

Karel Novák  
a kolektiv

LABORATORNÍ URČOVÁNÍ  
FUNKČNÍCH VARIANT  
V GENECH *TLR* PŘIROZENÉ IMUNITY SKOTU



vydává

## OSVĚDČENÍ

11081 - 2018/ČPI

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837..

Název metodiky: **Laboratorní určování funkčních variant v genech TLR přirozené imunity skotu**

Autoři: prom. biol. Karel Novák, CSc., RNDr. Vladimíra Czerneková, Ph.D., Dr. Ing. Jitka Kyselová, Ing. Marek Bjelka, Ph.D.

Název organizace: **Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.**

Místo vydání: **Praha**

Rok vydání: **2018**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu č. **QJ1610489**

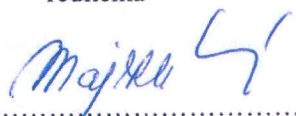
Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? ANO  
V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“, je výsledek typu N<sub>met</sub> zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce: <https://vuzv.cz/publikace-edicni>

V Praze dne. 10. 12.2018

Česká plemenářská inspekce  
Razítko odborného útvaru státní správy  
Slezská 100/7  
120 00 Praha 2  
1


Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:  
Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Zdenka Majzlíková  
ředitelka

  
.....  
Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitelky Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze ..... dne 11-12-2018

  
.....  
Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

**MINISTERSTVO  
ZEMĚDĚLSTVÍ**  
Těšnov 65/17  
110 00 Praha 1- Nové Město  
31

## METODIKA

# LABORATORNÍ URČOVÁNÍ FUNKČNÍCH VARIANT V GENECH *TLR* PŘIROZENÉ IMUNITY SKOTU

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu  
"Výskyt genetických faktorů pro infekční odolnost u vybraných plemen  
mléčného skotu"

(poskytovatel NAZV, projekt č. QJ1610489)

Autoři:

prom. biol. Karel Novák, CSc.  
RNDr. Vladimíra Czerneková, Ph.D.  
Dr. Ing. Jitka Kyselová  
Ing. Marek Bjelka, Ph.D.

Oponenti:

**prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.**  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

**Ing. Zdenka Majzlíková**  
Česká plemenářská inspekce, Praha

# OBSAH

1. Cíl .....	- 5 -
2. Popis metodiky .....	- 5 -
2.1. Úvod do problematiky	
2.1.1. Geny pro Toll-like receptory systému přirozené imunity a geny signální dráhy	
2.1.2. Poznatky o diverzitě sledovaných genů	
2.2. Experimentální část	
2.2.1. Příprava substrátů genotypovacích reakcí	
2.2.2. Provedení genotypovacích reakcí	
2.3. Vlastnosti variant imunitních genů	
3. Novost postupu .....	- 11 -
4. Uplatnění metodiky .....	- 12 -
5. Ekonomické aspekty .....	- 12 -
6. Seznam použité související literatury .....	- 13 -
7. Seznam publikací, které předcházely metodice .....	- 14 -

## 1. Cíl

Šlechtění dojeného skotu v současné době vychází hlavně z ukazatelů užitkovosti a hodnocení exteriéru, což je jednoznačně vyjádřeno ve struktuře selekčních indexů dvou hlavních plemen, českého strakatého skotu a holštýnského skotu. Takto jsou směřovány i vysoce účinné postupy genomické selekce.

Nicméně je třeba vzít v odpovídající míře v úvahu omezující úlohu zdravotních znaků pro další zvyšování ekonomické rentability chovů. Intenzivní selekce na užitkovost je spojena s fyziologickou zátěží, která zvyšuje pravděpodobnost metabolických chorob, což nesporně přispívá k nižší obranyschopnosti skotu vůči infekčním faktorům. Infekční tlak se zvyšuje i s rozšířením nových patogenů či variant rezistentních k léčbě antibiotiky.

Odborná studie z roku 2014 vyhodnotila ekonomický dopad jednotlivých případů mastitidy na 6000 Kč, což zahrnuje jak ztráty produkce, tak i náklady na veterinární léčbu a prevenci (Kvapilík 2014). K řešení situace může přispět větší váha zdravotních znaků, zejména infekční rezistence, v selekci dojeného skotu.

Cílem metodiky je shrnout možnosti, které poskytuje variabilita důležité skupiny genů vrozené imunity a definovat funkční metody pro laboratorní diagnostiku těchto variant, pro tvorbu šlechtitelských rozhodnutí. Dědivost infekční imunity byla zdokumentována v řadě studií, např. Zavadilová et al. (2011).

Zvažování účinků variant genů působících v rámci přirozené imunity je třeba považovat za doplněk základního výpočtu plemenných hodnot a tvorby selekčních indexů. Nicméně jeden ukazatel - selekční index - již svou podstatou nemůže zahrnout celou diverzitu obsaženou v genomu skotu. Za konkrétních okolností je možné a žádoucí zohlednit i genotypy pro jednotlivé geny, které mají vztah k složení daného stáda či k infekční situaci.

Tento přístup je uplatňován v programech, které se snaží kompenzovat slabší ukazatele konkrétního stáda výběrem vhodně doplňujících býků, např. SireMatch. Jedná se často i o cíl konzultační činnosti při zlepšení stáda pro požadované znaky.

Proto se tato metodika zaměřila na využití poznatků o variabilitě a účincích klíčových součástí systému přirozené imunity skotu. Za ty lze považovat řadu tzv. Toll-like receptorů a navazující signální dráhu, která aktivuje obrannou odpověď už na úrovni přepisu genů.

Variety vyskytující se v domácích populacích dojeného skotu jsou propojeny s údaji, které byly o jejich účinku publikovány pro světové populace. To by mělo poskytnout orientační údaje pro jejich šlechtitelské využití.

Široké uplatnění metodiky by rovněž mělo přispět k validaci efektů známých variant pro domácí populace a zpětně tak podpořit jejich širší uplatnění.

Kromě ekonomického přínosu je třeba brát zřetel na omezení používání antibiotik, zlepšení welfare zvířat a také stabilitu odvětví pro případ epizootií. Šlechtění na zdravotní znaky je třeba považovat za součást trvale udržitelného zemědělství.

## 2. Popis metodiky

### 2.1. Úvod do problematiky

#### 2.1.1. Geny pro Toll-like receptory systému přirozené imunity a geny signální dráhy

Klíčovými molekulami pro systém přirozené imunity skotu jsou tzv. Toll-like receptory (TLR). Byly objeveny překvapivě pozdě (1984), navíc nejdříve u bezobratlých podle jejich vlivu na vývoj. Jejich imunologická funkce a přítomnost u obratlovců byla identifikována až v devadesátých letech (Lemaitre et al. 1996, Vychodilová-Křenková et al. 2005). Jejich funkcí je rozeznávání struktur z povrchu buněk patogenů, které jsou nepostradatelné pro patogenitu a tudíž jsou u patogenů trvale přítomné.

I když struktura TLR je již vývojově stabilizována, přesto se vyskytují v populacích zvířat jejich různé genetické varianty. Často jsou tyto varianty spojeny s důsledky pro imunitní funkci či jsou aspoň důsledky předpokládány na základě typu změny ve struktuře receptoru (Novák, 2014).

Obdobný význam lze předpokládat i pro odchylky v proteinech, které přenášejí signál od Toll-like receptorů do buněčného jádra, konkrétně v klíčových členech dráhy - proteinech MyD88 a NFκB.

U skotu jsou Toll-like receptory rozrůzněny na deset forem, které se liší funkční specializací a jsou kódovány geny *TLR1* - *TLR10*. Metodika obsáhla pět členů této skupiny genů, o nichž je známo, že kódují receptory specializované na rozpoznávání bakteriálních patogenů. Konkrétně jsou to geny *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5* a *TLR6*. Publikované poznatky o jejich funkci jsou shrnuty v Tab. 1. Obdobnou dělbu funkcí lze pozorovat i u antivirové řady Toll-like receptorů a jejich genů (*TLR3*, 7, 8, a 9), které rozpoznávají zejména jednovláčkovou a dvouvláčkovou virovou RNA.

Tab. 1. *TLR* geny kódující produkty s antibakteriální funkcí

Gen	Funkce	Ovlivňuje odolnost
<i>TLR1</i>	rozpoznávání lipopeptidů G <sup>+</sup> bakterií	k mykobakteriím, mastitidám
<i>TLR2</i>	rozpoznávání bakteriálních lipopeptidů	k mykobakteriím
<i>TLR4</i>	rozpoznávání bakteriálních lipopolysacharidů	mastitida, respirační syndrom skotu
<i>TLR5</i>	rozpoznávání bakteriálního proteinu flagellinu	k infekcím G <sup>-</sup> bakteriemi
<i>TLR6</i>	rozpoznávání mikrobiálních lipopeptidů	mastitida

### 2.1.2. Poznatky o diverzitě sledovaných genů

Diverzita *TLR* genů byla původně popsána pro panel světových populací skotu, jmenovitě pro *TLR1* (Seabury et al. 2007) a *TLR4* (White et al. 2003). Postupně byly přidány poznatky získané pomocí klasického resekvenování DNA a nakonec i sekvenování nové generace (Fisher et al. 2011). V současné době se poznatky o celkové diverzitě soustřeďují ve specializovaných databázích (dbSNP v americkém National Center for Biotechnology Information a v databázi European Variation Archive v Evropském institutu pro bioinformatiku. První z databází ovšem z kapacitních důvodů přerušila aktualizace pro živočišné geny, zatímco zpřístupnění dat přenesených do databáze EBI probíhá postupně (v září 2018 ze 40%). Navíc lze předpokládat, že spektrum diverzity a frekvence jsou v různých plemenech skotu a různých populacích různé, takže přenositelnost těchto údajů je omezená.

Proto byl vývoj metodiky založen na vlastním resekvenování produkční populace českého strakatého skotu a dvou konzervovaných populací z programu genetických zdrojů (nukleové stádo ČESTR a česká červinka) pomocí technologie sekvenování nové generace (NGS). Výsledky byly získány nezávisle pomocí technologie Pacific Biosciences (firma), která čte dlouhé úseky DNA získané předem pomocí amplifikační reakce z příslušných genů a pomocí technologie Hiseq firmy Illumina, která čte krátké úseky o délce 150 nukleotidů přímo ze směsi genomové DNA. Protože obě technologie jsou zatíženy různými druhy systematických chyb, za spolehlivé byly považovány pouze ty strukturní varianty, které byly nalezeny nezávisle oběma metodami.

V řadě případů byly nalezené polymorfismy shodné s polymorfismy již popsány v databázích, případně v originálních publikacích, což je zpravidla spojeno s přidělením identifikátoru (rs kódy uváděné v tabulkách).

Protože v populaci českého strakatého skotu proběhlo následně určení výskytu variant u jednotlivých zvířat (genotypování) u souboru býků a protože technologie Pacific Biosciences poskytuje dlouhé úseky přečtené z jednoho vlákna, bylo možné určit tzv. diagnostické polymorfismy (tagSNP), které zastupují celé skupiny polymorfismů vyskytujících se v populaci společně díky fyzické vazbě na jednom vlákně DNA, tzv. haplotypy. Diagnostické SNP ("single nucleotide polymorphism", jednonukleotidový polymorfismus) jsou používány přednostně pro návrh a optimalizaci genotypovacích reakcí, neboť jejich znalost dovoluje současně určit i přítomnost dalších polymorfismů.

## 2.2. Experimentální část

Pro vývoj jednotlivých genotypovacích reakcí je použita obecná metoda extenze primeru (Hoogendoorn et al. 1999) vzhledem k vysoké spolehlivosti. Laboratorní postup byl v nejvyšší možné míře optimalizován tak, aby byla jeho finanční, pracovní a časová náročnost co nejmenší. Výchozí reakční směsi pro extenzní reakci je komerční varianta SNaPshot firmy Life Technologies Czech Republic.

Protože extenzní reakce vyžadují značné množství výchozí DNA, jsou genotypované úseky *TLR* nejdříve amplifikovány z genomické DNA pomocí polymerázové řetězové reakce. Jako výchozí postačuje genomická DNA izolovaná z krve (čerstvé i skladované v zmrazeném stavu), insemináčnických dávek či vzorků pevných tkání jakýmkoliv ze standardních postupů v koncentraci nejméně 2 ng/μL. Osvědčil se postup izolace na mikrokolonkách s křemičitou membránou NucleoSpin firmy Macherey-Nagel či izolace na magnetických částicích MagSep Blood či MagSep Tissue firmy Eppendorf s použitím automatické pipetovací stanice EpMotion M5073.

Přehled amplifikačních reakcí, které pokrývají genotypované úseky jednotlivých genů, je v tab. 2. Ověřené podmínky amplifikační reakce jsou následující: reakce o objemu 10 μL ve zkumavce 0,2 mL (či jamce PCR mikrodestičky), která obsahuje 0,03 U/μL Taq polymerázy v 10 mM Tris, pH 8.8, 50 mM KCl, 0.08% Nonidet, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.4 μM každého ze dvou amplifikačních primerů a 0.5 ng/μL genomické DNA, je inkubována na termocykléru Mastercycler (Eppendorf Czech & Slovakia) s programem, který zahrnuje 95 °C 3 min, 5x 95 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s, dále 38x 95 °C 30 s, 60 °C 30 s a 72 °C 30 s a dodatečný extenzní krok 72 °C po dobu 6 min a zchlazení produktů reakce na 4 °C. Reakce jsou zavíčkované v mikrozkuhavkách či prováděné v destičkách pro PCR utěsněných spolehlivou membránou (např. KRD, adhezivní fólie kat. č. 4ti-0500).

**Tabulka 2. Amplifikované úseky antibakteriálních genů pro genotypovací reakce**

Gen	Označení fragmentu	Začátek fragmentu*	Konec fragmentu*	Délka produktu (párů bazí)	Přímý primer - označení	Přímý primer – sekvence 5'→3'	Zpětný primer - označení	Zpětný primer – sekvence 5'→3'	Vazebné teploty v PCR (°C)
<i>TLR1</i>	fr1_1	196	1361	1166	1_1F	ATGCCTGACATCCTCTCACT	1_1R	AGAACCTTGATCTGAGGAGGT	62/60
<i>TLR1</i>	fr1_2	992	2186	1195	1_2F	TGACCCAGGAAATGAAGTCT	1_2R	CCGTGTTAATGTATTCTGCTG	62/60
<i>TLR2</i>	fr2_1	1	816	816	2_1F	TCCTGCTCCATATTCCTACG	2_1R	TGACTGTGTTTGACATCATGG	62/60
<i>TLR2</i>	fr2_2	556	1223	668	2_2F	CTCATTCATTTATGGCTGGC	2_2R	GACCTGAACCAGGAGGATG	62/60
<i>TLR2</i>	fr2_3	911	1726	816	2_3F	CGGAAGGAGCCTCTGACCAGGCT	2_3R	CATGGGTACAGTCATCAAACTC	62/60
<i>TLR2</i>	fr2_4	2206	2935	730	2_4F	AGTTTAACCCAGTGCCTTCC	2_4R	TGGAGTCAATGATGTTGTCCG	62/60
<i>TLR4</i>	fr4_1	-3	657	661	4_1F	CCAGGGTATTTTGTATGGCTGGAACAT	4_1R	TGTTTGCAAATGAACCTAACCA	62/60
<i>TLR4</i>	fr4_2	4999	5382	384	4_2F	TCTTTGCTCGTCCCAGTAGC	4_2R	AAGTGAATGAAAAGGAGACCTCA	62/60
<i>TLR4</i>	fr4_3	7941	9154	1214	4_3F	GGAGACCTAGATGACTGGGT TG	4_3R	AAGACAATGCGGATGTTGGT	62/60
<i>TLR4</i>	fr4_5	9684	-	737	4_5F	GTCACTGTGCTCCTGGTGTCTC	4_5R	CTATAGGGCTCGCGTACCAC	64/62
<i>TLR6</i>	fr6_1	774	1573	800	6_1F	ACTACCCATTGCTCACTTGC	6_2R	CTATACTCCCAACCCAAGAGC	62/60

\*Polohy fragmentů jsou stanoveny podle referenčních sekvencí FJ147090 (*TLR1*), EU746465 (*TLR2*), AC000135.1 (*TLR4*) a AJ618974 (*TLR6*).

V dalším kroku jsou produkty PCR reakcí sdruženy do multiplexních genotypovacích reakcí podle následujícího klíče: multiplex A - fr1\_1, 1\_2, 6\_1, multiplex B - fr2\_1, 2\_2, 2\_3 a 2\_4, multiplex C - fr4\_1, 4\_2, 4\_3 a 4\_5. V následujícím kroku jsou opracovány směsí exonukleázy a fosfatázy (EXOSAP), která



odstraňuje přebytečné amplifikační primery a deoxynukleotidtrifosfáty a zabraňují tak jejich přenosu do následující reakce extenze primeru. Osvědčilo se přidání 2 µL termosenzitivní alkalické fosfatázy FastAP, 1 U/µL (Fermentas, Vilnius, Litva, kat. č. EF0651) a 1 µL exonukleázy I, 20 U/µL (Fermentas, k.č. EN0581). Po důkladném promíchání jsou vzorky inkubovány 1/2 h při 37°C v inkubační destičce PCR cykléru a následně jsou enzymy inaktivovány zahřátím na 85°C po dobu 15 min.

Tři µL vyčištěného smíšeného PCR produktu je použito pro reakci extenze primeru v nové mikrozkumavce či na nové PCR destičce po přidání 5 µL reakční směsi SNaPshot (Life Technologies) a 2 µL genotypovacích extenzních primerů v koncentraci 0,1 µM. Následně je směs inkubována na PCR cykléru při programu odvozeném ze standardního programu pro použití soupravy SNaPshot. Program zahrnuje 25 cyklů s kroky 96 °C po dobu 10 s, 50 °C 5 s, 60 °C 30 s a následně zchlazení na 4 °C.

Extenzní primery jsou navrženy tak, že těsně přiléhají k variabilnímu nukleotidu (Tab. 3). Termostabilní DNA polymeráza katalyzuje připojení pouze jednoho dideoxynukleotidu ze čtyř značených dideoxynukleotid trifosfátů zastoupených v reakční směsi. Tím je přítomná varianta jednoznačně určena typem fluorescenčního značení fluorofory dR110, dRGG, dTAMRA a dROX.

Po reakci je směs SNaPshot opět čistěna FastAP v množství 1 µL /reakci, po promíchání inkubována při 37°C a inaktivována při 85°C po dobu 15 min. Dva µL produktů extenzní reakce jsou použity pro přípravu vstupního vzorku pro fragmentovou analýzu na kapilárním sekvenátoru ABI PRISM 3130 či obdobném zařízení. Po přidání 7,5 µL vysoce čistého formamidu (Applied Biosystems) a směsi standardů molekulových hmotností značených fluoroforem LIZ (GeneScan LIZ-120, Applied Biosystems) jsou produkty děleny v kapilárách o délce 360 mm obsahujících polymer POP-7. Na rozdíl od aplikací sekvenování DNA a mikrosatelitní analýzy je zcela nezbytné použít sadu detekčních filtrů E5 po kalibraci matricovým standardem DS-02.

Protože hmotnosti produktů v multiplexovaných reakcích jsou odstupňovány po 5 nukleotidech přidáním polyT na 5' konec, lze produkty z několika reakcí určovat současně v jednom vzorku na jedné kapiláře. Protože extenzní primery jsou u jednotlivých SNP navrženy jak po směru + vlákna, tak i v protisměru, je tuto okolnost třeba vzít v úvahu při odečtu výsledků. Zatímco produkty přímých primerů (značených písmenem F v názvu) jsou odečítány bez úprav, viditelné barevné kanály produktů reverzních primerů je třeba změnit na komplementární nukleotidy (G<->C, A<->T).

**Tabulka 3. Extenzní primery a multiplexy genotypovacích reakcí pro varianty v antibakteriálních genech TLR**

Gen	Poloha polymorfismu	Referenční sekvence	Referenční primer	Extenzní primer - sekvence 5'→3'	Průměr (µm)	Typ
<i>TLR1</i>	fr1_1	798C>T	T798R	CGCCAAACCAACTGGAGGATCGT	23	AM1
<i>TLR1</i>	fr1_2	1762G>A	T762R	(T5)CAGCCCAGGGACCACAATGGTGA	28	AM2
<i>TLR1</i>	fr1_2	2097T>C	T097R	(T7)CTCTGGACAAAGTTGGGAGACAAGAC	33	AM3
<i>TLR6</i>	fr6_1	855G>A	T855F	(T10)CCCAAATAGCTTTTTCTCTGTCCAAGTG	38	AM4
<i>TLR2</i>	fr2_1	513C>T	T513F	CCAGTCCTTGGGGTCACAAAGAGT	24	BM1
<i>TLR2</i>	fr2_2	1047T>G	T047R	(T1)GCAGGTCTCTGTTGCYGCATAGGTGAT	29	BM2
<i>TLR2</i>	fr2_3	1313G>A	T313R	(T7)CTGTTACTATTTCTACTTTTAGGGTC	34	BM3
<i>TLR2</i>	fr2_4	2546G>A	T546F	(T16)GGTCGACTGGCCCGATGACTACC	39	BM4
<i>TLR2</i>	fr2_4	2565T>C	T565F	(T20)CTACCRCTGTGACTCTCCCTCCCA	44	BM5
<i>TLR4</i>	fr4_1	245G>C	T245F	CTTCTTCTCCTCTAACTTCCCCTC	25	CM1
<i>TLR4</i>	fr4_2	5087A>G	T087F	(T5)GCTAAGGTGCATGCAGGAAGACACC	30	CM2
<i>TLR4</i>	fr4_3	7999A>G	T999F	(T11)GGTTTCCTATTTCAGCAGAAATATT	35	CM3
<i>TLR4</i>	fr4_3	8885A>G	T885F	(T15)GCACTTTTACTGAGTTTCAGCTACC	40	CM4
<i>TLR4</i>	fr4_5	9787C>T	T787F	(T20)CAAAAGTATGGCAGGGGCGAGAGCA	45	CM5

\*Polohy polymorfismu jsou stanoveny podle referenčních sekvencí FJ147090 (TLR1), EU746465 (TLR2), AC000135.1 (TLR4) a AJ618974 (TLR6).

Výsledné elektroferogramy lze vyhodnotit jak licenčním programem GeneMapper od výrobce kapilárních sekvenátorů Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific), tak i volným programem PeakScanner, který je rovněž distribuovaný Applied Biosystems a vyhovuje pro menší série vzorků.

### 2.3. Vlastnosti variant imunitních genů

Seznam genotypovaných variant se známými či předpovězenými funkčními následky pro imunitu a zdravotní stav je uveden v tab. 4. V některých případech je brán v potaz výskyt genotypované varianty v jednom haplotypu s funkčně významnými variantami, což umožňuje jejich sledování v populaci. Klíčové pro rozeznávání molekul patogenů jsou oblasti bohaté na leucin, tzv LRR ("leucine-rich repeats"), takže lokalizace mutací těchto oblastech je spojována se změnou funkce receptoru.

Polymorfismy v genu *TLR5* nebyly genotypovány vzhledem k nedostatku údajů o efektu jednotlivých variant a vzhledem k otázkám kolem úlohy tohoto genu u skotu.

Dopad změn v bílkovině v důsledku mutace byl hodnocen v programech Variant Effect Predictor (VEP, MacLaren et al. 2012) a SIFT ("Sorting Intolerant from Tolerant", Sim et al. 2012) na serveru <https://www.ensembl.org/vep>.

**Tab. 4. Známé efekty určovaných variant genů TLR**

Gen	Identifikátor SNP	Chromozóm _poloha	Poly-morfismus*	Amino-kyselina	Předpověď účinku**	Efekty	Zdroj
<i>TLR1</i>	rs43702940	6_59688857	798C>T	Phe201Phe	modifikátor	negativně testováno na vztah k TBC	Sun et al. 2012
						ve vazbě s -79T>G, kde TT snižuje výskyt klinických mastitid (Russell et al. 2012)	Russell et al. 2012
						zřejmě vazba s 853G>A (Val220Met), který je aktivní proti MAP u skupiny plemen	Mucha et al. 2009
<i>TLR1</i>	rs210538093	6_59687893	1762G>A	Ile523Val (AG)	modifikátor	G varianta kóduje místo isoleucinu valin, který narušuje transmembránovou oblast bílkoviny	Russell et al. 2012
						větší náchylnost k boviní TB u genotypů AA a AG u holštýnů	Sun et al. 2009
<i>TLR1</i>	rs109456287	6_59687558	2097T>C	Phe634Phe	mírný efekt, tolerance (0,88)	mutace nemění protein, ale ve vazbě s 2463C>T v 3' nepřekládané oblasti, který má vliv na klinickou mastitidu	Russell et al. 2012
<i>TLR6</i>	rs43702941	16_59706074	855G>A	Asp/Asn	mírný efekt, tolerance (0,88)	zvyšuje náchylnost k paratuberkulóze	Fisher et al. 2011
<i>TLR2</i>	ss104796303	17_3953532	513C>T	5'-nepřekládaná oblast		zvyšuje náchylnost k paratuberkulóze	Fisher et al. 2011
<i>TLR2</i>	rs55617172	17_3952998	1047G>T	Glu63Asp	narušuje LRR1, malý efekt	zvyšuje náchylnost k boviní tuberkulóze	Bilgen et al. 2016, Bhaladhare et al. 2016
<i>TLR2</i>	rs43706434	17_3952732	1313G>A	Arg152Gln	narušuje LRR5, mírný efekt, tolerován	zvyšuje náchylnost k boviní tuberkulóze	Bilgen et al. 2016, Bhaladhare et al. 2016
						ve vazbě se sousedními s43706433 a rs110491977, které jsou spojeny s rezistencí k paratuberkulóze	Fisher et al. 2012
						součást haplotypu TLR2 zvyšujícího náchylnost k paratuberkulóze	Ruiz-Larrañaga et al. 2011

<i>TLR2</i>	rs68268260	17_3951499	2546G>A	Arg563His	narušuje LRR20, narušuje funkci	opakovaně předpovězen efekt na imunitní receptor	Bilgen et al. 2016, Seabury et al. 2010, Fisher et al. 2011
<i>TLR2</i>	ss104796325	17_3951480	2565T>C	His569His	nízký efekt	alela C spojena s náchylností k paratuberkulóze, v homozygotním i heterozygotním stavu	Koets et al. 2010
						součást haplotypu náchylného k paratuberkulóze společně se sousedním SNP rs6826825 (Phe550Phe), který byl rovněž asociován s náchylností k PTB	Ruiz-Larrañaga et al. 2011, Koets et al. 2010
						alela T je součástí příznivé kombinace šesti genů pro rezistenci k PTB	Juste et al. 2018
<i>TLR4</i>	rs29017188	8_108829143	245G>C	před začátkem genu, mění expresi	modifikátor	zřejmě mění expresi genu	Sharma et al. 2008
						náchylnost k paratuberkulóze spojována s C alelou	Ruiz-Larrañaga et al. 2011
<i>TLR4</i>	rs8193046	8_108833985	5087A>G	intron	modifikátor	náchylnost k paratuberkulóze	Ruiz-Larrañaga et al. 2011
<i>TLR4</i>	rs43578100	8_108836897	7999A>G	intron	modifikátor	náchylnost k paratuberkulóze	Ruiz-Larrañaga et al. 2011
<i>TLR4</i>	rs8193054	8_108837783	8885A>G	Pro373Pro	nízký efekt	diagnostický SNP (tagSNP) v oblasti 5 SNP se záměnami aminokyselin, které snižují odolnost k paratuberkulóze	Mucha et al. 2009
<i>TLR4</i>	rs8193069	8_108838685	9787C>T	T674I	mírný efekt, tolerance (0,28)	náchylnost k PTB	Fisher et al. 2011
						pozitivní efekt na obsah bílkovin a tuku u holštýnů	Beecher et al. 2010

\* Polohy polymorfismu jsou stanoveny podle referenčních sekvencí FJ147090 (*TLR1*), EU746465 (*TLR2*), AC000135.1 (*TLR4*) a AJ618974 (*TLR6*).

\*\* Hodnocení mutace podle programů VEP a SIFT.

Naprostá většina publikovaných údajů se vztahuje k odolnosti vůči mykobakteriálním infekcím (PTB, TBC) či mastitidám. Je třeba je považovat za modelové infekce grampozitivními či gramnegativními bakteriemi. Lze předpokládat, že vzhledem k obecné úloze Toll-like receptorů se bude efekt projevovat i u příbuzných bakteriálních původců.

Nakolik je určitá mutace zastoupena v domácích populacích mléčného skotu v porovnání se světovými zdroji, či zda je možná introgrese z genetických zdrojů lze zhodnotit na základě tabulky 5.

Údaje pro domácí populace vycházejí ze zastoupení sekvencí příslušných alel ve směsných vzorcích ze sekvenování nové generace na pracovišti molekulární genetiky VÚŽV. Bylo použito jak sekvenování

genových fragmentů získaných podle tab. 2 technologií Pacific Biosciences, tak i sekvenování pomocí technologie Hiseq. Uvedené frekvence jsou průměrem údajů získaných pomocí obou metod.

**Tabulka 5. Známé zastoupení určovaných variant *TLR* genů v populacích skotu**

Gen	Identifikátor SNP	Polymorfismus*	Frekvence					Výskyt u dalších plemen†
			ČESTR	ČESTR - genetické zdroje	Česká červinka	Panel světových plemen**	Panel evropských plemen***	
<i>TLR1</i>	rs43702940	798C>T	0,525	0,604	0,050	0,448	-	(T) Bd, Bn, Ch, N (T/C) An, Hn, L, Ro
<i>TLR1</i>	rs210538093	1762G>A	0,629	0,767	0,050	0,3	-	(G/A) An, L, N, Ro (G) P
<i>TLR1</i>	rs109456287	2097T>C	0,000	0,054	0,017	-	-	-
<i>TLR6</i>	rs43702941	855G>A	0,247	0,098	0,409	0,37	0,52	(A) Bd, Bn, N (G/A):An, Ch, Hn, L
<i>TLR2</i>	ss104796303	513C>T	0,03	0	0	-	-	(T/C) An
<i>TLR2</i>	rs55617172	1047G>T	0,000	0,000	0,143	0,41	-	(T) An, Hn (T/G) Bd, Bn, Ch, L, P
<i>TLR2</i>	rs43706434	1313G>A	0,178	0,240	0,131	0,888	0,11	(G/A) Ro
<i>TLR2</i>	rs68268260	2546G>A	0,291	0,000	0,000	0,868	-	(A) N (G/A) Bd, Bn
<i>TLR2</i>	ss104796325	2565T>C	0,500	0,250	0,111	-	-	(C) N (C/T) Bd, Bn, Ro
<i>TLR4</i>	rs29017188	245G>C	0,212	0,467	0,471	-	-	-
<i>TLR4</i>	rs8193046	5087A>G	0,254	0,519	0,553	0,645	-	-
<i>TLR4</i>	rs43578100	7999A>G	0,246	0,417	0,446	-	-	-
<i>TLR4</i>	rs8193054	8885A>G	0	0	0	-	-	-
<i>TLR4</i>	rs8193069	9787C>T	0,000	0,150	0,018	0,174	0,12	-

\* Polohy polymorfismu jsou stanoveny podle referenčních sekvencí FJ147090 (*TLR1*), EU746465 (*TLR2*), AC000135.1 (*TLR4*) a AJ618974 (*TLR6*).

\*\* V panelu 26 taurinních plemen (Seabury et al. 2010) nebo 10 plemen (Seabury and Womack 2008)

\*\*\* V panelu 16 evropských plemen (Mariotti et al. 2009)

† Výskyt u dalších plemen podle Seabury a Womack 2008. An, Angus; Bd, Braford; Bn, Brahman; Ch, Charolais; Hn, Holstein; L, Limousin; N, Nelore; P, Piedmontese; Ro, Romagnola.

### 3. Novost postupu

V současné době není k dispozici obdobná metodika pro genotypování variant genů spojených s přirozenou imunitou u skotu. Geny přirozené imunity nejsou přímo zahrnuty ani do základního genotypovacího čipu firmy Illumina (BovineSNP50v3 BeadChip), který jinak diagnostikuje 54000 SNP. Nejrozsáhlejší obdobný systém pro genotypování variant TLR byl vyvinut katedrou veterinární patobiologie na Texas A&M University v USA (Seabury et al. 2010, Fisher et al. 2011) a pokrýval 240 variant ve všech deseti TLR genech. Nicméně systém se nedočkal komerčního rozšíření a ani nebyl v plném rozsahu publikován.

Na druhou stranu lze konstatovat výrazný celosvětový trend v posledních dvou letech na tvorbu indexů infekční odolnosti pro skot a jejich použití paralelně s klasickými selekčními indexy. Např. firma Zoetis v r. 2018 uvedla selekční index DWPS, kde jsou produkční znaky zastoupeny pouze 32% a ostatní lze považovat za znaky zdraví či welfare. Obzvláště je trend patrný u nového indexu CW\$ pro telata, který je plně složen ze zdravotních ukazatelů. Nicméně oba jsou založené na nepřímém genotypování pomocí obecných markerů, které jsou redukovanou reprezentací celé variability zdravotních genů. I když indexy mají zahrnout i dodatečně mapovanou variabilitu zdravotních genů, jejich podíl a konkrétní SNP nejsou v současné době známy.

Je třeba si uvědomit, že použití mikroarray a genotypování s vysokou kapacitou vyžaduje vysoké startovací náklady. Řešení podle metodiky je kompromisem mezi genotypováním s nízkou a s vysokou kapacitou při zachování přijatelných nákladů na reakci, nízkých startovacích nákladů a vysoké flexibility systému, který dovoluje průběžné úpravy a změny podle výsledků validace a dalších nových poznatků. Předpokládá se doplňování validovaných markerů ve formě pravidelných aktualizací na stránkách VÚŽV.

Lze konstatovat, že v současné době není variabilita TLR a navazujících genů v selekci skotu aplikována komerčně nikde v ČR ani v zahraničí. Na druhou stranu je vztah mezi diverzitou systému přirozené imunity a zdravotním stavem intenzivně sledován v řadě světových projektů, jejichž zveřejněné výsledky jsou zahrnuty v tab. 4.

## 4. Uplatnění metodiky

Předpokládá se, že metodika bude využita v laboratorním servisu pro šlechtitelskou, plemenářskou a konzultační práci v chovu dojeného skotu. Uživatelé metodiky mohou být oprávněné organizace, svazy chovatelů skotu, Česká plemenářská inspekce a široká chovatelská veřejnost. Metodika bude uváděná do praxe prostřednictvím VÚŽV v.v.i., ČMSCH a.s. a dalších spolupracujících subjektů s oblasti chovu skotu.

Předpokládá se, že objednateli genotypování mohou být i chovatelé, kteří plánují ozdravení chovu pomocí zvýšení infekční odolnosti. Vzhledem k tomu, že přístup by měl zvýšit welfare zvířat a snížit spotřebu antibiotik, lze zvýšení infekční odolnosti prostřednictvím šlechtění považovat za součást snahy o trvale udržitelné zemědělství.

Monitorování a udržování dostatečné diverzity, i bez cíleného šlechtění, má zásadní význam pro populační odolnost v případě nestandardních epizootií v budoucnu. Dostatečně diverzifikované populace z hlediska rozpoznávaných patogenů a intenzity odpovědi dovolují předpokládat pomalejší šíření infekce v rámci populace a větší pravděpodobnost jejího utlumení.

## 5. Ekonomické aspekty

*5.1. Odhad nákladů (v tis. Kč) na zavedení postupů uvedených v metodice a odhad ekonomického přínosu (v tis. Kč) pro uživatele*

Materiálové náklady lze v souladu s předběžnou kalkulací odhadnout na 600 Kč při diagnostice všech 14 polymorfismů v rámci 4 antibakteriálních genů TLR u jednoho zvířete. Mzdové náklady dále na částku 800 Kč při spotřebě 1/2 pracovního dne. V součtu tyto náklady činí 100 Kč na určení jednoho polymorfismu.

Náklady nižší než jsou obvyklé pro nízkokapacitní genotypování jsou možné díky sdružení reakcí (multiplexování).

Další snížení nákladů a pracnosti je možné při sériovém zpracování vzorků více zvířata na mikrodestičkách s kapacitou pro 96 multiplexních reakcí, čili 32 zvířat.

Materiálové náklady lze snižovat až na polovinu proporcionální redukcí reakčních objemů, nicméně nižší spolehlivost reakcí v nižších objemech vede k nezbytnosti replik a tím další snižování nákladů blokuje.

Přínos pro uživatele lze odhadnout na základě očekávaného ozdravení stád. V případě genotypování býků s náklady 1000 - 2000 Kč na jedno zvíře jsou náklady na jednu dojnici pod 100 Kč čili pod 1% ztrát, způsobovaných samotnými mastitidami. Proto by mělo být genotypování imunitních genů pro plemenářské firmy a pro chovatele rentabilní. Přesné zhodnocení je možné až na základě rozsáhlé zdravotní statistiky a jejího převedení do ekonomických ukazatelů.

## 6. Seznam použité související literatury

- Beecher C., Daly M., Childs S., Berry D.P., Magee D.A., McCarthy T.V., Giblin L. (2010) Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. *BMC Genetics* 11:99.
- Bhaladhare A., Sharma D., Kumar A., Sonwane A. (2016) Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes and case-control association studies with bovine tuberculosis. *Veterinary World* 9:458–464.
- Bilgen N., Kul B.C., Offord V., Werling D., Ertugrul O. (2016) Determination of genetic variations of Toll-like receptor (TLR) 2, 4, and 6 with next-generation sequencing in native cattle breeds of Anatolia and Holstein Friesian. *Diversity* 8:23.
- 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. (2011) Evolution of the bovine *TLR* gene family and member associations with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Plos One* 6:11.
- Hoogendoorn B., Owen M.J., Oefner P.J., Williams N., Austin J., O'Donovan M.C. (1999). Genotyping single nucleotide polymorphisms by primer extension and high performance liquid chromatography. *Human Genetics* 104:89–93.
- Juste R.A., Vazquez P., Ruiz-Larrañaga O., Manzano M.I.C. (2018) Association between combinations of genetic polymorphisms and epidemiopathogenic forms of bovine paratuberculosis. *Heliyon* 4: e00535.
- Koets A., Santema W., Mertens H., Oostenrijk D., Keestra M., Overdijk M., Labouriau R., Franken P., Frijters A., Nielen M., V. Rutten V. (2010) Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Preventive Veterinary Medicine* 93:305-315.
- Kvapilík J. (2014) Mastididy u dojených krav a výrobní ztráty. *Veterinářství*. 64:550-560.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffman J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Mariotti M., Williams J.L., Dunner S., Valentini A., Pariset L. (2009) Polymorphisms within the Toll-like receptor (*TLR*)-2, -4, and -6 genes in cattle. *Diversity* 1:7-18.
- McLaren W., Gil L., Hunt S.E., Riat H.S., Ritchie G.R., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. (2016) The Ensembl variant effect predictor. *Genome Biology* 17:122.
- Mucha R., Bhide M.R., Charkurkar E.B., Novak M., Mikula I., Sr. (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* 128:381-388.
- Novák K. (2014) Functional polymorphisms in Toll-like receptor genes for innate immunity in farm animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2:1-11.
- 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* 94:3635-3641.
- 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* 43:17.
- 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* 90:502-515.
- Seabury C.M., Seabury P.M., Decker J.E., Schnabel R.D., Taylor J.F., Womack J.E. (2010) Diversity and evolution of 11 innate immune genes in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107:151-156.
- 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. *Dairy Science* 89:3626-3635.
- Sim N.L., Kumar P., Hu J., Henikoff S., Schneider G., Ng P.C. (2012) SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research* 40:W452–W457.

- 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* 147:195-201.
- Vychodilová-Křenková L., Matiašovič J., Hořín P. (2005) Single nucleotide polymorphisms in four functionally related immune response genes in the horse: *CD14*, *TLR4*, *Cε*, and *Fcε R1 alpha*. *International Journal of Immunogenetics* 32:277-283.
- White S.N., Taylor K.H., Abbey C.A. (2003) Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100:10364-10369.
- Zavadilová L., Wolf J., Štípková M., Němcová E., Jamrozik J. (2011) Genetic parameters for somatic cell score in the first three lactations of Czech Holstein and Fleckvieh breeds using a random regression model. *Czech Journal of Animal Science* 56:251-260.

## 7. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Novák K., Pikousová J., Czerneková V., Mátlová V. (2017) Diversity of the TLR4 immunity receptor in Czech native cattle breeds revealed using the Pacific Biosciences sequencing platform. *Animal Biotechnology*, DOI 10.1080/10495398.2017.1279170.
- Novák, K. (2014): Functional polymorphisms in Toll-like receptor genes for innate immunity in farm animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2: 1-11.

- Vydal:** Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.  
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves
- Název:** LABORATORNÍ URČOVÁNÍ FUNKČNÍCH VARIANT V GENECH *TLR*  
PŘIROZENÉ IMUNITY SKOTU
- Autor:** prom. biol. Karel Novák, CSc. (podíl práce ... %)  
RNDr. Vladimíra Czerneková, Ph.D. (podíl práce ... %)  
Dr. Ing. Jitka Kyselová (podíl práce ... %)  
Ing. Marek Bjelka, Ph.D. (podíl práce ... %)
- Oponenti:** **prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.**  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
- Ing. Zdenka Majzlíková**  
Česká plemenářská inspekce, Praha
- ISBN** 978-80-7403-211-0
- Dedikace:** Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu "Výskyt genetických faktorů pro infekční odolnost u vybraných plemen mléčného skotu" QJ1610489.

**Odkaz na internetové stránky, kde je metodika k dispozici v pdf:** [www.vuzv.cz](http://www.vuzv.cz)



Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.

Přátelství 815

104 00 Praha Uhřetěves

[www.vuzv.cz](http://www.vuzv.cz)