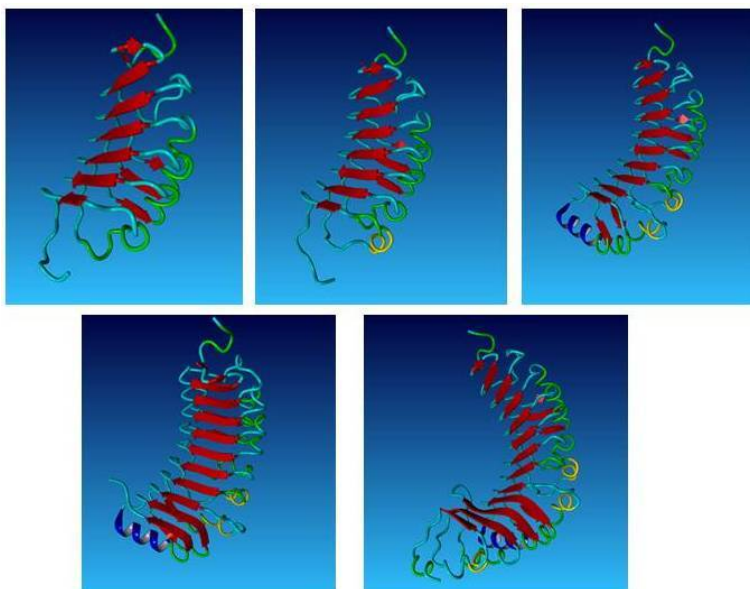


Obrázek 31: TLR4 protein, záměna aminokyselin threoninu za prolin na aminokyselinové pozici 255. Vytvořeno v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

V proteinu TLR4 bylo zaznamenáno celkem 5 míst, kde SNP změnou dojde k stop kodonu a tedy vytvoření neúplného a tedy nefunkčního proteinu TLR4. Dopady na sekundární a terciální strukturu jsou vizualizovány na obr. 69.

DNA pozice	SNP záměna	Pozice aminokyseliny v proteinu
108 837 164	T→A	167
108 837 241	G→T	193
108 837 422	T→A	253
108 837 454	A→T	264
108 837 646	A→T	328

Tabulka 44: Aminokyselinové pozice, kde SNP záměna v DNA podle výsledků NGS vede ke Stop kodonu, protein TLR4.



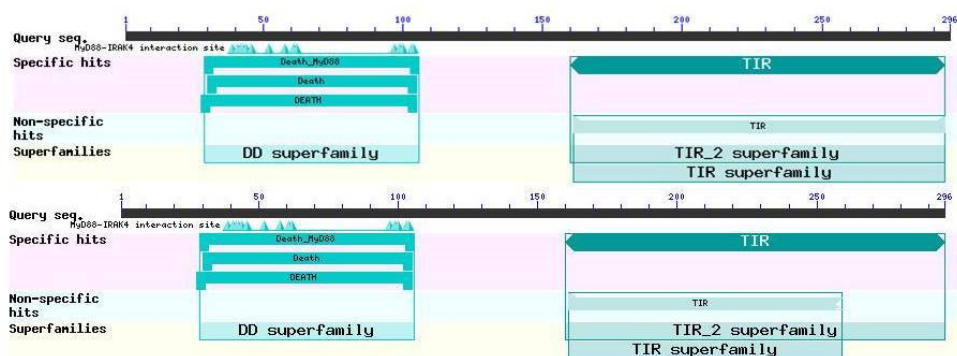
Obrázek 32: TLR4 proteinové molekuly vzniklé předčasnými STOP kodony. Vytvořeno v programu Yasara, (Yasara Biosciences, 2017).

5.10 Strukturní domény

5.10.1 MyD88

Jak databáze NCBI, tak databáze Ensembl zmiňuje strukturní domény proteinu MyD88.

V proteinu MyD88 se vyskytovaly pouze dvě změny, které mění funkční doménu. Jmenovitě záměna aminokyselin tryptofanu za cystein na pozici 284 a záměna alaninu za prolin na pozici 292 v proteinu. Obě tyto změny mají za následek zkrácení TIR domény proteinu. TIR doména je funkční doména, která interaguje s proteiny TLR. Zkrácení této domény může mít velmi velký funkční dopad na přirozenu imnitu a tvorbu jejich produktů.



Obrázek 33: Porovnání proteinových domén. Protein BLAST (Altschul, 1997).

5.10.2 Protein TLR1

Pro modelaci domén byl využit, jako v předchozím případě, program Protein Blast (Altschul, 1997).

V případě tohoto proteinu bylo třeba zredukovat změny aminokyselin, které jsme prověřovali. Dělo se tak zvýšením přesnosti určení jednotlivých SNP. S úspěchem byl použit ukazatel Strand Bias v programu Geneious 11R, nyní s přesností 55 % a vyšší. Celkem bylo prověřeno 119 SNP. Každá byla testována zvlášť a výsledky byly porovnány s referencí.

Níže je uveden seznam těch aminokyselinových změn, které nevedly ke změně proteinových domén:

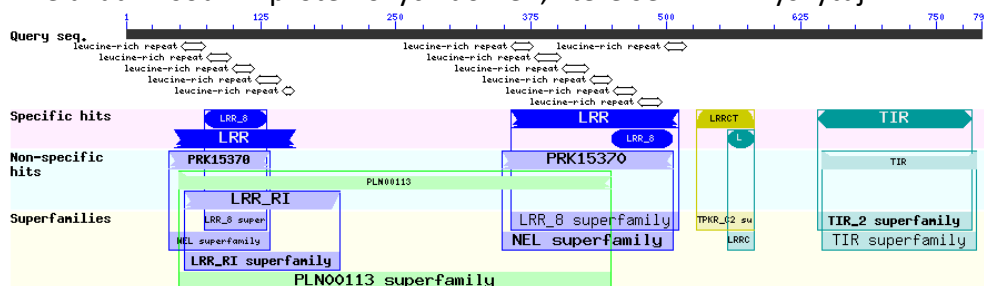
DNA Seq. Nr.	SNP	AMK Change	Codon Nr.
798	A -> T	I -> K	791
853	A -> C	W -> G	773
1041	C -> A	W -> L	710
1060	T -> G	N -> H	704

DNA Seq. Nr.	SNP	AMK Change	Codon Nr.
2436	T -> G	Q -> P	245
2526	C -> G	G -> A	215
2566	T -> G	T -> P	202
2637	G -> T	T -> N	178

1132	C -> A	G -> C	680	2644	C -> T	G -> R	176
1209	C -> A	W -> L	654	2721	A -> C	L -> W	150
1467	C -> T	G -> E	568	2722	A -> C	L -> V	150
1479	T -> C	E -> G	564	2755	A -> C	F -> V	139
1486	A -> T	Y -> N	562	2767	T -> A	I -> L	135
1639	C -> G	A -> P	511	2785	G -> A	P -> S	129
1699	C -> A	G -> C	491	2789	A -> T	F -> L	127
1813	C -> A	V -> F	453	2801	T -> A	L -> F	123
1866	G -> A	S -> F	435	2821	T -> A	T -> S	117
1925	C -> A	M -> I	415	2844	A -> C	L -> W	109
2046	A -> C	L -> W	375	2849	G -> T	N -> K	107
2091	G -> A	S -> F	360	2882	G -> T	N -> K	96
2121	T -> G	Q -> P	350	2887	A -> T	F -> I	95
2248	T -> A	I -> L	308	2888	T -> A	K -> N	94
2352	C -> A	W -> L	273	2891	A -> T	F -> L	93
2402	G -> T	N -> K	256	2971	G -> C	P -> A	67

Tabulka 45: Aminokyselinové změny v proteinu TLR1, které nevedly ke změně proteinových rodin

Níže uvádím souhrn proteinových domén, které se v TLR1 vyskytují:



Obrázek 34: TLR1 protein a proteinové domény. Protein BLAST (Altschul, 1997).

Name	Accession	Description	Interval
TIR	smart00255	Toll-interleukin 1 - resistance	640-783
TIR	pfam01582	TIR domain; The Tol/interleukin-1 receptor (TIR) homology domain	644-787
PRK15370	PRK15370	E3 ubiquitin-protein ligase SlrP; provisional	348-506
LRRCT	smart00082	Leucine rich repeat C-terminal domain	528-581
LRR_8	pfam13855	Leucine rich repeat	73-130
PLN00113	PLN00113	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase; provisional	49-449
LRR	COG4886	Leucine rich repeat (LRR) protein (transcription)	356-512
PRK15370	PRK15370	E3 ubiquitin-protein ligase SlrP; provisional	40-134
LRR	COG4886	Leucine rich repeat (LRR) protein (transcription)	45-157
LRR_8	pfam13855	Leucine rich repeat	449-506
LRR_RI	cd00116	Leucine-rich repeats (LRRs), ribonuclease inhibitor (RI)-like subfamily	54-198
LRRCT	pfam01463	Leucine rich repeat C-terminal domain	557-581

Tabulka 46: TLR1 proteinové domény. Protein BLAST (Altschul, 1997).

Při změnách v doménách nejčastěji docházelo k vymizení některé domény. Méně častěji aminokyselinová záměna vedla ke změně délky stávající domény a občas, ve dvou případech, se objevila doména nová. Souhrn změn je uvedený níže:

DNA Seq. Nr.	SNP	AMK Change	Codon Nr.	Name	Accession	Change Description	Interval
2971	G -> C	P -> A	67	LRR_8	pfam13855	Zkrácení	52-109
				LRR	COG4886	Zkrácení	69-157
2891	A -> T	F -> L	93	LRR_8	pfam13855	Zkrácení	52-109
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
2888	T -> A	K -> N	94	LRR_8	pfam13855	Prodloužení	70-130
				LRR_RI	cd00116	Chybí	(54-198)
2887	A -> T	F -> I	95	PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
2882	G -> T	N -> K	96	PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
2849	G -> T	N -> K	107	PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
				LRR_RI	cd00116	Chybí	(54-198)
2844	A -> C	L -> W	109	LRR_8	pfam13855	Zkrácení	52-108
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
				LRR_RI	cd00116	Chybí	(54-198)
2821	T -> A	T -> S	117	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
2801	T -> A	L -> F	123	LRR_RI	cd00116	Chybí	(54-198)
				LRR_8	pfam13855	Zkrácení	52-109
2789	A -> T	F -> L	127	LRR_8	pfam13855	Zkrácení	52-109
2785	G -> A	P -> S	129	PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
2767	T -> A	I -> L	135	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
2755	A -> C	F -> V	139	LRR_RI	cd00116	Chybí	(54-198)
2722	A -> C	L -> V	150	LRR_RI	cd00116	Chybí	(54-198)
2721	A -> C	L -> W	150	LRR_RI	cd00116	Chybí	(54-198)
2644	C -> T	G -> R	176	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
2637	G -> T	T -> N	178	PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
				LRR_RI	cd00116	Zkrácení	54-169
2566	T -> G	T -> P	202	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
2526	C -> G	G -> A	215	PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
2436	T -> G	Q -> P	245	PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
				LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
2402	G -> T	N -> K	256	PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
2352	C -> A	W -> L	273	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
2248	T -> A	I -> L	308	PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
				LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
2121	T -> G	Q -> P	350	PRK15370	PRK15370	Zkrácení	376-506
				LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
2091	G -> A	S -> F	360	LRR	COG4886	Zkrácení	374-512

2046	A -> C	L -> W	375	LRR	COG4886	Zkrácení	377-512
1925	C -> A	M -> I	415	LRR RI	cd00116	Nová doména	357-478
1866	G -> A	S -> F	435	PLN00113	PLN00113	Zkrácení	49-414
1813	C -> A	V -> F	453	PLN00113	PLN00113	Prodloužení	49-454
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(40-134)
1699	C -> A	G -> C	491	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
1639	C -> G	A -> P	511	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
				PRK15370	PRK15370	Prodloužení	348-530
1486	A -> T	Y -> N	562	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
1479	T -> C	E -> G	564	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
1467	C -> T	G -> E	568	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
1209	C -> A	W -> L	654	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
1132	C -> A	G -> C	680	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
1060	T -> G	N -> H	704	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
1041	C -> A	W -> L	710	LRRCT	pfam01463	Chybí	(557-581)
853	A -> C	W -> G	773	TIR	pfam01582	Posun	640-783
798	A -> T	I -> K	791	TIR	pfam01582	Prodloužení	644-791

Tabulka 47: Změny v proteinových doménách u TLR1.

Nejčastěji chybějícími doménami byl Leucine rich repeat C-terminal domain (LRRCT), často také mizela doména E3 ubiquitin-protein ligase SlrP; provisional (PRK15370).

5.10.3 TLR4 protein

Shodně s TLR1 i u TLR4 proteinu, bylo třeba přistoupit ke snížení počtu hodnocených aminokyselinových záměn. I zde bylo jako zpříšňující kritérium použito Strand Bias s hodnotou 55 % a vyšší. Celkem se hodnotilo 89 aminokyselinových záměn.

U změn níže uvedených nebyla pozorována žádná změna v proteinových doménách:

AMK nr.	AMK Change
100	G -> A
119	W -> C
132	V -> G
186	K -> Q
197	V -> F
238	N -> K
243	M -> I
252	G -> C
253	L -> F
255	T -> P
256	N -> T

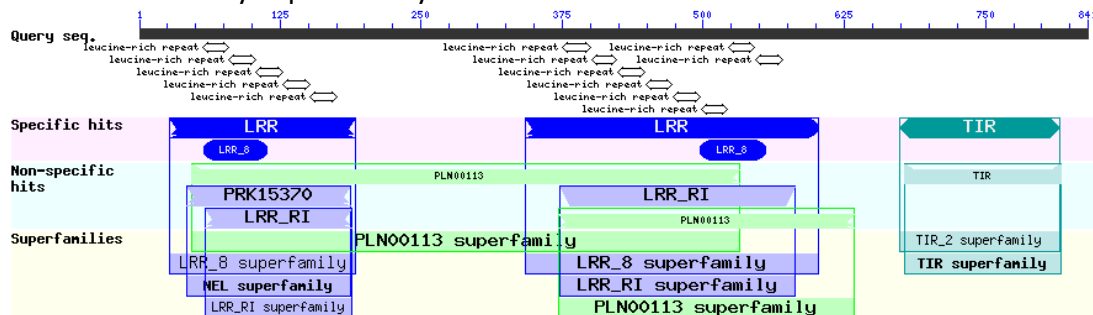
AMK nr.	AMK Change
309	N -> I
312	V -> L
321	G -> E
326	L -> F
327	L -> F
333	Q -> H
388	K -> R
361	N -> K
675	Y -> F
698	E -> G
701	V -> G

AMK nr.	AMK Change
736	V -> F
746	R -> G
748	C -> G
755	A -> G
759	Q -> H
766	G -> A
779	L -> F
798	W -> G
799	E -> K
799	E -> G
802	V -> F

275	S -> F	702	P -> A	804	G -> A
285	I -> F	708	L -> F	811	R -> K
287	Q -> H	715	P -> S		
293	L -> F	720	A -> P		

Tabulka 48: Aminokyselové změny u nichž nebyla pozorována změna v proteinové doméně.

Shrnutí hodnocených proteinových domén:



Obrázek 35: Proteinové domény TLR4. Protein BLAST (Altschul, 1997).

Name	Accession	Description	Interval
TIR	smart00255	Toll- interleukin 1 - resistance	674-816
TIR	pfam01582	TIR domain; The Toll/interleukin-1 receptor (TIR) homology domain	678-817
LRR	COG4886	Leucine-rich repeat (LRR) protein (transcription)	342-602
LRR	COG4886	Leucine-rich repeat (LRR) protein (transcription)	27-192
PLN00113	PLN00113	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase; provisional	47-532
LRR_8	pfam13855	Leucine rich repeat;	57-114
LRR_8	pfam13855	Leucine rich repeat;	496-556
LRR_RI	cd00116	Leucine-rich repeats (LRRs); ribonucleae inhibitor (RI)-like subfamily	373-581
PRK15370	PRK15370	E3 ubiquitin-protein ligase SlrP; Provisional	42-187
PLN00113	PLN00113	leucine-rich repeat receptor-like protein kinase; Provisional	372-634
LRR_RI	cd00116	Leucine-rich repeats (LRRs); ribonucleae inhibitor (RI)-like subfamily	59-189

Tabulka 49: TLR4 proteinové domény. Protein BLAST (Altschul, 1997).

Zaznamenané změny:

DNA Seq. Position	SNP	AMK nr.	AMK Change	Domain Name	Accession	Change Description	Interval
108834016	C -> T	34	P -> L	LRR	COG4886	Zkrácení	33-193
				LRR_8	pfam13855	Posunutí	58-115
				PLN00113	PLN00113	Posunutí	48-533
				PRK15370	PRK15370	Posunutí	43-188
				LRR_RI	cd00116	Posunutí	60-190
108834093	G -> A	60	D -> N	LRR	COG4886	Chybí	
				LRR_8	pfam13855	Chybí	
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
				PLN00113	PLN00113	Zkrácení	488-583
				LRR_RI	cd00116	Chybí	

				LRR_CT	smart00082	Nová doména	579-626
108836970	C -> A	102	N -> K	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108836981	C -> A	106	T -> N	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
108836993	C -> A	110	T -> K	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108836993	C -> G	110	T -> R	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837000	C -> A	112	N -> K	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837010	A -> G	116	S -> G	LRR	COG4886	Chybí	(27-192)
				PLN00113	PLN00113	Chybí	(372-634)
				LRR_8	pfam13855	Chybí	(496-556)
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
				LRR_RI	cd00116	Chybí	(59-189)
				PLN00113	PLN00113	Zkrácení	488-583
				LRR_CT	smart00082	Nová doména	579-626
108837044	G -> A	127	S -> N	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
108837095	T -> C	144	F -> S	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837117	C -> A	151	N -> K	LRR_8	pfam13855	Nová doména	103-187
108837131	A -> T	156	N -> I	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837141	C -> A	159	H -> Q	LRR_8	pfam13855	Nová doména	103-187
108837143	A -> T	160	N -> I	LRR_8	pfam13855	Nová doména	103-187
108837147	T -> A	161	F -> L	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
108837166	C -> A	168	P -> T	LRR_8	pfam13855	Nová doména	103-187
108837179	C -> T	172	S -> F	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
				LRR_8	pfam13855	Nová doména	126-187
				TIR	smart00255	Prodloužení	671-816
108837204	G -> T	180	L -> F	LRR_8	pfam13855	Nová doména	103-187
108837205	G -> A	181	D -> N	LRR_8	pfam13855	Nová doména	103-187
				LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
108837208	C -> T	182	L -> F	LRR_8	pfam13855	Nová doména	103-187
108837212	C -> T	183	S -> F	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837216	C -> A	184	N -> K	LRR_8	pfam13855	Nová doména	103-187
108837278	A -> C	205	N -> T	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
				LRR_8	pfam13855	Nová doména	103-187
108837289	G -> A	209	D -> N	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837300	G -> T	212	L -> F	LRR	COG4886	Prodloužení	27-215
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
				LRR_RI	cd00116	Chybí	(59-189)
				LRR	COG4886	Chybí	(342-602)
				LRR_8	pfam13855	Chybí	(496-556)
				PLN03150	PLN03150	Nová doména	488-583
				LRR_CT	smart00082	Nová doména	579-626
108837303	C -> A	213	N -> K	LRR	COG4886	Chybí	(27-192)

				PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
				LRR_RI	cd00116	Chybí	(59-189)
				LRR_8	pfam13855	Chybí	(496-556)
				PLN03150	PLN03150	Nová doména	488-583
				LRR_CT	smart0082	Nová doména	579-626
108837315	T -> A	217	F -> L	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837333	T -> A	223	F -> L	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
108837375	T -> A	237	F -> L	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
108837398	C -> A	245	T -> N	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
108837407	A -> C	248	Q -> P	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837410	G -> T	249	G -> V	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837439	G -> T	259	V -> F	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837443	T -> G	260	L -> W	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
108837476	G -> A	271	R -> K	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837480	T -> G	272	F -> L	LRR	COG4886	Zkrácení	36-192
108837515	C -> A	284	T -> N	LRR	COG4887	Zkrácení	36-192
108837584	T -> G	307	L -> W	LRR	COG4888	Zkrácení	36-192
108837592	G -> T	310	V -> F	PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108837620	C -> T	319	S -> F	LRR	COG4886	Chybí	(27-192)
				LRR_8	pfam13855	Chybí	(496-556)
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
				PLN00113	PLN00113	Chybí	(372-634)
				LRR_RI	cd00116	Chybí	(59-189)
				PLN03150	PLN03150	Nová doména	488-583
				LRR_CT	smart0082	Nová doména	579-626
108837860	C -> A	399	T -> N	LRR	COG4888	Zkrácení	36-192
				PLN03150	PLN03150	Nová doména	488-583
108837940	C -> A	426	H -> N	LRR	COG4888	Zkrácení	36-192
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108838028	C -> T	455	S -> F	PLN00113	PLN00113	Chybí	(372-634)
				PLN03150	PLN03150	Nová doména	488-583
108838685	C -> T	674	T -> I	TIR	smart00255	Zkrácení	675-816
108838699	G -> T	679	V -> F	TIR	pfam01582	Prodloužení	675-817
108839062	G -> A	800	D -> N	LRR	COG4888	Zkrácení	36-192
				PRK15370	PRK15370	Chybí	(42-187)
108839108	C -> G	815	A -> G	TIR	smart00255	Zkrácení	674-814
				TIR	pfam01582	Zkrácení	678-814

Tabulka 50: Změny v proteinových doménách, protein TLR4.

6. Diskuze

Data získaná v této práci lze použít k dalšímu řešení vědeckého záměru, a sice porovnání fenotypových dat od jednotlivých zvířat (soubor býků a jejich dcer) pro určení funkční závislosti pro jednotlivá onemocnění vyskytující se u skotu.

6.1 Určení SNP změn

Variabilita a frekvence SNP se u genu MyD88 zdá být větší v porovnání s geny TLR1 a 4. Nicméně tento předpoklad je mylný. V genech TLR1 a TLR4 byly primárně zmapovány oblasti kódující. U genu MyD88 se většina SNP vykytuje v oblastech nekódujících (introny a 3' UTR oblast). O SNP změnách v kódujících oblastech nebylo nalezeno dostatek informací. Proto se i tento gen jeví jako hodně konzervovaný. SNP v oblasti intronů jsou zajímavé a někdy mohou mít vliv na kódující sekvenci, např. práce (Camparelli et. al, 2013), ale nebývá to pravidlem.

V této práci obecně byly kritéria pro přijetí výskytu SNP značně liberální. To bylo zapříčiněno malým pokrytím readů v prostřední části DNA genu MyD88. S novým navržením amplifikačních primerů a novým NGS vyhodnocením se snad dosáhne většího pokrytí celého genu a to povede nejen k přijetí či zamítnutí současných SNP, ale napomůže odhalení nových v přední části genu.

Oproti tomu oblasti genu TLR1 byly dobře zmapované. Menší množství readů se nenacházelo v přední části genu, zřejmě amplifikační primery nefungovaly optimálně. Tato část genu tedy není pokrytá s velkou přesností. To vedlo pravděpodobně k tomu, že většina kandidátních SNP v této oblasti byla pomocí zpřesňujících kritérií zamítnuta.

Prokázané SNP záměny bází u genu TLR4 měly obecně největší přesnost. Tyto SNP můžeme také porovnat s prací (Novák et al., 2016), kde byly hodnoceny SNP u jiného plemene Českých genových zdrojů, a sice české červinky. V práci bylo identifikováno celkem 8 SNP ve shodě s databázemi, z nichž 4, jmenovitě g.5087A>G, g.7999G>A, g.9422C>T a g.9787C>T byly identifikovány v této práci. Mohlo tedy být překročeno i ke srovnání populačních charakteristik, které je uvedeno níže v textu.

V celé práci bylo s úspěchem použito jako selekční kritérium s ohledem na přesnost hodnota Strand Bias. Poskytovala lepší výsledky i v případech, kdy SNP nebylo pevně zakotveno na

konsenzus sekvenci a mělo tedy hodnotu p-value 0. Bylo by možné s úspěchem použít toto kritérium pro revizi SNP a výběru SNP, které budou použity pro prokázání či zamítnutí haplotypů v jednotlivých genech.

6.2 Určení haplotypů

Hodnocení genu MyD88 probíhalo jako první. Bohužel, z pohledu zpětné retrospektivy zde vzniklo větší množství chyb, které se podařilo dohledat až zpětně. Proto byly některé SNP hodnoceny zbytečně 2 krát, což vedlo k neúměrně velkým amplikonům. V amplikonu č. 3 se nepodařilo prokázat funkční haplotyp. To je ve shodě s očekáváním, v tomto aplikonu byly mezi jednotlivými ready mezery a jen málo readů spojovalo přední a zadní část tohoto amplikonu, které byly pokryty přesahujícími ready ze sousedních amplikonů. Lze si také všimnout úbytku haplotypů v amplikonu č. 4, kde se obecně vyskytlo malé množství haplotypů ve srovnání se zbytkem genu MyD88.

I přes tyto komplikace se výsledky dají použít do dalšího výzkumného záměru. Nicméně bude nutná jejich revize.

Ačkoli bylo u TLR4 použito celkem 9 vzájemně se překrývajících amplikonů, hodnocená SNP se pohybovala pouze ve 4 amplikonech. U amplikonu 1 se vyskytuje velké množství haplotypů s frekvencí kolem 0,2 %. Lze tedy usuzovat na variabilní oblast genu TLR4. Ikdyž se v amplikonu č. 2 vyskytovaly pouze 3 SNP, musí být brán zřetel na fakt, že haplotypy u TLR4 se navzájem překrývají. Je zde hypotetická šance, že by se mohlo jednat o větší haplotyp spojený s předchozím amplikonem. U třetího amplikonu genu TLR4 se vyskytuje opět malá variabilita. Také bude zřejmě patřit mezi konzervované části genu. U posledního amplikonu, kam částečně zasahuje i 3' UTR region, se objevuje opět větší variabilita.

U genu TLR1 byly celkem 3 amplikony. První amplikon vykazoval běžnou variabilitu. V tabulce jsou zobrazeny i haplotypy, které dosáhly celkové numerické hodnoty 100 a výše. Protože však tento amplikon byl celkově složen z více než 43 000 readů, i takto vysoký počet shod má frekvenci výskytu pod jedno procento. V druhém amplikonu bylo nalezeno celkem 15 SNP. Protože se při vyhodnocení ukázalo, že je tento počet těžce zvládnutelný, bylo přistoupeno k jejich redukci. Bylo vypuštěno SNP T4 →T5 a dále bylo zpřísněno selekční kritérium na strand bias větší než 61 % (u zbylých dvou aplikonů je 60 %). Celkově se tedy

hodnotilo 10 SNP. Variabilita v amplikonu č. 2 je na úrovni, která byla očekávána. Vidíme několik hlavních haplotypů, z nichž dva mají frekvenci 41 a 16 % a zbylé haplotypy jsou v zastoupení kolem 1 % a níže. Tedy variabilita je značná. U haplotypů hodnocených v amplikonu č. 3 máme jeden dominující s frekvencí 65,5 %. Zbylé hlavní haplotypy se pohybují v jednotkách %, max. do hodnoty 5 %.

Úspěšné použití haplotypů a tzv. tagging SNP je dokumentováno například na studii (Russell et al., 2012), která hodnotila vliv SNP na náchylnost ke klinické mastitidě.

6.3 Populační charakteristiky

Výpočet Hardy-Weinbergerovy rovnováhy (HWE) u genu TLR1 ukázal, že jediný lokus 2 se nenachází v HWE, u zbylých dvou alel není statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 5 %.

Z dat vztaženým ke genu jako celku je patrné, že efektivní počet alel je mírně nižší než pozorovaný počet alel. Nicméně tento rozdíl je tak zanedbatelný, že můžeme mluvit o shodě v tomto parametru. Shanonnův informační index (I) vyjadřuje nejistotu, se kterou jsme schopni předpovědět, která alela se vyskytne v daném lokusu. Hodnota 0,671 ukazuje spíše na nižší diverzitu, ale stále velmi velkou, v tomto genu. Heterozygotita a korigovaná (unbiased) heterozygotita ukazuje hodnoty kolem 50 %, což odpovídá maximálnímu rozložení podle HWE.

Stejně populační charakteristiky byly vypočteny s ohledem na jednotlivé lokusy. U lokusu č. 3 vidíme zřetelný posun k nižšímu zastoupení alel v parametru efektivní velikosti alel, N_e . Ten je doprovázený i poklesem Shannonova informačního indexu. Vysvětlení tohoto faktu napomáhá vysoká frekvence heterozygotů v populaci, není tudíž možná jednoduchá predikce alely, zda bude alela homozygotní nebo heterozygotní. Vidíme také znatelný rozdíl mezi očekávanou a pozorovanou variabilitou (H_o , H_e , uH_e), u alely 1 a 3 ve směru vyšší očekávaná než pozorovaná, naopak u alely 2, která jako jediná není v HW rovnováze je vysoké zastoupení heterozygotů v populaci. To může být zapříčiněno jak selekcí, tak i genetickým driftem. Možnost detekce falešných pozitivů v reakcích SNaPshot, která by vedla k navýšení podílu heterozygotů, nebyla podpořena opakovanou vizuální kontrolou porvedených odečtů.

U genu TLR4 se hodnotilo celkem 12 lokusů. Lokusy 1, 9, 10 a 12 se nenacházejí v HWE se statistickou významností 0,001, čili mnohem vyšší, než pro populační data potřebujeme. Lokus 7 se taktéž nenachází v HWE se statistickou pravděpodobností 1 %, opět mnohem přesnější stanovení statistické pravděpodobnosti, než bylo vyžadováno. Stejně tak i lokus 5 se nenachází v HWE se statistickou pravděpodobností 5 %, tedy hodnotou, která byla autorkou požadována. O ostatních alelách můžeme tvrdit, že se nenašel statisticky významný rozdíl mezi modelem HWE a našimi daty.

Je na první pohled patrný posun frekvence alel k jednotlivým preferenčním alelám lokusů 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 a 12. Obzvláště u alel 6, 8, 9, 10, 11 a 12 je tento posun obzvláště patrný. Důvodů může být několik; jedním z nich může být selekce na určitou vlastnost, která se s tímto genotypem pojí, dále nemůžeme vyloučit ani genetický drift. Důvod ale může být i mnohem jednodušší; daná SNP se mohou nalézat v konzervované doméně genu TLR4, kde záměna jedné baze může způsobit poruchu funkce celého proteinového produktu. Je třeba tedy dalšího zkoumání k určení důvodu posunu frekvence alel.

Z populačních charakteristik vztažených k celému genu vidíme následující; již v počtu rozdílných alel, N_a , vidíme pokles heterozygotity, která je ještě víc patrná ve standardním ukazateli efektivním počtu alel, N_e . Shannonův informační index, I , vykazuje hodnotu 0,377, tedy velmi nízkou. To by mělo odrážet skutečnost, že lze velmi těžko předpovědět, která alela se vykytne při náhodném výběru. To je ale v rozporu s ostatními hodnotami. Vidíme velmi nízkou hodnotu ukazatele heterozygotnosti, H_e a korigovaným ukazatelem heterozygotnosti, uH_e , což je ve shodě nejen s lokusy mimo HWE, tak i frekvencí alel.

Stejně populační charakteristiky, nyní vztažené k jednotlivým lokusům, ukázaly, že zatímco u lokusů 1, 3 a 5 vidíme ukazatel efektivních počet alel, N_e , blízko ke skutečné hodnotě, u ostatních lokusů je zřetelný posun mimo rovnoměrné zastoupení obou alel. Nejmarkantněji u lokusu č. 8 a 10, kdy se hodnota N_e prakticky blíží k jedné. Shannonův informační index nabývá hodnot od hodnot 0,742 u lokusu č. 1 ukazující na malou diverzitu k hodnotě 0,150 u lokusu č. 10, což by měla být téměř maximální diverzita. Tyto hodnoty nevysvětluje ani výpočet HWE, ani frekvence alel, kdy je patrné, že lokus č. 10 je téměř zastoupen homozygotní kombinací TT. Překvapivě není příliš velkých rozdílů mezi pozorovanou (H_o) a očekávanou (H_e) heterozygotností. Výjimkou je pouze lokus 5, kde je tento rozdíl velký.

Naše výsledky je možné konfrontovat s výsledky studie (Novák et al., 2016), kde byla hodnocena diverzita u plemene česká červinka. Byly použity tagSNP shodné s použitými v této práci. V práci bylo vyhodnoceno, že všechna tagSNP se nacházejí v HWE. Tato práce naproti tomu zhodnotila lokusy 2, 3 a 11 jako v HW rovnováze, zatímco lokusy 1, 5, 7, 9 a 12 byly mimo HWE. Dále frekvence jednotlivých alel je v obou pracích podobná pro lokusy 1, 2, 3, 5, 9 a 12. Naopak rozdílných výsledků frekvence alel bylo dosaženo v lokusech 7 a 11. Obě plemena jsou součástí českých genových rezerv. V minulosti mohly vycházet z podobného genetického základu, nicméně v současnosti vnímáme obě plemena jako uzavřená a i z popisné charakteristiky jednoho genu se dá usuzovat, že jsou ve svých vlastnostech rozdílná.

6.4 Struktura proteinů

Zatímco u molekuly MyD88 nebyla nalezena žádná varianta, která by ovlivnila výslednou sekundární strukturu proteinu MyD88. Bylo nalezeno 1 SNP, jmenovitě na pozici 11 649 264 v sekvenci DNA, kdy záměna bazí C→A způsobí na pozici aminokyseliny 258 změnu projevující se ve stop kodonu, tedy tvorbě neúplného proteinu MyD88. Tento závěr je ve shodě s očekáváním. Podařilo se nám sice prokázat velké množství SNP, ale jak bylo zmíněno výše, většina se jich nachází mimo kódující oblast a spadají tedy do intronů nebo 3' UTR konce mRNA.

Díky SNP změnám se v proteinové struktuře vyskytuje celkem 16 předčasných stop kodonů v proteinu TLR1. Struktura je tedy velmi náchylná k záměnám aminokyselin, které se poměrně často manifestují předčasným ukončením proteinového produktu. Na druhou stranu, tím, že TLR1 tvoří heterodimer s TLR2 a neinteraguje sám, může právě toto strukturální spojení zvyšovat stabilitu funkce proteinu. Byly nalezeny celkem 3 aminokyselinové záměny vedoucí ke změně sekundární struktury proteinu. Ve všech třech případech se projevilo zkrácení struktury α -helix ve prospěch řetězce. Všechny tři změny se nacházejí v N konci peptidového produktu, a tedy přímo interagují s bakteriálními a virovými antigenními strukturami. Variabilita v této oblasti je tedy žádoucí a napomáhá většímu pokrytí spektra PAMPs, na které má reagovat.

U proteinu TLR4 se podařilo prokázat, že SNP změny mohou mít velký dopad na formování sekundární struktury proteinu. V tomto proteinu byly nalezeny celkem tři. Zde dochází jak ke zkrácení sekundární struktury α -helix, tak i k ovlivnění/zkrácení struktury β -listu. Ten je

v případě aminokyselinové záměny 255 spojen i se změnou sousední sekundární struktury. Opět, všechny tyto změny se vyskytly na N'konci proteinu, tedy v oblasti interagující s bakteriální a virovou složkou. Variabilita v oblasti je tedy vítána. V proteinu se dále vyskytlo 5 stop předčasných kodonů. Vzhledem k velikosti molekuly je toto číslo bráno jako očekávaný průměrný stav.

6.5 Ovlivnění proteinových domén aminokyselinovými záměnami

V proteinu MyD88 se vyskytovaly pouze dvě změny, které mění funkční doménu. Jmenovitě záměna aminokyselin tryptofanu za cystein na pozici 284 a záměna alaninu za prolin na pozici 292 v proteinu. Obě tyto změny mají za následek zkrácení TIR domény proteinu. TIR doména je funkční doména, která interaguje s proteiny TLR. Zkrácení této domény může mít velmi velký funkční dopad na přirozenou imunitu a tvorbu jejích produktů. Protože MyD88 je signální molekula, se kterou interaguje většina TLR molekul (s výjimkou TLR3) a spouští přes ni signální dráhy vedoucí k produkci cytokinů a chemokinů.

Obecně lze doporučit resekvenování přední části genu MyD88, která povede nejen k pokrytí přední části molekuly DNA genu MyD88, ale i ke zpřesnění nebo naopak vyloučení SNP v amplikonu 3 a 4. V době psaní diplomové práce již byly navrženy nové primery k pokrytí této části, jejich funkce nebyla ale ještě optimalizována a nově vzniklé amplikony zaslány na NGS.

Při změnách v doménách TLR1 nejčastěji docházelo k vymizení některé domény. Méně častěji aminokyselinová záměna vedla ke změně délky stávající domény a občas, ve dvou případech, se objevila doména nová. Nejčastěji chybějícími doménami byla Leucine rich repeat C-terminal domain (LRRCT), často také mizela doména E3 ubiquitin-protein ligase SlrP; provisional (PRK15370).

LRRCT se nachází v prostřední části proteinu na cytoplazmatickém C konci. Nicméně stále ještě velmi blízko transmembránové doméně. Rozmanitost, případná nefunkčnost domény v tomto konci, by neměla příliš ovlivnit výslednou funkci celého proteinu. Koncová část v cytoplazmě aktivně interaguje se signálními molekulami, jako je MyD88. Tato interakce se ale děje skrz TIR doménu. Naproti tomu doména PRK15370 je součástí hostitelské obrany proti bakteriálním a virovým ubiquitačním procesům. Poškození nebo zmizení této domény může mít značný dopad na hostitelskou obranu.

Oproti TLR1 proteinu TLR4 je vysoce variabilní co se týče změny domén, jejich posunům či zkrácení. S některými aminokyselinovými změnami přicházejí radikální změny v proteinových doménách. U tohoto proteinu je těžké hledat obecný vzor, který by se dal aplikovat na změny v proteinových doménách. Protože se vyskytovalo více záměn aminokyselin v přední části proteinu, je zde i více popsaných změn. V tomto proteinu je velmi zřetelné provázání jednotlivých aminokyselin. Často se změna neprojeví přímo v daném regionu nebo se projeví v daném regionu a navíc ovlivní i další domény, které jsou od ní vzdálené. Tyto interakce si vysvětlují terciální strukturou proteinu, kdy jednotlivé části interagují mezi sebou. TIR domény se ukazují jako vysoce konzervované, pouze změny aminokyselin přímo v jejich regionu zapříčiní změnu těchto regionů. Obecně se variabilita v přední části genu dá chápat jako prospěšná. Tato část TLR molekuly přímo interaguje s PAMPs bakterií a virů, proto variabilita zde je velmi vítána. Umožní efektivnější reakci na rozličné struktury patogenů.

7. Závěr

Ve vzorcích DNA se podařilo nalézt jednotlivé SNP, jejich přehled je uveden v přílohách 10.1 až 10.3.

Na základě získaných sekvencí a vlastních SNP mohlo být provedeno porovnání s databází EBI (dříve NCBI) a Ensembl. U genu TLR1 nebylo dosaženo velké shody, která pravděpodobně vznikla posunem číslování bazí. Tuto část by bylo vhodné prověřit.

Na základě SNP s vysokou přesností a vztahem k proteinovému produktu bylo možno přikročit k ověření hypotézy formace haplotypů. U genů TLR1 a TLR4 byly prokázány haplotypy, u genu MyD88 se v ampliconu č. 3 haplotypy rozpadají. Vzhledem k překryvu u některých SNP v genu MyD88 by bylo vhodné tuto část revidovat. Nalezení haplotypů v budoucnosti může sloužit jako účinné snížení nákladů na testování vztahu k rezistenci či vyšší náchylnosti k onemocněním. Tím, že je haplotyp prokázán, není třeba testovat všechny lokusy a záměny SNP v něm obsažené, ale stačí vybrat pouze jednu či několik alelických záměn a ty otestovat. Zbylé alely v jejich lokusech se potom určí na základě jejich příslušnosti k haplotypu.

Vytypováním tagSNP u genů TLR1 a TLR4 byla získána data, která sloužila k výpočtu populačních charakteristik. Jmenovitě Hardy-Weinbergerovy rovnováhy, frekvence jednotlivých alel. Heterozygotita a efektivní velikost alel byla spočtena jak s ohledem na celý gen, tak ve vztahu k jednotlivým lokusům. Z populačních dat lze vyčíst, že diagnostické SNP (tagSNP) zkoumané v genu TLR1 se nachází v HWE mimo lokus č. 2 a frekvence alel ukazuje z velké části na preferenci heterozygotnosti. Naproti tomu výsledky tagSNP z genu TLR4 naopak ukazují velký úbytek alel (manifestováno jako snížením efektivního počtu alel, N_e) a výrazný posun z HWE. Tomu odpovídá i velmi preferenční frekvence alel v jednotlivých tagSNP. Pouze tři lokusy, a sice č. 1, 3 a 5 mají frekvenci alel přibližně shodnou, zbylé lokusy jsou výrazně posunuty co do preference jedné alely jdoucí ruku v ruce s úbytkem heterozygotity. Tato data poslouží jako jeden z mnoha střípků pro přiřazení fenotypových dat k již získaným genetickým datům.

Modelace proteinů jednotlivých genů odhalila jak několik funkčních záměn, které mění sekundární strukturu proteinů, tak i předčasné stop kodony, které vedou ke zkrácení proteinu a tedy i ztrátě jeho funkčnosti.

Byla rovněž prověřena záměna proteinů ve vztahu k proteinovým doménám, které každý protein obsahuje. Tyto změny se vyskytují napříč celým proteinem a některé výrazně ovlivňují funkčnost jednotlivých proteinů, protože se nacházejí v transmembránových doménách (geny TLR1, TLR4). U genu MyD88 byly prokázány dvě změny, které se vztahují k proteinové oblasti TIR, která interaguje s TLR receptory. Tyto změny mohou negativně ovlivnit vazbu s receptory TLR a tedy i omezit imunitní reakci organismu. V TLR1 proteinu jsou nejčastější změny v cytoplazmatické LRRTC doméně, která často chybí. Stejně tak velmi často je postrádána ubiquitační složka PRK15370. Dopad ztráty této domény je větší, pomáhá chránit hostitelskou buňku před ubiquitačními procesy ze strany virů a bakterií. V TLR4 proteinu se velmi špatně hledal obecný vzor, který by pomohl popsat získané výsledky. Velmi často se zde uplatňují terciální interakce v proteinu, kdy i zdánivě daleká záměna aminokyseliny ovlivní doménu vzdálenou od této změny. Často záměna jedné aminokyseliny vede k totální přestavbě domén buňky. Tato se většinou netýká TIR domén, které tímto můžeme označit jako konzervované domény.

8. Seznam literatury

Aken, B. L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Fernandez Banet, J., Billis, K., García Girón, C., Hourlier, T., Howe, K., Kähäri, A., Kokocinski, F., Martin, F. J., Murphy, D. N., Nag, R., Ruffier, M., Schuster, M., Tang, Y. A., Vogel, J. -H., White, S., Zadissa, A., Flicek, P., Searle, S. M. J. 2016. The Ensembl gene annotation system. Database [online]. 2016. baw093-. [cit. 2017-11-27]. DOI: 10.1093/database/baw093. ISSN: 1758-0463. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/database/article-lookup/doi/10.1093/database/baw093>>

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell [online]. 124 (4). 783-801. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015. ISSN: 00928674. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406001905>>

Altschul, S. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research [online]. 25 (17). 3389-3402. [cit. 2017-12-01]. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389. ISSN: 13624962. PMC146917. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/25.17.3389>>

Baravalle, C., Silvestrini, P., Cadoche, M. C., Beccaria, C., Andreotti, C. S., Renna, M. S., Pereyra, E. A. L., Ortega, H. H., Calvino, L. F., Dallard, B. E. 2015. Intramammary infusion of Panax ginseng extract in bovine mammary gland at cessation of milking induces changes in the expression of toll-like receptors, MyD88 and NF- κ B during early involution. Research in Veterinary Science [online]. 100. 52-60. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.03.025. ISSN: 00345288. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528815000995>>

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 polymorphisms in toll-like receptor genes and case-control association studies with bovine tuberculosis. Veterinary World [online]. 9 (5). 458-464. [cit. 2017-05-13]. DOI:

10.14202/vetworld.2016.458-464. ISSN: 09728988. Dostupné z:
<<http://www.veterinaryworld.org/Vol.9/May-2016/5.html>>

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research* [online]. 42 (W1). W252-W258. [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1093/nar/gku340. ISSN: 1362-4962. Dostupné z:
<<http://academic.oup.com/nar/article/42/W1/W252/2435313/SWISSMODEL-modelling-protein-tertiary-and>>

Capparelli, R., De Chiara, F., Nocerino, N., Medaglia, C., Di Costanzo, R., Ramunno, L., Capuano, F., Casalnuovo, F., Di Matteo, A., Iannelli, D. 2013. Heterozygosity at the A625C Polymorphic Site of the MyD88 Gene Is Associated with *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Infection and Immunity* [online]. 81 (6). 2139-2144. [cit. 2017-08-04]. DOI: 10.1128/IAI.01398-12. ISSN: 0019-9567. Dostupné z:
<<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01398-12>>

Carvajal, A. M., Huircan, P., Lepori, A. 2013. Single nucleotide polymorphisms in immunity-related genes and their association with mastitis in Chilean dairy cattle. *Genetics and Molecular Research* [online]. 12 (3). 2702-2711. [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.4238/2013.July.30.8. ISSN: 16765680. Dostupné z:
<<http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2013/vol12-3/pdf/gmr2455.pdf>>

Carvalho, A., Pasqualotto, A. C., Pitzurra, L., Romani, L., Denning, D. W., Rodrigues, F. 2008. Polymorphisms in Toll-Like Receptor Genes and Susceptibility to Pulmonary Aspergillosis. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. 197 (4). 618-621. [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1086/526500. ISSN: 0022-1899. Dostupné z:
<<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/526500>>

Conejeros, I., Gibson, A. J., Werling, D., Muñoz-Caro, T., Hermosilla, C., Taubert, A., Burgos, R. A. 2015. Effect of the synthetic Toll-like receptor ligands LPS, Pam3CSK4, HKLM and FSL-1 in the function of bovine polymorphonuclear neutrophils. *Developmental* [online]. 52 (2). 215-225. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1016/j.dci.2015.05.012. ISSN: 0145305x. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145305X15001214>>

Cronin, J. G., Turner, M. L., Goetze, L., Bryant, C. E., Sheldon, I. M. 2012. Toll-Like Receptor 4 and MYD88-Dependent Signaling Mechanisms of the Innate Immune System Are Essential for the Response to Lipopolysaccharide by Epithelial and Stromal Cells of the Bovine Endometrium1. *Biology of Reproduction* [online]. 86 (2). -. [cit. 2017-08-04]. DOI: 10.1095/biolreprod.111.092718. ISSN: 0006-3363. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.111.092718>>

Eck, S. H., Benet-Pagès, A., Flisikowski, K., Meitinger, T., Fries, R., Strom, T. M. 2009. Whole genome sequencing of a single *Bos taurus* animal for single nucleotide polymorphism discovery. *Genome Biology* [online]. 10 (8). R82-. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1186/gb-2009-10-8-r82. ISSN: 1465-6906. Dostupné z: <<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2009-10-8-r82>>

Fisher, C. A., Bhattarai, E. K., Osterstock, J. B., Dowd, S. E., Seabury, P. M., Vikram, M., Whitlock, R. H., Schukken, Y. H., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., Womack, J. E., Seabury, C. M., Chakravorty, D. 2011. Evolution of the Bovine TLR Gene Family and Member Associations with *Mycobacterium avium* Subspecies Paratuberculosis Infection. *PLoS ONE* [online]. 6 (11). e27744-. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0027744. ISSN: 1932-6203. Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0027744>>

Chester, N., Marshak, D. R. 1993. Dimethyl Sulfoxide-Mediated Primer Tm Reduction: A Method for Analyzing the Role of Renaturation Temperature in the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* [online]. 209 (2). 284-290. [cit. 2018-03-31]. DOI: 10.1006/abio.1993.1121. ISSN: 00032697. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269783711218>>

Jann, O. C., King, A., Corrales, N., Anderson, S. I., Jensen, K., Ait-ali, T., Tang, H., Wu, C., Cockett, N. E., Archibald, A. L., Glass, E. J. 2009. Comparative genomics of Toll-like receptor signalling in five species. *BMC Genomics* [online]. 10 (1). 216-. [cit. 2017-08-04]. DOI: 10.1186/1471-2164-10-216. ISSN: 1471-2164. Dostupné z: <<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-216>>

Kang, S. -S., Sim, J. -R., Yun, C. -H., Han, S. H. 2016. Lipoteichoic acids as a major virulence factor causing inflammatory responses via Toll-like receptor 2. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 39 (11). 1519-1529. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1007/s12272-016-0804-y. ISSN: 0253-6269. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1007/s12272-016-0804-y>>

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* [online]. 10 (6). 845-858. [cit. 2017-11-23]. DOI: 10.1038/nprot.2015.053. ISSN: 1754-2189. Dostupné z: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2015.053>>

Lakshmi, R., Jayavardhanan, K. K., Aravindakshan, T. V. 2016. Characterization of promoter sequence of toll-like receptor genes in Vechur cattle. *Veterinary World* [online]. 9 (6). 626-632. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.14202/vetworld.2016.626-632. ISSN: 09728988. Dostupné z: <<http://www.veterinaryworld.org/Vol.9/June-2016/15.html>>

Li, C. -miao, Shi, W. -hai, Chu, M. -xing, An, Y. -fu, Chen, H. -quan, Di, R., Fang, L. 2009. Polymorphisms of TLR1 Gene and Their Relationship with Somatic Cell Score in Holstein Cows. *Scientia Agricultura Sinica* [online]. 42 (6). 2118-2125. [cit. 2017-08-08]. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2009.06.031. Dostupné z: <<http://www.chinaagrisci.com/EN/abstract/abstract9603.shtml>>

Li, X., Liu, H., Shulin, Y., Tang, Z., Ma, Y., Chu, M., Li, K. 2009. Characterization analysis and polymorphism detection of the porcine Myd88 gene. *Genetics and Molecular Biology*

[online]. 32 (2). 295-300. [cit. 2017-08-04]. DOI: 10.1590/S1415-47572009000200015. ISSN: 1415-4757. Dostupné z: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext>

Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L. Y., Bryant, S. H. 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research* [online]. 45 (D1). D200-D203. [cit. 2017-12-01]. DOI: 10.1093/nar/gkw1129. ISSN: 0305-1048. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw1129>>

Matlová, V. 2015. Národní referenční středisko pro genetické zdroje zvířat [online]. Výzkumný ústav živočišné výroby. Uhřetěves. [cit. 2017-07-28]. Dostupné z: <<http://www.genetickezdroje.cz/>>

McGuffin, L. J., Atkins, J. D., Salehe, B. R., Shuid, A. N., Roche, D. B. 2015. IntFOLD: an integrated server for modelling protein structures and functions from amino acid sequences. *Nucleic Acids Research* [online]. 43 (W1). W169-W173. [cit. 2017-12-01]. DOI: 10.1093/nar/gkv236. ISSN: 0305-1048. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv236>>

Mucha, R., Bhide, M. R., Chakurkar, E. B., Novak, M., Mikula, I. 2009. Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online]. 128 (4). 381-388. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.12.007. ISSN: 01652427. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242708007733>>

Nishiya, T., Kajita, E., Horinouchi, T., Nishimoto, A., Miwa, S. 2007. Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88. *FEBS Letters* [online]. 581 (17). 3223-3229. [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.06.008. ISSN: 00145793. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2007.06.008>>

Novák, K. 2014. Functional polymorphisms in Toll-like receptor genes for innate immunity in farm animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online]. 157 (1-2). 1-11. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.10.016. ISSN: 01652427. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242713002936>>

Novák, K., Pikousová, J., Czerneková, V., Mátlová, V. 2016. Diversity of the TLR4 Immunity Receptor in Czech Native Cattle Breeds Revealed Using the Pacific Biosciences Sequencing Platform. *Animal Biotechnology* [online]. 28 (3). 228-236. [cit. 2017-11-20]. DOI: 10.1080/10495398.2017.1279170. ISSN: 1049-5398. Dostupné z: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10495398.2017.1279170>>

Novák, K., Pikousová, J., Czerneková, V., Mátlová, V. 2016. Diversity of the TLR4 Immunity Receptor in Czech Native Cattle Breeds Revealed Using the Pacific Biosciences Sequencing Platform. *Animal Biotechnology* [online]. 28 (3). 228-236. [cit. 2018-03-31]. DOI: 10.1080/10495398.2017.1279170. ISSN: 1049-5398. Dostupné z: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10495398.2017.1279170>>

Opsal, M. A., Våge, D. I., Hayes, B., Berget, I., Lien, S. 2006. Genomic organization and transcript profiling of the bovine toll-like receptor gene cluster TLR6-TLR1-TLR10. *Gene* [online]. 384. 45-50. [cit. 2017-07-28]. DOI: 10.1016/j.gene.2006.06.027. ISSN: 03781119. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111906004434>>

Pasman, Y., Merico, D., Kaushik, A. K. 2017. Preferential expression of IGHV and IGHD encoding antibodies with exceptionally long CDR3H and a rapid global shift in transcriptome characterizes development of bovine neonatal immunity. *Developmental* [online]. 67. 495-507. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1016/j.dci.2016.08.020. ISSN: 0145305x. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145305X16302725>>

Peakall, R., Smouse, P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* [online]. 28 (19). 2537-2539.

[cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460. ISSN: 1367-4803. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bts460>>

Prajapati, B. M., Gupta, J. P., Pandey, D. P., Parmar, G. A., Chaudhari, J. D. 2017. Molecular markers for resistance against infectious diseases of economic importance. *Veterinary World* [online]. 10 (1). 112-120. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.14202/vetworld.2017.112-120. ISSN: 09728988. Dostupné z: <<http://www.veterinaryworld.org/Vol.10/January-2017/17.html>>

Prakash, O., Kumar, A., Sonwane, A., Rathore, R., Singh, R. V., Chauhan, A., Kumar, P., Renjith, R., Yadav, R., Bhaladhare, A., Baqir, M., Sharma, D. 2014. Polymorphism of cytokine and innate immunity genes associated with bovine brucellosis in cattle. *Molecular Biology Reports* [online]. 41 (5). 2815-2825. [cit. 2017-07-28]. DOI: 10.1007/s11033-014-3136-3. ISSN: 0301-4851. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1007/s11033-014-3136-3>>

Ruiz-Larrañaga, O., Manzano, C., Iriondo, M., Garrido, J. M., Molina, E., Vazquez, P., Juste, R. A., Estonba, A. 2011. Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Journal of Dairy Science* [online]. 94 (7). 3635-3641. [cit. 2017-07-28]. DOI: 10.3168/jds.2010-3788. ISSN: 00220302. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030211003614>>

Russell, C. D., Widdison, S., Leigh, J. A., Coffey, T. J. 2012. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine Toll-like receptor 1 gene and association with health traits in cattle. *Veterinary Research* [online]. 43 (1). 17-. [cit. 2017-07-28]. DOI: 10.1186/1297-9716-43-17. ISSN: 1297-9716. Dostupné z: <<http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/17>>

Seabury, C. M., Cargill, E. J., Womack, J. E. 2007. Sequence variability and protein domain architectures for bovine Toll-like receptors 1, 5, and 10. *Genomics* [online]. 90 (4). 502-515. [cit. 2017-07-28]. DOI: 10.1016/j.ygeno.2007.07.001. ISSN: 08887543. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754307001723>>

Sharma, B. S., Leyva, I., Schenkel, F., Karrow, N. A. 2006. Association of Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms with Somatic Cell Score and Lactation Persistency in Holstein Bulls. *Journal of Dairy Science* [online]. 2006 (89). 3626-3635. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72402-X. ISBN: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72402-X. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203020672402X>>

Schaut, R. G., Ridpath, J. F., Sacco, R. E., 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* [online]. 11 (7). e0159491-. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0159491. ISSN: 1932-6203. Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0159491>>

Skládanka, J., Doležal, O., Hegedüsová, Z., Holásek, R., Chládek, G., Kopec, T., Kučera, J., Kvapilík, J., Ofner-Schröck, E., Ondráková, M., Strapák, P. 2014. Chov strakatého skotu [online]. 1. Mendelova univerzita v Brně. Brno. [cit. 2017-07-28]. Dostupné z: <web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/21/21-chov_strakateho_skotu.pdf>

Sun, L., Song, Y., Riaz, H., Yang, H., Hua, G., Guo, A., Yang, L. 2012. Polymorphisms in toll-like receptor 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online]. 147 (3-4). 195-201. [cit. 2017-07-28]. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.04.016. ISSN: 01652427. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242712001171>>

Taberlet, P., Coissac, E., Pansu, J., Pompanon, F. 2011. Conservation genetics of cattle, sheep, and goats. *Comptes Rendus Biologies* [online]. 334 (3). 247-254. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1016/j.crv.2010.12.007. ISSN: 16310691. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1631069110002969>>

Tohno, M., Shimazu, T., Aso, H., Kawai, Y., Saito, T., Kitazawa, H. 2007. Molecular cloning and functional characterization of porcine MyD88 essential for TLR signaling. *Cellular &*

Molecular Immunology [online]. 4 (5). 369-376. [cit. 2017-11-15]. PMID: 17976317. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/infodroje.czu.cz/pubmed/17976317>>

Turner, M. L., Cronin, J. G., Healey, G. D., Sheldon, I. M. 2014. Epithelial and Stromal Cells of Bovine Endometrium Have Roles in Innate Immunity and Initiate Inflammatory Responses to Bacterial Lipopeptides In Vitro via Toll-Like Receptors TLR2, TLR1, and TLR6. Endocrinology [online]. 155 (4). 1453-1465. [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1210/en.2013-1822. ISSN: 0013-7227. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2013-1822>>

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research [online]. 40 (15). e115-e115. [cit. 2018-03-31]. DOI: 10.1093/nar/gks596. ISSN: 1362-4962. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gks596>>

Wang, X., Ma, P., Liu, J., Zhang, Q., Zhang, Y., Ding, X., Jiang, L., Wang, Y., Zhang, Y., Sun, D., Zhang, S., Su, G., Yu, Y. 2015. Genome-wide association study in Chinese Holstein cows reveal two candidate genes for somatic cell score as an indicator for mastitis susceptibility. BMC Genetics [online]. 16 (1). -. [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1186/s12863-015-0263-3. ISSN: 1471-2156. Dostupné z: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/16/111>>

Wang, Y., Liu, S., Li, Y., Wang, Q., Shao, J., Chen, Y., Xin, J. 2016. Mycoplasma bovis-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1 β production through the NF- κ B pathway via toll-like receptor 2 and MyD88. Developmental [online]. 55. 111-118. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1016/j.dci.2015.10.017. ISSN: 0145305x. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145305X15300616>>

Wass, M. N., Kelley, L. A., Sternberg, M. J. E. 2010. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. Nucleic Acids Research [online]. 38 (suppl_2). W469-W473. [cit. 2017-11-23]. DOI: 10.1093/nar/gkq406. ISSN: 1362-4962. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkq406>>

Yang, Z., Fu, Y., Gong, P., Zheng, J., Liu, L., Yu, Y., Li, J., Li, H., Yang, J., Zhang, X. 2015. Bovine TLR2 and TLR4 mediate *Cryptosporidium parvum* recognition in bovine intestinal epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* [online]. 85. 29-34. [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.05.009. ISSN: 08824010. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088240101500090X>>

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology* [online]. 7 (1-2). 203-214. [cit. 2017-11-27]. DOI: 10.1089/10665270050081478. ISSN: 1066-5277. Dostupné z: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/10665270050081478>>

Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* [online]. 31 (13). 3406-3415. [cit. 2017-11-21]. DOI: 10.1093/nar/gkg595. ISSN: 1362-4962. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkg595>>

Primer3 Fragmentize & Loop Version - Overlap. 1998. Primer3 Fragmentize & Loop Version - Overlap [online]. Whitehead Institute for Biomedical Research. Cambridge. [cit. 2017-08-21]. Dostupné z: <<http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/primer/primerloop.cgi>>

GenScript DNA Sequencing Primers Design Tool. 2017. GenScript [online]. GenScript. Piscataway. [cit. 2017-08-21]. Dostupné z: <<http://www.genscript.com/tools/dna-sequencing-primer-design>>

DbSNP Short Genetic Variation: SNP linked to Gene (geneID:281536) Via Contig Annotation. 2017. NCBI: dbSNP [online]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Bethesda. [cit. 2017-08-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=281536>

DbSNP Short Genetic Variation: SNP linked to Gene (geneID:444881) Via Contig Annotation. 2017. NCBI: dbSNP [online]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Bethesda. [cit. 2017-08-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=444881>

Yasara Biosciences [online]. 2017. YASARA Biosciences. Vienna. [cit. 2017-11-21]. Dostupné z: <<http://www.yasara.org/>>

BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer designi. 2009. BatchPrimer3 [online]. BMC Bioinformatics. Davis. [cit. 2017-08-21]. Dostupné z: <http://batchprimer3.bioinformatics.ucdavis.edu/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi?PRIMER_TYPE=1&CLEAR_FORM=clear_seq&LOAD_EXAMPLE=no>

Tm Calculator. 2017. Thermo Fisher Scientific: Tm Calculator [online]. Thermo Fisher Scientific. Waltham. [cit. 2017-08-21]. Dostupné z: <<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>>

DbSNP TLR1 Bos Taurus. 2017. NCBI: dbSNP [online]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Bethesda. [cit. 2017-08-08]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=574090>

Svaz chovatelů českého strakatého skotu, z.s. [online]. ©2008. Praha. [cit. 2017-07-28]. Dostupné z: <<https://www.cestr.cz/>>

OligoAnalyzer 3.1. 2017. Integrated DNA Technologies, Inc. [online]. Integrated DNA Technologies. Coralville. [cit. 2017-08-21]. Dostupné z: <<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>>

9. Seznam použitých zkratek a symbolů

ADR1	Carbon source-responsive zinc-finger transcription factor
AMK	aminokyselina
APC	antigenní receptorové buňky
ATI	acute tuberculosis infection, aktuální tuberkulózní infekce
BTA6	bovine chromosome 6
bTB	bovinní tuberkulóza
BVDV2	bovine viral diarrhoea virus
CARD	Caspase activation and recruitment domain
	CCAAT box, někdy také CAAT box je určitý vzor nukleotidů s konsenzem GGCCAATCT, která se nachází 60 - 100 bazí před iniciačním místem transkripce.
CAT	CAAT box signalizuje vazebné místo pro RNA
CCPA	chronic cavitary pulmonary aspergillosis
CD	cluster of differentiation
	protein kódovaný EST1 genem. Váže DNA skrze Winged-helix-turn-helix motiv
C-esx-1 protein	známý jako Ets doména. Ta rozpoznává DNA sekvenci obsahující GGAA/T hlavní element
CM	clinical mastitide
	synonymum pro CG místo, region DNA, kde cytosine je následovaná guaninem v lineární sekvenci bazí ve směru 5' → 3'. CpG zápis se používá pro rozlišení jednovláknové lineární sekvence od CG párování bazí cytosinu a guaninu u dvouvláknové sekvence.
CpG	
CRE	Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) responsive elements
CXCL8	chemokin
ČESTR	český strakatý skot
DD	Death domain
DED	death effector domain
DTH	delayed-type hypersensitivity
DTT	dithiothreitol
EBI	European Bioinformatic Institute
EBL	embryonic bovine lung

buňky	
	Enhancer box je odpovědní DNA element u některých eukaryot, který hraje roli jako
E-box	místo vázající protein a byl nalezen, jak reguluje expresi neuronů, svalů a dalších tkání
EBV	estimated breeding value
ECD	ectodomain
	GATA transkripční faktory jsou rodina charakteristická svou schopností vázat DNA
GATA	sekvenci GATA
gDNA	genomická DNA
GIPLs	glykoinositolfosfolipidy
GPI	glykosylfosfatidylepirositol = mucin
HCT	hematocrit
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
IFN	Interferon
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
IMI	intramammary infection
IRAK 1	interleukin - 1 - receptor - associated kinaze 1
IRF-1	Interferon Regulatory Factor 1
IRF3	interferon regulatory transcription factor 3
LAMP	Lipid-associated membrane proteins
LP	Lactation Persistency
LPE	lipopolysacharide endotoxin
LRR	leucine-rich-repeat motiv
LTA	Lipoteichoic acid
LTI	latent tuberculosis infection
MAF	minor allele frequency
MAL	MyD88 adaptor like
MAP	mycobacterium avium subspecies paratuberculosis
MAPK3/1	Mitogen-activated Protein Kinase 3/1
MCV	mean corpuscular volume
MD2	Lymphocyte antigen 96 kódovaný LY96 genem

MDM ϕ	monocyty a buněčné makrofágy
MHC	major histopatocompatibility complex
MLN	mesenteric lymph nodes
MyD88	myeloid differentiation factor 88
MyD88 -	
ZFP	kondenzovaný MyD88
MZF1	Myeloid zinc finger 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NOS	nitric oxide synthase
Pam ₃ CSK ₄	syntetický ligand pro komplex TLR2/1
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PCR-	
RFLP	polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism
PG	panax ginseng = ženšen
PLS	lipopolysacharide
PMN	polymorphonuclear neutrofil
poMyD88	porcine MyD88
PPR	pattern recognition receptors
QTL	quantitative traits loci
RBC	red blood cell count
RDW	blood cell distribution width
ROS	reactive oxygene species
SCS	Somatic cell score
	small interfering RNA, případně short interfering RNA či silencing RNA. Označení
siRNA	pro skupinu dvouvláknových RNA o délce 20–25 nukleotidů
SNP	single nucleotide polymorphism
TAK1	TGF- β aktivovanou kinázu 1
	(též Hognessův box na počest D. Hognesse) je sedminukleotidová sekvence DNA,
TATA	box
box	která se nachází na začátku (v promotorové oblasti) mnoha protein-kódujících genů u jaderných organismů. Konsenzuální sekvence TATA boxu zní TATAAAA.

Th1 (Th2)	T- helper 1 (T-helper 2)
TICAM1	TIR domain containing molecule 1
TIR	
doména	Toll-Interleukine 1-resistance doména
TIRAP	TIP associated protein
TLR	toll like receptor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TOLLIP	toll increasing protein
TRAM	TRIF related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β
UTR	untranlated region

10. Samostatné přílohy

10.1 Kompletní přehled nalezených SNP v bovinním TLR1

Polymorphism Type	Original Seq.	Coverage	Change	Variant P-Value (approximate)	Strand-Bias	Variant Frequency
SNP (transition)	363	15259	T -> C	7,9E-300	59.5%	5.8%
SNP (transversion)	408	15722	T -> A	2.0E-316	57.1%	5.9%
SNP (transversion)	423	15754	T -> G	5,1E-302	59.2%	5.8%
SNP (transversion)	436	15779	A -> T	3.7E-322	58.3%	6.0%
SNP (transversion)	499	15829	C -> A	2.2E-309	63.3%	5.8%
SNP (transversion)	502	15818	T -> A	3E-275	65.9%	5.5%
SNP (transversion)	511	15824	C -> A	3,1E-299	58.4%	5.7%
SNP (transition)	528	15832	T -> C	1,2E-291	62.6%	5.7%
SNP (transition)	567	15888	A -> G	9,5E-305	60.5%	5.8%
SNP (transversion)	571	15892	T -> G	1.6E-311	58.1%	5.8%
SNP (transversion)	602	15938	T -> G	7E-283	64.1%	5.6%
SNP (transversion)	607	15993	T -> G	1,5E-274	59.0%	5.5%
SNP (transversion)	620	16124	C -> A	2,9E-291	60.3%	5.6%
SNP (transversion)	952	24074	T -> A	0	67.3%	5.4%
SNP (transition)	960	24074	T -> C	0	58.9%	6.3%
SNP (transversion)	985	24111	T -> G	0	64.7%	6.1%
SNP (transversion)	991	24130	C -> A	0	57.1%	5.1%
SNP (transition)	991	24130	C -> T	0	63.1%	5.9%
SNP (transition)	994	24135	C -> T	0	58.4%	6.8%
SNP (transversion)	1024	24153	C -> A	0	61.3%	5.2%
SNP (transversion)	1047	24175	A -> T	0	57.6%	7.0%
SNP (transition)	1050	24182	C -> T	0	59.6%	6.1%
SNP (transversion)	1054	24184	C -> A	0	59.3%	5.8%
SNP (transversion)	1067	24178	G -> C	0	60.3%	7.8%
SNP (transversion)	1079	24194	C -> A	0	59.8%	5.1%
SNP (transversion)	1080	24191	A -> C	0	57.9%	5.5%
SNP (transversion)	1099	24210	G -> T	0	59.0%	7.1%
SNP (transversion)	1116	24234	G -> T	0	58.9%	8.9%
SNP (transversion)	1121	24240	G -> T	0	60.3%	5.8%
SNP (transition)	1123	24247	C -> T	0	60.7%	5.5%
SNP (transversion)	1126	24250	T -> A	0	57.0%	6.6%
SNP (transversion)	1127	24252	A -> T	0	57.6%	5.9%
SNP (transversion)	1140	24255	A -> T	0	57.5%	6.9%
SNP (transversion)	1189	24234	G -> T	0	64.9%	6.3%

SNP (transversion)	1190	24234	G -> T	0	59.8%	6.2%
SNP (transition)	1192	24233	C -> T	0	62.4%	6.0%
SNP (transversion)	1197	24231	C -> A	0	60.3%	6.7%
SNP (transversion)	1198	24230	A -> T	0	61.3%	5.6%
SNP (transition)	1200	24225	C -> T	0	60.0%	6.7%
SNP (transversion)	1203	24223	A -> C	0	61.5%	6.1%
SNP (transversion)	1225	24233	G -> T	0	58.3%	5.2%
SNP (transversion)	1236	24235	A -> T	0	63.0%	5.2%
SNP (transversion)	1245	24236	T -> A	0	59.9%	5.8%
SNP (transition)	1250	24232	G -> A	0	57.3%	6.1%
Insertion (tandem repeat)	1261	24233	(T)4 -> (T)5	0	63.5%	6.6%
SNP (transversion)	1294	24227	A -> C	0	57.1%	5.3%
SNP (transversion)	1315	24237	G -> T	0	58.3%	5.4%
SNP (transversion)	1328	24266	G -> T	0	59.3%	6.7%
SNP (transversion)	1333	24284	C -> A	0	57.4%	7.0%
SNP (transversion)	1337	24308	G -> T	0	58.6%	5.8%
SNP (transversion)	1342	24455	T -> A	0	59.5%	5.0%
SNP (transition)	1345	27829	G -> A	0	62.8%	5.2%
SNP (transition)	1352	28514	G -> A	0	58.0%	7.3%
SNP (transversion)	1355	28545	A -> T	0	57.8%	5.2%
SNP (transversion)	1373	28609	C -> A	0	58.1%	5.7%
SNP (transversion)	1379	28614	G -> T	0	57.3%	6.3%
SNP (transition)	1387	28617	G -> A	0	62.5%	6.7%
SNP (transversion)	1390	28619	T -> A	0	60.9%	6.0%
SNP (transition)	1392	28620	C -> T	0	57.0%	6.9%
SNP (transition)	1416	28617	G -> A	0	60.6%	7.1%
SNP (transversion)	1422	28612	G -> T	0	58.7%	5.2%
SNP (transition)	1426	28610	T -> C	0	58.4%	5.1%
SNP (transversion)	1432	28614	C -> A	0	58.6%	5.5%
SNP (transversion)	1437	28572	A -> T	0	60.2%	6.5%
SNP (transition)	1458	28575	C -> T	0	58.8%	7.1%
SNP (transition)	1460	28582	T -> C	0	57.3%	5.3%
SNP (transversion)	1464	28626	A -> T	0	57.5%	6.1%
SNP (transversion)	1466	28630	A -> T	0	59.9%	6.4%
SNP (transition)	1485	28596	T -> C	0	59.9%	5.3%
SNP (transversion)	1491	28548	G -> T	0	58.3%	6.8%
SNP (transversion)	1495	28516	A -> T	0	57.4%	5.3%
SNP (transversion)	1496	28504	C -> A	0	58.6%	5.7%
SNP (transition)	1499	28470	C -> T	0	57.2%	5.4%
SNP (transition)	1513	26294	T -> C	0	58.0%	6.4%
SNP (transition)	1514	25215	C -> T	0	60.2%	13.9%

SNP (transversion)	1516	11230	T -> A	0	62.1%	12.7%
SNP (transversion)	1525	7798	C -> A	6.6E-313	59.6%	8.5%
SNP (transversion)	1545	7603	T -> A	1.6E-318	59.8%	7.9%
SNP (transversion)	1623	7475	G -> T	0	57.6%	10.1%
SNP (transversion)	1625	7473	G -> T	3,1E-302	62.3%	7.7%
SNP (transition)	1630	7467	C -> T	3,9E-291	58.0%	8.3%
SNP (transition)	1932	6758	C -> T	0	58.9%	9.8%

10.2 Kompletní přehled nalezených SNP v bovinním TLR 4 genu

Polymorphism Type	Original seq.	Change	Variant P-Value approx.	Strand-Bias	Ref. Freq.	Variant Freq.	protein id	AMK Change	CDS Codon Nr.	CDS Int.	CDS Pos.	Pos. Within Codon	Protein Effect
SNP (transversion)	108829553	A -> C	0.0	57.9%	75.0%	18.9%							
SNP (transversion)	108834281	A -> T	0.0	61.1%	13.2%	30.5%							
SNP (transition)	108836841	A -> G	0.0	62.6%	86.5%	10.3%							
SNP (transition)	108836848	G -> A	2.4E-289	51.0%	86.6%	5.6%							
SNP (transversion)	108836859	T -> G	1.1E-276	52.0%	82.3%	6.1%							
SNP (transversion)	108836862	T -> A	7.9E-283	52.0%	87.3%	6.1%							
SNP (transversion)	108836868	A -> T	5.0E-271	52.8%	85.5%	6.0%							
SNP (transversion)	108836873	G -> T	5.2E-287	58.5%	77.9%	6.2%							
SNP (transversion)	108836881	A -> T	1.4E-275	52.2%	87.7%	6.0%							
SNP (transversion)	108836900	T -> A	6.7E-270	59.1%	86.9%	6.0%							
SNP (transversion)	108836901	A -> T	2.8E-283	51.1%	87.5%	6.1%							
SNP (transition)	108836904	C -> T	3.3E-306	56.6%	83.4%	6.4%							
SNP (transition)	108836918	C -> T	1.9E-316	54.4%	75.3%	6.5%							

SNP (transition)	108836919	T -> C	0.0	58.4%	89.7%	7.3%							
SNP (transversion)	108836952	C -> A	8.3E-273	50.3%	83.7%	6.0%	NP_776623.5	D -> E	96	3	288	3	Substitution
SNP (transversion)	108836963	G -> C	0.0	58.3%	69.0%	10.7%	NP_776623.5	G -> A	100	3	299	2	Substitution
SNP (transversion)	108836970	C -> A	0.0	57.8%	83.5%	9.1%	NP_776623.5	N -> K	102	3	306	3	Substitution
SNP (transversion)	108836981	C -> A	0.0	58.0%	87.2%	8.4%	NP_776623.5	T -> N	106	3	317	2	Substitution
SNP (transition)	108836982	C -> T	2.0E-282	51.0%	79.2%	5.9%	NP_776623.5		106	3	318	3	None
SNP (transition)	108836983	T -> C	5.1E-311	51.9%	87.9%	6.4%	NP_776623.5		107	3	319	1	None
SNP (transversion)	108837021	G -> T	1.0E-305	63.5%	89.2%	6.2%	NP_776623.5	W -> C	119	3	357	3	Substitution
SNP (transition)	108837027	C -> T	5.0E-298	56.6%	78.0%	5.2%	NP_776623.5		121	3	363	3	None
SNP (transversion)	108837036	G -> C	0.0	58.6%	67.5%	7.7%	NP_776623.5		124	3	372	3	None
SNP (transition)	108837037	C -> T	3.1E-297	58.5%	83.8%	6.3%	NP_776623.5		125	3	373	1	None
SNP (transversion)	108837059	T -> G	3.6E-273	55.0%	85.3%	5.9%	NP_776623.5	V -> G	132	3	395	2	Substitution
SNP (transversion)	108837059	T -> G	3.6E-273	55.0%	85.3%	5.9%	NP_776623.5	V -> G	132	3	395	2	Substitution
SNP (transversion)	108837061	G -> C	2.2E-303	52.8%	76.7%	5.3%	NP_776623.5	A -> P	133	3	397	1	Substitution
SNP (transversion)	108837071	C -> A	9.8E-297	50.8%	85.5%	5.2%	NP_776623.5	T -> K	136	3	407	2	Substitution
SNP (transition)	108837093	C -> T	1.8E-274	61.4%	81.1%	6.0%	NP_776623.5		143	3	429	3	None
SNP (transition)	108837095	T -> C	3.5E-323	55.0%	84.7%	6.4%	NP_776623.5	F -> S	144	3	431	2	Substitution
Deletion	108837099	(C)4 ->	0.0	58.1%		14.0%	NP_776623.5		145	3	435	3	Frame Shift

(tandem repeat)		(C)3											
SNP (transition)	108837124	G -> A	4.6E-295	50.9%	87.4%	6.3%	NP_776623.5	E -> K	154	3	460	1	Substitution
SNP (transversion)	108837141	C -> A	2.9E-295	59.7%	89.8%	6.3%	NP_776623.5	H -> Q	159	3	477	3	Substitution
SNP (transition)	108837155	C -> T	2.2E-277	54.2%	87.7%	5.9%	NP_776623.5	S -> F	164	3	491	2	Substitution
SNP (transition)	108837156	C -> T	4.4E-305	52.1%	76.6%	6.2%	NP_776623.5		164	3	492	3	None
SNP (transversion)	108837164	T -> A	3.9E-291	53.7%	85.6%	6.0%	NP_776623.5		167	3	500	2	Truncation
Deletion (tandem repeat)	108837178	(T)5 -> (T)4	2.1E-291	51.9%		22.9%	NP_776623.5		172	3	514	1	Frame Shift
SNP (transition)	108837179	C -> T	0.0	58.0%	85.4%	6.7%	NP_776623.5	S -> F	172	3	515	2	Substitution
SNP (transversion)	108837189	C -> A	0.0	60.1%	70.6%	11.2%	NP_776623.5		175	3	525	3	None
SNP (transversion)	108837204	G -> T	1.0E-295	57.1%	87.2%	5.6%	NP_776623.5	L -> F	180	3	540	3	Substitution
SNP (transition)	108837212	C -> T	0.0	58.1%	84.8%	6.6%	NP_776623.5	S -> F	183	3	548	2	Substitution
SNP (transversion)	108837239	A -> T	2.7E-308	50.7%	89.4%	5.9%	NP_776623.5	Y -> F	192	3	575	2	Substitution
SNP (transversion)	108837253	G -> T	1.6E-316	55.3%	81.3%	6.6%	NP_776623.5	V -> F	197	3	589	1	Substitution
SNP (transversion)	108837278	A -> C	8.3E-272	59.1%	81.3%	6.1%	NP_776623.5	N -> T	205	3	614	2	Substitution
SNP (transversion)	108837303	C -> A	0.0	59.3%	85.2%	7.3%	NP_776623.5	N -> K	213	3	639	3	Substitution
SNP (transversion)	108837315	T -> A	4.2E-320	55.8%	82.3%	6.7%	NP_776623.5	F -> L	217	3	651	3	Substitution
SNP	108837316	A -> T	1.1E-302	50.2%	88.0%	5.8%	NP_776623.5	I -> F	218	3	652	1	Substitution

(transversion)													
SNP (transversion)	108837371	A -> T	1.3E-309	53.3%	83.7%	5.3%	NP_776623.5	N -> I	236	3	707	2	Substitution
Insertion (tandem repeat)	108837372	(T)4 -> (T)5	1.5E-320	55.3%		5.9%	NP_776623.5		236	3	708	3	Frame Shift
SNP (transversion)	108837375	T -> A	0.0	60.9%	75.4%	9.4%	NP_776623.5	F -> L	237	3	711	3	Substitution
SNP (transversion)	108837385	C -> A	3.9E-282	51.2%	84.0%	6.2%	NP_776623.5	H -> N	241	3	721	1	Substitution
SNP (transition)	108837409	G -> A	4.0E-281	51.9%	85.6%	6.1%	NP_776623.5	G -> S	249	3	745	1	Substitution
SNP (transversion)	108837410	G -> T	0.0	62.0%	76.4%	6.6%	NP_776623.5	G -> V	249	3	746	2	Substitution
SNP (transition)	108837412	C -> T	6.4E-317	58.2%	84.0%	6.6%	NP_776623.5		250	3	748	1	None
SNP (transversion)	108837418	G -> T	5.7E-308	55.7%	88.7%	6.4%	NP_776623.5	G -> C	252	3	754	1	Substitution
SNP (transversion)	108837422	T -> A	0.0	57.3%	78.6%	7.4%	NP_776623.5		253	3	758	2	Truncation
SNP (transversion)	108837423	A -> T	9.8E-294	59.0%	85.5%	6.1%	NP_776623.5	L -> F	253	3	759	3	Substitution
SNP (transversion)	108837443	T -> G	0.0	57.5%	73.0%	7.1%	NP_776623.5	L -> W	260	3	779	2	Substitution
SNP (transition)	108837465	G -> A	3.0E-293	54.6%	80.7%	6.3%	NP_776623.5		267	3	801	3	None
SNP (transition)	108837476	G -> A	0.0	57.6%	83.6%	8.6%	NP_776623.5	R -> K	271	3	812	2	Substitution
SNP (transition)	108837488	C -> T	0.0	62.7%	83.2%	7.8%	NP_776623.5	S -> F	275	3	824	2	Substitution
SNP (transition)	108837492	C -> T	0.0	57.0%	86.1%	6.8%	NP_776623.5		276	3	828	3	None
Deletion (tandem)	108837500	(G)3 -> (G)2	1.7E-313	62.0%		25.0%	NP_776623.5		279	3	836	2	Frame Shift

repeat)													
SNP (transversion)	108837515	C -> A	8.9E-274	60.9%	88.8%	5.3%	NP_776623.5	T -> N	284	3	851	2	Substitution
SNP (transversion)	108837546	C -> A	1.4E-280	52.6%	87.6%	6.2%	NP_776623.5	D -> E	294	3	882	3	Substitution
Deletion (tandem repeat)	108837559	(G)4 -> (G)3	0.0	59.1%		30.7%	NP_776623.5		299	3	895	1	Frame Shift
SNP (transversion)	108837584	T -> G	5.8E-299	57.2%	78.1%	6.2%	NP_776623.5	L -> W	307	3	920	2	Substitution
SNP (transversion)	108837585	G -> T	6.0E-272	52.3%	86.0%	5.9%	NP_776623.5	L -> F	307	3	921	3	Substitution
SNP (transversion)	108837590	A -> T	1.9E-316	57.2%	81.6%	5.9%	NP_776623.5	N -> I	309	3	926	2	Substitution
SNP (transversion)	108837592	G -> T	0.0	57.4%	82.4%	8.7%	NP_776623.5	V -> F	310	3	928	1	Substitution
SNP (transversion)	108837598	G -> T	1.6E-271	64.0%	86.9%	6.1%	NP_776623.5	V -> L	312	3	934	1	Substitution
SNP (transition)	108837620	C -> T	1.6E-281	57.9%	76.9%	6.2%	NP_776623.5	S -> F	319	3	956	2	Substitution
SNP (transition)	108837625	G -> A	7.5E-318	50.1%	87.3%	6.4%	NP_776623.5	G -> R	321	3	961	1	Substitution
SNP (transition)	108837640	C -> T	0.0	59.5%	72.9%	9.2%	NP_776623.5	L -> F	326	3	976	1	Substitution
SNP (transversion)	108837821	G -> T	1.5E-300	50.9%	20.8%	17.4%	NP_776623.5	S -> I	386	3	1157	2	Substitution
SNP (transversion)	108838612	G -> T	8.2E-292	53.0%	68.0%	6.5%	NP_776623.5	V -> F	650	3	1948	1	Substitution
SNP (transition)	108838629	C -> T	1.3E-313	51.4%	84.0%	7.1%	NP_776623.5		655	3	1965	3	None
SNP (transition)	108838635	C -> T	4.4E-285	51.9%	86.4%	6.7%	NP_776623.5		657	3	1971	3	None
SNP (transition)	108838685	C -> T	0.0	61.2%	81.0%	7.4%	NP_776623.5	T -> I	674	3	2021	2	Substitution

SNP (transversion)	108838744	G -> T	8.8E-292	51.0%	81.9%	6.6%	NP_776623.5	V -> L	694	3	2080	1	Substitution
SNP (transition)	108838749	G -> A	9.2E-315	59.9%	83.9%	6.5%	NP_776623.5		695	3	2085	3	None
Deletion (tandem repeat)	108838772	(CC)3 -> (CC)2	4.0E-290	54.5% -> 57.3%		23.7%	NP_776623.5		703	3	2108	2	Frame Shift
Deletion (tandem repeat)	108838798	(G)3 -> (G)2	1.6E-297	60.6%		23.9%	NP_776623.5		712	3	2134	1	Frame Shift
SNP (transition)	108838807	C -> T	2.1E-308	56.5%	86.3%	7.1%	NP_776623.5	P -> S	715	3	2143	1	Substitution
SNP (transversion)	108838825	G -> C	3.3E-274	53.1%	83.7%	6.3%	NP_776623.5	A -> P	721	3	2161	1	Substitution
SNP (transversion)	108838825	G -> C	3.3E-274	53.1%	83.7%	6.3%	NP_776623.5	A -> P	721	3	2161	1	Substitution
SNP (transversion)	108838867	A -> T	2.4E-311	51.5%	84.7%	7.3%	NP_776623.5	I -> F	735	3	2203	1	Substitution
SNP (transversion)	108838882	C -> A	4.9E-276	51.0%	71.1%	6.8%	NP_776623.5	Q -> K	740	3	2218	1	Substitution
SNP (transition)	108838911	C -> T	2.1E-307	58.0%	82.1%	7.3%	NP_776623.5		749	3	2247	3	None
SNP (transversion)	108838926	T -> G	4.2E-290	51.0%	85.0%	6.4%	NP_776623.5	I -> M	754	3	2262	3	Substitution
SNP (transition)	108838945	C -> T	3.1E-297	55.3%	84.9%	6.5%	NP_776623.5		761	3	2281	1	None
SNP (transition)	108839032	C -> T	2.0E-317	58.8%	86.6%	7.0%	NP_776623.5		790	3	2368	1	None
SNP (transition)	108839040	G -> A	4.4E-304	57.1%	79.4%	6.7%	NP_776623.5		792	3	2376	3	None
SNP (transversion)	108839043	C -> A	4.0E-317	51.9%	83.5%	6.2%	NP_776623.5	N -> K	793	3	2379	3	Substitution
SNP (transition)	108839059	G -> A	4.1E-275	57.0%	75.2%	5.2%	NP_776623.5	E -> K	799	3	2395	1	Substitution
SNP (transition)	108839062	G -> A	2.9E-284	56.4%	81.0%	6.6%	NP_776623.5	D -> N	800	3	2398	1	Substitution

SNP (transversion)	108839075	G -> C	8.6E-273	60.4%	88.0%	6.1%	NP_776623.5	G -> A	804	3	2411	2	Substitution
SNP (transversion)	108839076	G -> C	0.0	58.1%	71.6%	10.8%	NP_776623.5		804	3	2412	3	None
SNP (transversion)	108839125	C -> A	0.0	58.3%	67.1%	8.8%	NP_776623.5	P -> T	821	3	2461	1	Substitution
SNP (transversion)	108839144	C -> A	7.6E-322	57.1%	83.7%	7.0%	NP_776623.5	T -> K	827	3	2480	2	Substitution
SNP (transversion)	108839159	C -> A	1.7E-271	50.7%	86.9%	6.0%	NP_776623.5	T -> N	832	3	2495	2	Substitution
SNP (transversion)	108839163	C -> A	2.3E-273	55.1%	77.3%	5.4%	NP_776623.5	N -> K	833	3	2499	3	Substitution
SNP (transition)	108839182	T -> C	4.1E-271	51.0%	83.4%	5.9%	NP_776623.5	S -> P	840	3	2518	1	Substitution
SNP (transversion)	108839185	A -> C	7.9E-307	50.1%	83.9%	6.8%	NP_776623.5	T -> P	841	3	2521	1	Substitution
SNP (transition)	108839197	G -> A	1.1E-295	58.6%	80.7%	6.7%							
SNP (transition)	108839202	C -> T	1.8E-315	63.7%	88.4%	6.9%							
SNP (transition)	108839204	C -> T	0.0	57.4%	71.0%	7.7%							
SNP (transition)	108839219	C -> T	8.3E-297	52.3%	84.8%	6.7%							
SNP (transition)	108839223	G -> A	0.0	60.5%	84.8%	8.0%							
SNP (transversion)	108839238	T -> G	3.7E-289	53.7%	86.9%	6.6%							
SNP (transversion)	108839260	C -> G	0.0	63.5%	77.8%	9.3%							
SNP (transversion)	108839263	C -> A	0.0	57.6%	77.5%	7.6%							
SNP (transversion)	108839266	G -> T	6.9E-304	66.2%	82.5%	6.8%							

SNP (transversion)	108839269	C -> A	8.5E-299	53.2%	86.8%	6.7%							
SNP (transversion)	108839270	C -> A	4.7E-309	52.9%	76.3%	6.9%							
SNP (transversion)	108839291	G -> T	3.9E-272	61.9%	80.9%	6.4%							
SNP (transversion)	108839302	G -> T	3.6E-284	58.5%	79.0%	6.6%							

10.3 Kompletní přehled nalezených SNP v bovinním genu MyD88

Polymorphism Type	Original sequence	Coverage	Change	Variant P-Value approx.	Strand-Bias	Ref. Freq.	Ref. Nucleotide	Amino Acid Change	CDS Position	Codon Change	Protein Effect	Variant Freq.	Variant Raw Freq.	Protein id
SNP (transversion)	11647703	1452	C->G	0	57.3%	57.3%	C					38.8%	564	
SNP (transition)	11647731	5976	C->T	1.5E-265	55.9%	78.8%	C					8.1%	485	
SNP (transition)	11647731	5976	C->T	1.5E-265	55.9%	78.8%	C					8.1%	485	
SNP (transversion)	11647736	5983	G->T	1.6E-322	55.5%	69.8%	G					9.1%	544	
Insertion (tandem repeat)	11647756	5995	(A)2->(A)3	2.6E-203	60.4%							7.0%	417	
SNP (transversion)	11647770	6001	G->T	2.1E-292	59.1%	87.2%	G					8.6%	514	
Insertion	11647807	6023	+A	1.5E-209	69.2%							7.1%	425	
SNP (transition)	11647826	6043	G->A	3.1E-222	62.3%	84.7%	G					7.3%	440	
SNP (transversion)	11647829	6045	C->A	1.8E-237	58.6%	85.7%	C					7.6%	457	
SNP (transversion)	11647864	6095	G->T	1.0E-238	53.3%	84.1%	G					7.5%	460	
SNP	11647930	6183	G->C	1.4E-251	57.4%	71.1%	G					7.7%	477	

(transversion)															
SNP (transversion)	11647933	6194	C -> A	2.0E-249	52.2%	84.6%	C						7.7%	475	
SNP (transversion)	11647950	6237	T -> G	4.7E-274	53.7%	82.4%	T						8.1%	503	
Deletion (tandem repeat)	11647954	6251	(G)4 -> (G)3	1.2E-294	56.0%		G						26.3%	1647	
SNP (transversion)	11647956	6256	C -> G	1.2E-246	55.5%	74.9%	C						7.6%	474	
SNP (transversion)	11647978	6307	G -> T	1.3E-274	51.2%	73.0%	G						8.0%	506	
SNP (transition)	11647983	6314	G -> A	5.8E-220	56.3%	85.2%	G						7.1%	446	
SNP (transversion)	11647994	6327	C -> A	5.2E-204	58.6%	85.5%	C						6.8%	428	
SNP (transversion)	11647999	6331	G -> T	1.6E-253	50.0%	79.5%	G						7.6%	484	
SNP (transition)	11648002	6332	G -> A	1.6E-264	50.2%	70.1%	G						7.8%	496	
SNP (transversion)	11648010	6331	C -> A	1.2E-211	52.4%	80.5%	C						6.9%	437	
SNP (transversion)	11648012	6332	C -> A	1.8E-219	52.9%	84.8%	C						7.0%	446	
SNP (transition)	11648027	6356	C -> T	5.7E-205	56.3%	72.9%	C						6.8%	430	
SNP (transversion)	11648044	6385	C -> A	5.8E-244	55.4%	75.3%	C	Q -> K	604	CAA - > AAA	Substitution	7.3%	465	XP_0052 22436.1	
SNP	11648044	6385	C -> A	5.8E-244	55.4%	75.3%	C	Q -> K	340	CAA -	Substitution	7.3%	465	NP_0010	

(transversion)										> AAA				14404.1
SNP (transversion)	11648053	6388	A -> T	3.3E-216	53.4%	82.8%	A	I -> F	613	ATT - > TTT	Substitution	7.0%	444	XP_0052 22436.1
SNP (transversion)	11648053	6388	A -> T	3.3E-216	53.4%	82.8%	A	I -> F	349	ATT - > TTT	Substitution	7.0%	444	NP_0010 14404.1
SNP (transition)	11648056	6392	C -> T	6.5E-232	51.1%	83.2%	C		616	CTG - > TTG	None	7.2%	462	XP_0052 22436.1
SNP (transition)	11648056	6392	C -> T	6.5E-232	51.1%	83.2%	C		352	CTG - > TTG	None	7.2%	462	NP_0010 14404.1
SNP (transition)	11648071	6401	G -> A	6.3E-282	52.6%	79.5%	G	E -> K	631	GAG - > AAG	Substitution	8.1%	517	
SNP (transition)	11648124	6521	G -> A	4.2E-278	54.0%	74.9%	G		684	CGG - > CGA	None	7.9%	517	XP_0052 22436.1
SNP (transition)	11648124	6521	G -> A	4.2E-278	54.0%	74.9%	G		420	CGG - > CGA	None	7.9%	517	NP_0010 14404.1
SNP (transversion)	11648148	6530	C -> A	6.7E-206	51.4%	78.6%	C		708	ACC - > ACA	None	6.7%	435	XP_0052 22436.1
SNP (transversion)	11648148	6530	C -> A	6.7E-206	51.4%	78.6%	C		444	ACC - > ACA	None	6.7%	435	NP_0010 14404.1
SNP (transversion)	11648160	6531	C -> A	1.1E-316	58.6%	73.0%	C	D -> E	720	GAC - > GAA	Substitution	8.5%	558	XP_0052 22436.1
SNP (transversion)	11648160	6531	C -> A	1.1E-316	58.6%	73.0%	C	D -> E	456	GAC - > GAA	Substitution	8.5%	558	NP_0010 14404.1
SNP (transition)	11648164	6534	G -> A	4.3E-208	52.2%	85.5%	G	G -> S	727	GGT - > AGT	Substitution	5.8%	380	
SNP (transversion)	11648168	6533	G -> T	2.6E-270	51.9%	76.7%	G					7.8%	509	
SNP (transition)	11648173	6531	G -> A	2.1E-225	59.9%	85.9%	G					7.0%	459	

SNP (transition)	11648189	6531	T -> C	1.5E-320	50.5%	83.6%	T						8.6%	562
SNP (transition)	11648190	6532	C -> T	1.3E-238	59.1%	83.9%	C						7.3%	474
SNP (transversion)	11648194	6531	G -> C	1.2E-317	51.3%	69.0%	G						8.6%	559
SNP (transversion)	11648196	6533	C -> A	7.1E-310	55.0%	76.3%	C						8.4%	551
SNP (transversion)	11648199	6535	A -> T	7.1E-209	66.4%	81.7%	A						6.7%	440
SNP (transition)	11648200	6534	G -> A	3.1E-233	54.9%	84.6%	G						7.2%	468
SNP (transition)	11648201	6534	G -> A	1.9E-239	59.4%	75.7%	G						7.3%	475
SNP (transversion)	11648203	6535	C -> A	1.8E-247	57.0%	81.1%	C						7.4%	484
SNP (transversion)	11648207	6535	G -> T	3.5E-271	62.9%	84.6%	G						7.8%	510
SNP (transversion)	11648209	6536	G -> T	1.4E-255	61.3%	84.8%	G						7.5%	493
SNP (transversion)	11648211	6537	T -> G	3.6E-201	57.3%	85.0%	T						6.6%	431
SNP (transversion)	11648212	6537	G -> T	4.0E-226	55.7%	80.9%	G						7.0%	460
SNP (transition)	11648216	6540	A -> G	4.5E-233	56.8%	80.1%	A						7.2%	468
SNP (transition)	11648217	6541	G -> A	6.4E-202	57.6%	85.1%	G						6.6%	432
SNP	11648231	6548	G -> A	8.5E-250	56.9%	74.2%	G						7.4%	487

(transition)														
SNP (transversion)	11648242	6550	G -> T	3.3E-216	53.0%	68.0%	G						6.9%	449
SNP (transversion)	11648246	6551	T -> G	9.7E-213	54.8%	85.3%	T						6.8%	445
SNP (transversion)	11648251	6552	G -> T	5.7E-267	53.2%	83.4%	G						7.7%	506
SNP (transversion)	11648253	6554	G -> C	4.5E-265	58.3%	73.0%	G						7.7%	504
SNP (transition)	11648285	6574	C -> T	1.9E-216	52.9%	84.6%	C						6.8%	450
SNP (transversion)	11648293	6583	A -> C	1.8E-251	56.5%	76.7%	A						7.4%	490
SNP (transversion)	11648299	6601	A -> T	9.4E-274	55.3%	82.0%	A						7.8%	515
SNP (transversion)	11648302	6616	A -> T	1.1E-240	54.3%	81.8%	A						7.2%	479
SNP (transversion)	11648303	6624	T -> A	2.7E-220	55.9%	83.7%	T						6.9%	456
SNP (transversion)	11648312	1115 1	A -> C	2.6E-253	58.3%	88.7%	A						5.6%	626
SNP (transversion)	11648314	1124 9	C -> A	6.5E-289	52.5%	85.9%	C						6.0%	674
SNP (transition)	11648344	1138 9	T -> C	3.0E-269	62.9%	87.2%	T						5.7%	653
SNP (transversion)	11648352	1138 9	A -> C	1.4E-271	50.9%	87.3%	A						5.8%	656
SNP (transversion)	11648355	1138 4	G -> C	6.7E-286	59.2%	81.5%	G						5.9%	674

SNP (transversion)	11648372	1118 2	C -> G	1.3E-208	52.2%	86.9%	C					5.1%	567	
SNP (transversion)	11648375	9240	G -> T	3.2E-263	56.6%	77.1%	G					6.3%	585	
SNP (transversion)	11648395	6148	G -> T	2.9E-227	54.1%	77.5%	G					7.3%	449	
Deletion (tandem repeat)	11648460	6125	(C)4 -> (C)3	2.5E-227	53.5%		C					24.3%	1487	
SNP (transition)	11648464	6125	C -> T	1.4E-201	53.5%	72.2%	C					6.8%	419	
SNP (transition)	11648472	6123	A -> G	3.2E-204	60.9%	75.1%	A					6.9%	422	
SNP (transversion)	11648488	6123	C -> A	1.5E-208	52.5%	65.6%	C					7.0%	427	
Deletion (tandem repeat)	11648488	6123	(C)3 -> (C)2	2.3E-235	54.7%		C					24.6%	1504	
SNP (transversion)	11648503	6122	C -> A	3.2E-226	56.8%	70.1%	C					7.3%	447	
SNP (transversion)	11648507	6121	G -> C	9.4E-259	57.5%	71.2%	G		465	GGG - > GGC	None	7.8%	478	NP_0010 14404.1
SNP (transversion)	11648657	6018	G -> T	2.1E-210	51.1%	73.5%	G	W -> C	615	TGG - > TGT	Substitution	6.9%	418	NP_0010 14404.1
SNP (transversion)	11648712	5998	T -> G	1.3E-200	57.7%	78.2%	T					6.9%	414	
SNP (transversion)	11648735	5993	C -> A	7.0E-267	50.9%	69.5%	C					8.1%	487	
SNP	11648758	5997	T -> C	1.7E-208	56.0%	76.5%	T					7.1%	423	

(transition)														
Deletion	11648762	5996	-G	8.5E-212	56.3%		G					23.9%	1432	
SNP (transversion)	11648764	5996	C -> G	1.3E-254	55.7%	78.7%	C					7.9%	474	
SNP (transversion)	11648765	5996	C -> G	8.4E-214	52.7%	74.4%	C					7.2%	429	
SNP (transition)	11648797	5992	T -> C	8.5E-232	59.9%	75.2%	T					7.5%	449	
SNP (transversion)	11648800	5991	C -> A	2.7E-313	52.7%	62.1%	C					8.9%	535	
Deletion (tandem repeat)	11648800	5991	(C)3 -> (C)2	3.0E-282	53.6%		C					26.3%	1578	
SNP (transition)	11648812	5988	C -> T	1.4E-217	55.2%	59.3%	C					7.2%	433	
SNP (transversion)	11648845	5985	A -> C	4.5E-207	57.5%	75.7%	A					7.0%	421	
Deletion (tandem repeat)	11648853	5990	(C)4 -> (C)3	2.7E-299	58.7%		C					26.9%	1611	
Deletion (tandem repeat)	11648966	6009	(C)3 -> (C)2	3.1E-228	57.3%		C					24.5%	1470	
SNP (transversion)	11648988	6009	G -> C	1.5E-321	55.9%	69.3%	G					9.1%	544	
Deletion (tandem repeat)	11649009	6010	(C)3 -> (C)2	2.3E-232	59.7%		C					24.6%	1479	
SNP	11649039	6012	G -> A	2.2E-264	54.4%	65.9%	G					8.1%	485	

(transition)															
Deletion (tandem repeat)	11649039	6012	(G)3 -> (G)2	8.6E-214	55.6%		G					23.9%	1439		
SNP (transition)	11649087	6026	C -> T	8.5E-231	58.6%	70.9%	C					7.5%	449		
SNP (transversion)	11649092	6026	G -> T	4.4E-205	56.2%	80.4%	G					7.0%	420		
Deletion	11649095	6027	-T	2.9E-222	53.1%		T					24.2%	1460		
Insertion	11649096	6026	+G	4.3E-212	67.1%							7.1%	428		
Deletion (tandem repeat)	11649126	6135	(G)3 -> (G)2	1.6E-208	52.2%		G					23.6%	1447		
Deletion (tandem repeat)	11649146	6169	(C)4 -> (C)3	1.5E-283	52.7%		C					26.1%	1611		
Deletion (tandem repeat)	11649204	6223	(C)5 -> (C)4	3.9E-252	57.6%		C					25.0%	1556		
SNP (transition)	11649206	6224	T -> C	6.5E-268	51.4%	79.1%	T					8.0%	496		
SNP (transversion)	11649243	6231	C -> A	5.7E-264	53.0%	58.6%	C			762	CCC - > CCA	None	7.9%	492	NP_0010 14404.1
SNP (transversion)	11649252	6242	C -> A	6.6E-239	58.9%	76.5%	C			771		Truncation	7.4%	465	NP_0010 14404.1
SNP (transition)	11649264	8015	G -> A	5.5E-245	51.1%	84.3%	G			783	AAG - > AAA	None	5.8%	468	NP_0010 14404.1
SNP (transversion)	11649302	8253	G -> T	2.3E-211	57.8%	85.6%	G	C -> F	821	TGT - > TTT	Substitution	6.0%	493	NP_0010 14404.1	

SNP (transition)	11649318	8249	C -> T	6.7E-231	52.8%	70.4%	C		837	CCC - > CCT	None	6.3%	517	NP_0010 14404.1
SNP (transversion)	11649333	8238	G -> T	1.1E-316	52.4%	76.5%	G	W -> C	852	TGG - > TGT	Substitution	7.5%	616	NP_0010 14404.1
SNP (transition)	11649336	8236	C -> T	3.7E-296	54.3%	82.7%	C		855	TTC -> TTT	None	7.2%	593	NP_0010 14404.1
SNP (transition)	11649353	8194	A -> G	7.4E-200	55.8%	81.7%	A	K -> R	872	AAG - > AGG	Substitution	5.4%	445	NP_0010 14404.1
SNP (transversion)	11649355	8187	G -> C	3.1E-255	62.0%	77.7%	G	A -> P	874	GCC - > CCC	Substitution	6.4%	525	NP_0010 14404.1
Insertion (tandem repeat)	11649374	6841	(A)2 -> (A)3	7.7E-315	53.4%							8.3%	567	
SNP (transversion)	11649375	3531	T -> A	2.1E-252	53.2%	71.2%	T					10.8%	380	
SNP (transition)	11649386	3160	C -> T	5.7E-238	51.0%	66.8%	C					11.1%	351	
SNP (transversion)	11649388	3153	G -> T	4.8E-222	55.4%	76.2%	G					10.7%	336	
SNP (transition)	11649390	3150	G -> A	9.9E-242	52.8%	65.5%	G					11.2%	354	
SNP (transition)	11649418	3293	C -> T	1.9E-239	50.0%	74.7%	C					10.9%	358	
SNP (transition)	11649434	3292	C -> T	3.2E-220	52.4%	67.4%	C					10.3%	340	
SNP (transversion)	11649437	3293	C -> A	1.1E-313	54.7%	70.0%	C					12.9%	424	
SNP (transversion)	11649445	3298	G -> T	3.8E-200	52.3%	72.8%	G					9.7%	321	

SNP (transversion)	11649448	3299	G -> T	3.6E-202	55.1%	76.2%	G						9.8%	323
SNP (transition)	11649455	3296	G -> A	7.3E-277	52.6%	62.1%	G						11.9%	392
SNP (transition)	11649458	3293	C -> T	4.6E-218	58.0%	75.1%	C						10.3%	338
SNP (transversion)	11649470	3284	G -> T	9.7E-202	59.0%	76.9%	G						9.8%	322
SNP (transition)	11649493	3261	C -> T	9.7E-239	55.1%	69.2%	C						10.9%	356
SNP (transversion)	11649521	3248	G -> T	3.9E-201	56.6%	70.4%	G						9.9%	320
SNP (transition)	11649557	3226	G -> A	5.0E-202	53.8%	76.7%	G						9.9%	320
SNP (transversion)	11649560	3232	C -> A	2.3E-264	54.2%	73.7%	C						11.7%	378
SNP (transversion)	11649573	3234	C -> G	8.0E-205	54.5%	62.9%	C						10.0%	323
SNP (transversion)	11649600	3277	T->A	3,00E-263	55.9%	69.4%	T						11.6%	379
SNP (transversion)	11649766	1087	G->C	1.1E-276	50.2%	20.1%	G						24.6%	267
SNP (transition)	11649800	3843	G -> A	1.5E-282	58.2%	63.4%	G						11.0%	421
SNP (transversion)	11649801	3850	A -> C	1.8E-229	59.8%	72.9%	A						9.6%	371
SNP (transversion)	11649803	3856	C -> A	1.4E-289	57.7%	72.2%	C						11.1%	428
Insertion	11649924	4712	+C	1.5E-207	58.4%								8.1%	380

SNP (transition)	11649933	4754	C -> T	8.5E-213	57.1%	71.4%	C					8.1%	387
SNP (transition)	11649973	4905	A -> G	1.5E-306	57.3%	70.7%	A					9.9%	487
SNP (transition)	11649986	4923	C -> T	9.1E-236	57.3%	75.0%	C					8.5%	417
SNP (transition)	11649994	4930	T -> C	2.6E-299	57.2%	71.0%	T					9.8%	481
SNP (transversion)	11650087	5216	T -> G	2.2E-222	57.1%	68.2%	T					7.9%	413
SNP (transition)	11650100	5524	T->C	8.5E-255	51,00 %	68.5%	T					9.5%	527
SNP (transversion)	11650100	5524	T->A	8.5E-255	52.8%	68.5%	T					8.3%	458
SNP (transversion)	11650102	5652	A -> C	2.0E-275	50.8%	66.1%	A					8.6%	484
SNP (transition)	11650104	6348	G -> A	1.9E-271	51.2%	68.0%	G					7.9%	504
SNP (transversion)	11650134	2762 3	G -> T	0.0	65.4%	86.0%	G					6.9%	1916
SNP (transversion)	11650214	2781 8	T -> A	0.0	68.8%	83.4%	T					6.1%	1694
SNP (transition)	11650493	2426 5	G -> A	0.0	65.9%	83.2%	G					7.0%	1704
Deletion (tandem repeat)	11650555	2432 6	(A)4 -> (A)3	1.8E-200	52.6%		A					19.4%	4730
SNP (transversion)	11650657	2447 6	G -> T	0.0	67.1%	88.4%	G					5.6%	1381

Deletion (tandem repeat)	11650711	2455 0	(A)4 -> (A)3	1.5E-219	56.9%		A					19.8%	4849
Deletion	11650738	2473 2	-C	3.3E-209	59.1%		C					19.5%	4833
Deletion (tandem repeat)	11650770	2446 3	(C)3 -> (C)2	3.4E-313	57.6%		C					18.0%	4395
SNP (transversion)	11650796	2452 3	C -> G	0.0	66.6%	89.1%	C					6.1%	1508
SNP (transition)	11650884	2457 1	G -> A	0.0	65.0%	84.6%	G					10.4%	2559

10.4 Zdrojový Kód makra určeného pro porovnání SNP s databázemi

```
Sub comm1_Kliknutí()  
Dim i As Long  
Dim j As Long  
Dim srcNum As Long  
Dim lowerNum As Long  
Dim upperNum As Long  
Dim source As String  
Dim target As String  
Dim matchFound As Boolean  
  
j = 3  
With ActiveSheet  
  Do While .Cells(j, 15) <> Empty  
    If IsNumeric(.Cells(j, 15)) = False Then  
      i = 3  
      srcNum = .Cells(j, 9)  
      lowerNum = srcNum - 10  
      upperNum = srcNum + 10  
      matchFound = False  
      Do While .Cells(i, 26) <> Empty  
        If .Cells(i, 26) > lowerNum And .Cells(i, 26) < upperNum Then  
          .Cells(j, 16) = "Match found in range"  
          matchFound = True  
          Exit Do  
        End If  
        i = i + 1  
      Loop  
      If matchFound = False Then .Cells(j, 16) = "No match found in range"  
    Else  
      .Cells(j, 16) = "Skipped"  
    End If  
    j = j + 1  
  Loop  
  
End With  
End Sub
```

10.5 MyD88 SNP shodná s databázemi

Nalezeno					Databáze Ensembl					Databáze EBI (NCBI)		
Original seq.	Change	Ref. Freq.	Ref. Nucl.	Variant Freq.	Variant ID	Location	Allele	Conseq. Type	Transcript	Sequence Name	Name	Min (with gaps)
11647760	G -> C	73.4%	G	16.7%	rs209121238	22:11647760	G/C	intron variant	ENSBTAT0000000073 5.3	209121238	C/G	11647760
11647865	T -> G	83.1%	T	10.6%	rs466090792	22:11647865	T/G	intron variant	ENSBTAT0000000073 5.3	466090792	G/T	11647865
11647950	T -> G	82.4%	T	8.1%	rs437446976	22:11647950	T/A/G	intron variant	ENSBTAT0000004871 1.3			
11648342	C -> G	72.1%	C	16.5%	rs210275212	22:11648342	C/G	intron variant	ENSBTAT0000000073 5.3	210275212	C/G	11648342
11648376	T -> G	69.6%	T	12.5%	rs464864628	22:11648376	T/G	intron variant	ENSBTAT0000000073 5.3	464864628	G/T	11648376
11648472	A -> G	75.1%	A	6.9%	rs454563424	22:11648472	A/G	intron variant	ENSBTAT0000000073 5.3	454563424	A/G	11648472
11649096	A -> G	4.2%	A	51.9%	rs41995876	22:11649096	A/G	intron variant	ENSBTAT0000000073 5.3	41995876	A/G	11649096
11649252	C -> A	76.5%	C	7.4%	rs452633714	22:11649252	C/A	stop gained	ENSBTAT0000004871 1.3	452633714	A/C	11649252
11649808	T -> C	8.4%	T	55.1%	rs41995877	22:11649808	T/C	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	41995877	C/T	11649808
11649846	C -> A	68.7%	C	10.0%	rs480396738	22:11649846	C/A	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000004871 1.3	480396738	A/C	11649846
11649849	A -> C	73.9%	A	8.7%	rs448935538	22:11649849	A/C	3 prime	ENSBTAT0000000073	448935538	A/C	11649849

								UTR variant	5.3			
11649909	C -> T	66.3%	C	9.7%	rs445176939	22:11649909	C/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000004871 1.3	445176939	C/T	11649909
11649920	T -> C	71.1%	T	8.0%	rs475739510	22:11649920	T/C	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	475739510	C/T	11649920
11649925	G -> T	69.4%	G	8.9%	rs465289412	22:11649925	G/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	465289412	G/T	11649925
11649927	A -> T	69.3%	A	9.4%	rs433946047	22:11649927	A/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000004871 1.3	433946047	A/T	11649927
11649929	C -> A	66.2%	C	8.7%	rs454162821	22:11649929	C/A	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	454162821	A/C	11649929
11649936	C -> T	69.5%	C	9.2%	rs474303568	22:11649936	C/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000004871 1.3	474303568	C/T	11649936
11649949	T -> A	70.3%	T	8.8%	rs436503691	22:11649949	T/A	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	436503691	A/T	11649949
11649957	G -> A	68.8%	G	9.3%	rs457659673	22:11647959	G/A	intron variant	ENSBTAT0000004871 1.3			
11649971	T -> C	67.2%	T	9.4%	rs456645115	22:11649971	T/C	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	456645115	C/T	11649971
11649974	G -> A	69.4%	G	9.4%	rs720211262	22:11649974	G/A	3 prime UTR	ENSBTAT0000000073 5.3	720211262	A/G	11649974

								variant				
11649984	T -> G	71.7%	T	10.1%	rs476863926	22:11649984	T/G	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650003	C -> T	72.1%	C	8.0%	rs723432386	22:11650003	C/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	723432386	C/T	11650003
11650004	G -> A	68.5%	G	9.0%	rs207889218	22:11650004	G/A	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000004871 1.3	207889218	A/G	11650004
11650011	G -> A	72.0%	G	8.6%	rs482128059	22:11650011	G/A	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000004871 1.3	482128059	A/G	11650011
11650044	G -> T	66.3%	G	12.7%	rs459065663	22:11650044	G/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	459065663	G/T	11650044
11650050	C -> T	68.2%	C	12.3%	rs472748468	22:11650050	C/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650053	T -> C	71.4%	T	8.5%	rs439960073	22:11650053	T/C	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000004871 1.3	439960073	C/T	11650053
11650065	T -> C	66.9%	T	9.4%	rs459980263	22:11650065	T/C	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	459980263	C/T	11650065
11650070	A -> G	63.0%	A	15.8%	rs207793357	22:11650070	A/G	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	207793357	A/G	11650070
11650071	A -> T	66.3%	A	10.6%	rs448984629	22:11650071	A/T	3 prime	ENSBTAT0000000073	448984629	A/T	11650071

								UTR variant	5.3			
11650073	A -> C	66.4%	A	10.7%	rs462695437	22:11650073	A/C	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	516728422	-/A	11650075
11650077	G -> A	62.5%	G	9.9%	rs797751095	22:11650077	G/A	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000004871 1.3	797751095	A/G	11650077
11650079	G -> C	61.9%	G	11.5%	rs482847699	22:11650079	G/C	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650083	G -> A	64.7%	G	9.8%	rs720997041	22:11650083	G/A	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000004871 1.3	720997041	A/G	11650083
11650123	G -> T	76.6%	G	7.9%	rs465252477	22:11650117	G/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	465252477	G/T	11650117
11650135	G -> T	80.5%	G	7.4%	rs467809979	22:11650145	G/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650224	G -> T	87.0%	G	7.5%	rs801315938	22:11650224	G/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650287	C -> A	85.7%	C	6.7%	rs453604810	22:11650287	C/A	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650320	A -> C	88.2%	A	5.7%	rs482825987	22:11650320	A/C	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	482825987	A/C	11650323

11650329	G -> T	87.5%	G	5.6%	rs478874178	22:11650329	G/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650391	A -> C	85.1%	A	5.1%	rs455201466	22:11650391	A/C	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650582	A -> T	67.2%	A	18.9%	rs41995878	22:11650582	A/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650622	G -> T	81.0%	G	9.4%	rs450481466	22:11650613	G/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	450481466	G/T	11650616
11650776	G -> T	56.5%	G	7.2%	rs450021855	22:11650776	G/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650849	T -> C	44.9%	T	37.6%	rs110635598	22:11650849	T/C	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650856	G -> T	87.1%	G	5.7%	rs452767825	22:11650856	G/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650885	G -> T	81.0%	G	7.0%	rs477186415	22:11650885	G/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650896	A -> C	77.0%	A	5.4%	rs459671668	22:11650896	A/C/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650920	G -> A	86.0%	G	5.9%	rs468757959	22:11650920	G/A	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			

11650928	A -> G	89.3%	A	5.4%	rs451073467	22:11650928	A/G	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650936	G -> A	84.9%	G	6.6%	rs464896954	22:11650929	G/A	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3			
11650945	C -> T	82.8%	C	6.0%	rs472243998	22:11650945	C/T	3 prime UTR variant	ENSBTAT0000000073 5.3	472243998	C/T	11650948
11649809	G -> C	78.5%	G	10.2%						111791297 0	C/G	11649809
11650041	C -> T	61.2%	C	8.2%						472748468	C/T	11650050
11650084	A -> C	64.9%	A	11.9%						462695437	A/C	11650073
11650109	G -> T	85.5%	G	10.2%						445085205	G/T	11650107
11650121	A -> T	84.0%	A	5.1%						433909180	A/T	11650124
11650227	G -> T	89.5%	G	5.4%						801315938	G/T	11650227
11650241	G -> A	87.4%	G	5.8%						452638452	A/G	11650241
11650294	A -> C	89.7%	A	5.0%						453604810	A/C	11650290
11650318	A -> C	86.1%	A	5.2%						462631367	A/C	11650317
11650323	T -> A	85.7%	T	5.3%						458733106	A/T	11650327
11650376	C -> T	70.5%	C	7.9%						470296070	C/G/T	11650366
11650435	C -> T	84.6%	C	5.7%						456111975	C/T	11650433
11650549	A -> G	84.9%	A	5.8%						526823783	A/G	11650544
11650737	C -> G	87.3%	C	5.0%						715058776	C/G	11650746
11650833	A -> G	83.6%	A	5.1%						437485853	A/G	11650825
11650835	G -> T	79.3%	G	6.6%						468977182	G/T	11650832
11650874	A -> T	82.0%	A	5.6%						461108283	A/C/G/	11650874

											T	
11650879	A -> C	87.9%	A	6.8%						443514756	A/C	11650881
11650904	C -> T	82.6%	C	6.7%						479761793	C/T	11650902
11650904	(T)3 -> (T)4			5.8%						522437266	-/T	11650902

10.6 Zdrojový Kód používaný pro úpravu nukleotidů při určování haplotypů

```
Const inCol As Integer = 1 'input string
Const outCol As Integer = 2 'output string
Const out2Col As Integer = 4 'second output string, no position ignored
Const notesCol As Integer = 3 'column for notes
Const def1Col As Integer = 6
Const def2Col As Integer = 7
Const alt1Col As Integer = 8
Const ignoreCol As Integer = 9
Const refRow As Integer = 3
Const inRow As Integer = 3
```

```
Private Sub CommCorr_Click()
Dim refLen As Integer
Dim inLen As Integer
Dim i As Long
Dim j As Long
Dim inSeq As String
Dim outSeq As String
Dim outSeq2 As String
Dim ignore As Boolean
Dim flag As Boolean
Dim inCounter As Long 'counter of input strings
Dim def1Arr() As String
Dim def2Arr() As String
Dim alt1Arr() As String
Dim ignoreArr() As Boolean
Dim chis As String 'checked character in sequence

refLen = 0
```

i = 0

With ActiveSheet

'count length of reference values:

Do While .Cells(refRow + i, deflCol) <> Empty Or .Cells(inRow + i, ignoreCol) <>

Empty

refLen = refLen + 1

i = i + 1

Loop

i = 0

inCounter = 0

Do While .Cells(inRow + i, inCol) <> Empty

inCounter = inCounter + 1

i = i + 1

Loop

i = 0

flag = False

If CheckLen.Value = True Then 'if length check is activated

'check if input string length matches reference:

Do While .Cells(inRow + i, inCol) <> Empty

.Cells(1, 1) = inRow + i & " out of " & inCounter

DoEvents

If Len(.Cells(inRow + i, inCol)) <> refLen Then

.Cells(inRow + i, notesCol) = "Input string length incorrect!"

flag = True

Else

.Cells(inRow + i, notesCol) = "Length correct"

End If

DoEvents

i = i + 1

```
Loop
End If
```

```
If flag Then
    MsgBox ("Incorrect length detected." & vbCrLf & "Check and correct indicated cases.")
    Exit Sub
End If
flag = False
```

```
'load reference string into arrays:
```

```
ReDim def1Arr(refLen)
```

```
ReDim def2Arr(refLen)
```

```
ReDim alt1Arr(refLen)
```

```
ReDim ignoreArr(refLen)
```

```
For i = 0 To refLen - 1
```

```
    def1Arr(i) = .Cells(refRow + i, def1Col)
```

```
    def2Arr(i) = .Cells(refRow + i, def2Col)
```

```
    alt1Arr(i) = .Cells(refRow + i, alt1Col)
```

```
    If .Cells(refRow + i, ignoreCol) <> Empty Then ignoreArr(i) = True Else ignoreArr(i) =
```

```
False
```

```
Next i
```

```
'compare chars of input sequence and build output:
```

```
i = 0
```

```
outSeq = Empty
```

```
Do While .Cells(inRow + i, inCol) <> Empty
```

```
    .Cells(1, 1) = i + 1 & " out of " & inCounter
```

```
    DoEvents
```

```
    inSeq = .Cells(inRow + i, inCol)
```

```
    For j = 0 To refLen
```

```
        chis = Mid(inSeq, j + 1, 1)
```

```

'first output with ignored positions:
If chis <> def1Arr(j) And ignoreArr(j) = False Then
  If chis <> def2Arr(j) Then
    If chis <> alt1Arr(j) Then
      outSeq = outSeq & def1Arr(j)
    Else
      outSeq = outSeq & chis
    End If
  Else
    outSeq = outSeq & chis
  End If
Else
  outSeq = outSeq & chis
End If

```

```

'second output, no ignored positions:
If chis <> def1Arr(j) Then
  If chis <> def2Arr(j) Then
    If chis <> alt1Arr(j) Then
      outSeq2 = outSeq2 & def1Arr(j)
    Else
      outSeq2 = outSeq2 & chis
    End If
  Else
    outSeq2 = outSeq2 & chis
  End If
Else
  outSeq2 = outSeq2 & chis
End If
Next j
.Cells(inRow + i, outCol) = outSeq

```

```
.Cells(inRow + i, out2Col) = outSeq2
outSeq = Empty
outSeq2 = Empty
i = i + 1
Loop

ReDim def1Arr(0)
ReDim def2Arr(0)
ReDim alt1Arr(0)
ReDim ignoreArr(0)

End With
End Sub
```

10.7 Výsledná vyhodnocená data z genotypovacích reakcí, gen TLR1

SNP v TLR1 u býků ČESTR podle genotypování Snapshot

Reakce v multiplexu	A1	A1	C1	C1	C2	C2
SNP (podle ref. sekv. FJ147090)	798C>T		1762G>A		2097T>C	
Označení primeru	T798R		T762R		T097R	
Počet bazí	23	23	23	23	30	30
Alela	C	T	G	A	T	C
Inkorporovaný ddNTP*	G	A	C	T	A	G
Býk číslo						
B01						
B02						
B03		T		A		C
B04						
B05	C		G	A	T	C
B06		T	G	A	T	C
B07	C					C
B08	C	T	G		T	C
B09		T		A	T	C
B10		T	G	A	T	C
B11		T	G	A	T	
B12	C		G	A	T	C
B13						
B14			G	A	T	C
B15		T	G		T	C
B16		T		A	T	C
B17	C	T	G	A	T	C
B18	C		G	A	T	
B19		T	G		T	C
B20			G	A	T	C
B21	C		G	A	T	C
B22	C	T	G	A	T	
B23	C	T	G	A	T	
B24				A	T	
B25						
B26			G	A	T	
B27		T	G	A	T	
B28			G	A	T	
B29	C	T	G	A	T	
B30		T	G	A	T	
B31		T		A	T	C
B32	C	T	G	A	T	
B33		T		A	T	
B34	C	T	G	A	T	
B35	C	T				

B36	C	T	G		T	C
B37			G	A	T	
B38						
B39		T		A	T	
B40			G	A	T	C
B42	C		G	A	T	
B43	C	T	G	A	T	
B44		T		A	T	C
B45	C		G	A	T	
B46				A		
B47	C	T	G	A	T	
B48	C	T	G	A	T	
B49						
B50						
B51						
B52			G		T	
B53			G	A	T	
B54	C		G	A	T	C
B55			G	A	T	C
B56	C	T	G	A	T	C
B57	C					
B58	C			A	T	C
B59	C	T	G		T	
B60						
B61	C		G	A	T	
B62						
B63			G	A	T	C
B64			G	A	T	
B65	C		G	A	T	C
B66			G	A	T	
B67	C	T	G	A	T	C
B68			G	A	T	C
B69	C	T	G	A	T	C
B70	C	T	G	A	T	
B71			G	A	T	C
B72				A		
B73						
B74						
B75			G	A	T	C
B76			G	A		C
B77	C		G	A	T	
B78			G	A		C
B79	C	T	G	A	T	C
B80	C	T	G	A		C
B81	C	T	G	A	T	C
B82	C		G		T	
B83	C	T	G	A	T	
B84	C	T	G		T	C
B85						

B86		T	G		T	C
B87					T	C
B88	C		G	A	T	
B89			G	A		
B90			G	A	T	
B91			G		T	C
B92						
B93	C		G	A		C
B94	C	T				
B95				A	T	C
B96	C	T				

10.8 Výsledná vyhodnocená data z genotypovacích reakcí, gen TLR4

SNP v TLR14u býků ČESTR podle genotypování Snapshot

Reakce v multiplexu	D1	D1	D2	D2	D3	D3	D4	D4	D5	D5	D6	D6	E1	E1	E2	E2	E3	E3	E4	E4	E5	E5	E6	E6
SNP (podle ref. sekv. AC000135.1)	245G>C		610C>T		5087A>G		5134G>A		7999A>G		8885A>G		9422T>C		9713G>A		9787C>T		9794T>C		10307T>C		103010T>G	56,5
Označení primeru	T245F		T610R		T087F		T134R		T999F		T885F		T422F		T713F		T787F		T794F		T307F		T010F	
Počet bazí	25	25	30	30	35	35	40	40	45	45	50	50	25	25	30	30	35	35	40	40	45	45	50	50
Alela	G	C	C	T	A	G	G	A	A	G	A	G	T	C	G	A	C	T	T	C	T	C	T	G
Inkorporovaný ddNTP*	G	C	G	A	A	G	C	T	A	G	A	G	T	C	G	A	C	T	T	C	T	C	T	G
Býk číslo																								
B01	G	C	C		A	G	G		A					C								T		T
B02	G	C	C						A	G	A			C	G					T		T		T
B03	G		C						A	G	A			C	G					T		T		T
B04	G		C							G	A		T	C	G				T	T		T		T
B05	G	C	C						A	G	A			C	G				T	T		T		T
B06	G	C	C						A	G	A			C	G				T	T		T		
B07	G	C	C	T					A	G		G		C	G				T	T		T		T
B08	G	C	C							G				C	G				T	T		T	C	T
B09	G	C	C							G	A		T	C	G				T	T		T	C	
B10	G	C	C						A	G	A			C	G				T	T		T	C	
B11	G	C	C						A	G	A			C	G				T	T		T		T

B12	G	C	C		A	G	G		A	G	A		C	G		T	T		T	C		T
B13	G	C	C		A	G	G		A	G	A		C	G		T	T		T			T
B14	G		C		A		G			G	A		C	G		T	T		T			T
B15	G	C	C		A	G							C	G		T	T		T			T
B16	G	C	C		A	G	G		A	G	A		C	G		T	T		T			T
B17	G	C	C		A	G			A	G	A							C				
B18	G	C	C		A	G			A	G	A	G	C	G		T	T		T			T
B19	G	C	C		A	G	G		A	G	A		C	G	C	T	T		T	C	G	T
B20	G	C	C		A		G			G	A	T	C	G		T	T		T			T
B21	G	C	C		A	G	G		A	G	A		C	G	C		T		T	C	G	T
B22		C	C			G	G	A	A		A			G		T	T		T			T
B23	G	C	C		A		G			G	A		C	G		T	T		T			T
B24	G	C	C		A	G	G	A	A	G	A	T	C	G		T	T		T			T
B25	G	C	C		A	G	G		A	G	A		C	G		T	T		T			T
B26		C	C	T		G	G		A	G	A		C	G		T	T		T			T
B27	G	C	C	T	A	G	G		A	G	A		C	G		T	T		T			T
B28		C	C	T		G	G		A		A		C	G	C		T		T	C		T
B29	G	C	C		A	G	G		A	G	A		C	G	C		T		T	C		T
B30	G	C	C	T	A	G	G		A	G	A		C	G		T	T		T			T
B31	G	C	C		A	G			A	G	A		C	G		T	T		T			T
B32	G	C	C	T	A	G	G		A	G	A		C	G		T	T		T			T
B33	G	C	C	T	A		G			G	A	T	C	G		T	T		T			T
B34	G	C	C		A	G	G	A				T	C	G		T	T		T			T
B35	G	C	C	T	A		G			G	A	T	C	GO		T	T		T			T
B36		C			A	G	G	A					C	G		T	T		T			T
B37	G	C	C		A	G	G		A	G	A	T	C	G		T	T		T			T
B38	G	C	C		A		G		A	G	A	G	C	G		T	T		T			T
B39	G	C	C		A	G	G		A	G	A	T	C	G		T	T		T			T
B40		C	C			G	G		A		A		C	G		T	T		T			T
B41+B96	G	C	C	T	A		G		A	G	A	T	C	G		T	T		T			T

B42		C	C			G	G		A		A		C	G			T	T		T				T
B43	G		C		A					G			T	C	G			T	T		T			T
B44	G	C			A	G	G	A						C	G			T	T		T			T
B45	G	C	C	T	A		G		A	G	A		T	C	G			T	T		T			T
B46		C	C			G	G	A	A		A		T	C	G		C		T		T		C	T
B47	G		C	T	A		G	A		G	A			C	G				T		T			T
B48	G		C		A	G	G	A		G	A		T	C	G			T	T		T			T
B49	G	C	C		A	G	G				A			C	G			T	T		T			T
B50	G	C	C	T	A	G	G		A	G	A			C	G			T	T		T			T
B51	G	C	C		A	G	G		A	G	A			C	G			T	T		T			T
B52	G	C	C	T	A	G	G	A	A	G	A			C	G			T	T		T			T
B53	G	C			A	G	G	A						C	G				T		T			T
B54	G	C	C		A	G	G		A	G	A		T	C	G		C	T	T		T		C	T
B55	G	C	C	T	A		G			G	A		T	C	G				T		T			T
B56	G	C	C	T		G	G		A		A		T	C										
B57	G	C	C		A		G		A	G	A			C	G				T		T			T
B58		C	C	T		G	G		A		A			C	G			T	T		T			
B59	G	C	C		A		G		A	G	A		T	C	G			T	T		T			T
B60	G	C	C		A	G	G		A	G	A		T	C	G		C	T	T		T		C	T
B61	G	C			A	G	G																	
B62	G				A		G							C	G			T	T		T			T
B63	G	C	C		A		G						T	C	G			T	T		T			T
B64	G	C	C		A		G		A	G	A		T	C	G			T	T		T			T
B65	G	C	C		A		G			G	A		T	C	G			T	T		T			T
B66	G	C	C		A	G	G		A	G	A			C	G			T	T		T			T
B67	G	C	C	T	A	G	G		A	G				C	G			T	T		T			T
B68	G	C	C		A	G	G		A	G	A		T	C	G			T	T		T			T
B69	G	C	C		A		G			G			T	C	G			T	T		T			T
B70		C	C	T		G	G	A	A		A		T	C	G			T	T		T			T
B71		C	C			G	G		A		A		T	C	G		C		T				C	G

B72													C	G			T	T		T			T	
B73	G	C	C		A	G	G		A				T	C	G			T	T		T			T
B74	G	C	C		A		G			G	A													
B75	G	C	C		A	G	G		A	G	A		T	C	G			T	T		T			T
B76	G	C	C		A	G	G		A		A		T	C	G			T	T		T			T
B77	G	C	C	T	A	G	G		A	G	A		T	C	G			T	T		T			T
B78			C	C	T		G	G	A	A		A		T	C	G			T	T		T		T
B79	G	C	C	T	A	G	G		A	G			T	C	G			T	T		T			T
B80	G	C	C		A	G	G		A	G	A	G	T	C	G	A			T	T		T		T
B81			C	C			G	G	A	A		A		T	C	G			T	T		T		T
B82	G	C	C		A	G	G		A	G	A	G			G									
B83	G	C	C	T	A	G	G	A	A	G	A	G	T	C	G				T	T		T		T
B84													T	C	G				T	T		T		T
B85			C	C			G	G		A	G	A												
B86	G		C		A		G	A	A	G	A				C					T		T		T
B87	G	C	C		A	G	G		A	G	A		T	C	G				T	T		T		T
B88	G	C	C		A		G	A		G	A	G	T	C	G				T	T		T		T
B89													T	C	G				T	T		T		T
B90	G	C	C		A		G	A	A	G	A		T	C	G				T	T		T		T
B91	G		C							G	A		T	C	G				T	T		T	C	T
B92			C	C			G	G	A	A		A												
B93	G	C	C						A	A	G	A		T	C	G	A		T			C		
B94	G	C	C		A					G	A													
B95	G	C	C							A	G	A		T	C	G	A							
B96			C	C		A				A	G													