

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Molekulární markery mutací genu FGF5 zodpovědných za
dlouhou srst u plemene československý vlčák a možnosti
jejich aplikace v plemenitbě**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Klára Krausová

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Molekulární markery mutací genu *Fgf5* zodpovědných za dlouhou srst u plemene československý vlčák a možnosti jejich aplikace v plemenitbě" 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 13. 4. 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce doc. Dr. Ing Pavlu Vejlovi za odborné vedení této diplomové práce, zejména za cenné rady, čas a trpělivost. Ing. Daniele Čílové bych ráda poděkovala za cenné připomínky a konzultace, nejen při laboratorním výzkumu.

Molekulární markery mutací genu *FGF5* zodpovědných za dlouhou srst u plemene československý vlčák a možnosti jejich aplikace v plemenitbě

Souhrn

V diplomové práci byla řešena problematika kauzálních mutací genu *Fgf5*, které ovlivňují délku srsti u modelové populace československých vlčáků

Gen *Fgf5* má tři dobře zmapované exony a velmi dlouhé sekvence intronů. U Canidae je lokalizován na chromozomu 32. Gen *Fgf5* je exprimován v podobě proteinu FGF5, jehož funkcí je regulace růstu chlupového folikulu a vlasového vlákna. Mutací v genu *Fgf5* dochází ke změně pořadí aminokyselin, a tím konformační změně proteinu FGF5, který tak ztrácí svou funkci, následkem čehož dochází k nadměrnému růstu vlasových vláken. Gen *Fgf5*, společně s kauzálními mutacemi, které mají za následek efekt prodloužení délky vlasového vlákna, byl popsán u mnoha živočišných druhů.

Plemeno československý vlčák má standardně krátkou srst, a mutace genu *Fgf5* má za následek nestandardní dlouhou srst. V posledních letech se v populaci československého vlčáka rodí více štěňat s dlouhou srstí než v minulosti. Z těchto důvodů bylo plemeno označeno jako vhodná modelová populace pro detekci kauzálních mutací v genu *Fgf5*.

Československý vlčák je mladé plemeno, u kterého je podrobně zpracována rodokmenová databáze. V této databázi je možno dohledat rodokmeny jednotlivých linií až k původnímu křížení karpatského vlka s německými ovčáky, o kterých se předpokládá, že byli potenciaálními nosiči mutace. Tento předpoklad byl ověřován vyloučením mutace genu *Fgf5* jako mutace *de novo*.

Pro analýzu bylo použito 185 fen a 198 psů plemene československý vlčák, ve věku 1-251 měsíců, z různých zemí.

Pro analýzu byla využita genomická DNA z buněk bukalních sliznic. Na základě známé genomické sekvence *Canis lupus familiaris* byly navrženy dva molekulární markery umožňující detekci substituční mutace FGF5:c.284G>T a indelové mutace FGF5:c.145_150dupACCAGC. Byla potvrzena kauzalita obou mutací. Bylo prokázáno, že českoslovenští vlčáci nesoucí substitučně mutovanou alelu současně nenesou 6 bp duplikaci v exonu 1 genu *Fgf5*.

Výsledky genotypizace byly zpracovány z hlediska populační genetiky. Byla stanovena pozorovaná a očekávaná heterozygotnost. Koeficient inbreedingu z pohledu mutací genu *Fgf5* byl stanoven jako velice nízký. Z dat molekulární a populační analýzy byla stanovena prognóza vývoje frekvence mutované alely v populaci. V případě úplné selekce vůči recesivním homozygotům se má dle této prognózy frekvence mutované alely snižovat. Pro pokles frekvence mutované alely na 1 % bude zapotřebí alespoň 83 generací úplné selekce.

Poměr výskytu mutované a nemutované alely byl statisticky hodnocen pomocí χ^2 testu, s cílem odhalit vliv stáří, pohlaví a původu hodnocených zvířat na segregaci těchto alel. Tato statistická analýza odhalila, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existují rozdíly v poměru mutované a nemutované alely mezi vytvořenou kategorií českých a slovenských psů a kategorií psů pocházejících z ostatních zemí.

Získaná molekulární data byla porovnána s genealogickými záznamy v mezinárodní databázi plemene československý vlčák. Na základě srovnávací analýzy byla potvrzena hypotéza, že s vysokou pravděpodobností je donorem mutované alely genu *Fgf5* jediný zástupce plemene německý ovčák (Bojar vom Schoterrhorf), který se podílel na vzniku plemene.

Klíčová slova: *Canis lupus familiaris*, československý vlčák, délka srsti, FGF5, fibroblastový růstový faktor 5, genotypizace

Molecular markers of *FGF5* gene mutations responsible for long hair in the Czechoslovakian Wolfdog breed and their application in breeding

Summary

The issue of causal mutation in gene *Fgf5*, which affect the length of coat in model population of the Czechoslovakian Wolfdog, was studied in this diploma thesis.

Gene *Fgf5* has three well mapped exons and long sequences of introns. In the Canidae family is this gene located on chromosome 32. Gene *Fgf5* is expressed in the form of protein FGF5, which has regulation effect on the hair follicle and hair strand development. Mutation in gene *Fgf5* leads to change of amino acids, which leads to change of protein conformation and loss of his regulation function, and the hairs uncontrollably grow. Gene *Fgf5*, along with casual mutations leading to prolonging the hair strand, was observed and described among many species.

The Czechoslovakian Wolfdog breed has standard short hair and the mutation in gene *Fgf5* leads to nonstandard long hair. More long-haired dogs were born in the population of the Czechoslovakian Wolfdog in past few years. According to those facts was this breed pointed as suitable model population for the gene *Fgf5* causal mutation detection.

The Czechoslovakian Wolfdog is a young breed with well sustained genealogy database. In this database is possible to find the bloodline of specific dog ancestries up to the original breeding of the Carpathian wolf and the German Shepherd. The German Shepherd is considered as potential bearer of the mutation. This assumption was verified by eliminating the *de novo* status of the mutation.

185 females and 198 males of the Czechoslovakian Wolfdog in age 1-251 months from different countries was used for the analysis.

For the molecular analysis genomic DNA, obtained from buccal mucous membrane cells, was used. Molecular markers for detecting the substitute mutation FGF5:c.284G>T and the indel mutation FGF5:c.145_150dupACCAGC were designed based on knowledge of gene sequence in *Canis lupus familiaris*. The causality of both mutations was confirmed. It was also confirmed, that the Czechoslovakian Wolfdog is bearer of those mutation, moreover the bearer of allele with substitute mutation lack the 6 bp duplication in exon 1 of gene *Fgf5*.

The results of genotyping were observed from the population genetics view. The observed and expected heterozygosity was set, along with the coefficient of inbreeding which

was calculated as low for the *Fgf5* mutation. Prognosis of the mutated allele frequency development was set from the molecular and population data. According to this prognosis the frequency of mutated allele will decrease in the presence of strong selection against recessive homozygotes. For decrease of the mutated allele frequency on 1 % would be needed 83 generations of strong selection.

The ratio of mutated and non-mutated allele occurrence was statistically evaluated by the χ^2 test, to detect the influence of age, gender and country of origin on the allele segregation. This statistic analysis, with significance level $\alpha=0,05$, proved existence of mutated and non-mutated allele ratio differences between adjusted category of Czech and Slovakian dogs and the category of dogs from other countries.

Obtained molecular data were compared to the genealogy records from international databases of the Czechoslovakian Wolfdog. The hypothesis of only one potential ancestral bearer of the *Fgf5* mutated allele was confirmed by the comparative analysis. The anticipated German Shepherd (Bojar vom Shcoterrhorf) participated on the origin of the Czechoslovakian Wolfdog breed.

Keywords: *Canis lupus familiaris*, Czechoslovakian Wolfdog, hair length, FGF5, fibroblast growth factor 5, genotyping

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Vědecká hypotéza a cíl práce.....	2
2.1	Vědecké hypotézy	2
2.2	Cíle práce	2
3	Literární rešerše.....	4
3.1	Československý vlčák	4
3.1.1	Linie a plemenitba	4
3.1.2	Genotyp.....	5
3.1.3	Plemenný standard.....	5
3.2	Délka srsti.....	5
3.2.1	Vývoj chlupového folikulu	5
3.2.2	Epidermální růstový faktor EGF.....	6
3.3	Folikulární růstový faktor FGF	7
3.3.1	<i>Fgf5</i> u myši (<i>Mus musculus</i>).....	8
3.3.2	<i>Fgf5</i> u psovitých (<i>Canidae</i>).....	9
3.3.3	<i>Fgf5</i> u kočky domácí (<i>Felis silvestris f. catus</i>).....	10
3.3.4	<i>Fgf5</i> u sudokopytníků (<i>Cetartiodactyla</i>).....	11
3.3.5	<i>Fgf5</i> u osla (<i>Asinus</i>).....	12
3.3.6	<i>Fgf5</i> u slonovitých (<i>Elephantidae</i>).....	12
3.3.7	<i>Fgf5</i> u kytovců (<i>Cetacea</i>).....	13
3.3.8	<i>Fgf5</i> u kura domácího (<i>Gallus gallus f. domestica</i>).....	13
3.3.9	<i>Fgf5</i> u člověka (<i>Homo sapiens sapiens</i>).....	13
3.4	Možnosti molekulární detekce mutací	14

3.4.1	Polymerázová řetězová reakce.....	14
3.4.2	Polymerázová řetězová reakce a štěpení restrikčním enzymem.....	15
3.4.3	Značení prostřednictvím genetických markerů.....	16
3.4.4	Elektroforetická separace nukleových kyselin na agarózovém gelu	16
3.4.5	Sekvenace	17
4	Materiál a metody	20
4.1	Gen <i>Fgf5</i> , F a R primery	20
4.2	Izolace DNA.....	20
4.3	Detekce mutace FGF5:c.284G>T v exonu 1 restrikčním štěpením.....	21
4.3.1	Restrikční enzym <i>PstI</i>	21
4.3.2	Složení premixu pro PCR	21
4.3.3	Program FGF284 a amplifikace DNA	22
4.3.4	Příprava agarózového gelu.....	22
4.3.5	Elektroforetická separace amplifikovaných fragmentů	23
4.3.6	Restrikční štěpení.....	23
4.4	Detekce mutace FGF5:c.140_150dupACCAGC v exonu 1 kapilární elektroforetickou separací	24
4.5	Sekvenační analýza exonu 1 genu <i>Fgf5</i>	26
4.5.1	Extrakce a purifikace vzorků z agarózového gelu	26
4.5.2	Sekvenační reakce.....	27
4.5.3	Purifikace produktů sekvenační reakce a jejich fragmentace kapilární elektroforetickou separací	27
4.5.4	Interpretace sekvenace	28
4.6	Statistické zpracování dat.....	28
4.7	Vyhodnocení frekvencí alel genu <i>Fgf5</i> z pohledu populační genetiky.....	29
4.7.1	Pozorovaná heterozygotnost (H_O).....	29
4.7.2	Očekávaná heterozygotnost (H_E).....	29

4.7.3	Stupeň inbreedingu (F_{IS})	29
4.7.4	Následky úplné selekce proti recesivně homozygotním jedincům	30
4.8	Genealogická studie	30
5	Výsledky	31
5.1	Navržení F a R primerů pro jednotlivé metody	31
5.1.1	Primery FGF5-284-F a FGF5-284-R pro restriční štěpení exonu 1	31
5.1.2	Primery FGF5-INDEL-F a FGF5-INDEL R pro fragmentační analýzu exonu 1	34
5.1.3	Primery FGF5-EXON1-F a FGF5-EXON1-R pro sekvenaci celého exonu 1	36
5.2	Detekce mutace FGF5:c.284G>T na exonu 1 restričním štěpením	38
5.3	Detekce mutace FGF5:c.145_150dupACCAGC v exonu 1 fragmentační analýzou	40
5.4	Porovnání výsledků restričního štěpení a fragmentační analýzy	42
5.5	Detekce mutací sekvenací analýzou celého exonu 1	42
5.6	Shrnutí poznatků molekulární detekce	45
5.7	Hodnocení výběrového souboru z hlediska populační genetiky	47
5.8	Statistické zpracování dat	48
5.9	Genealogická studie recesivních homozygotů a heterozygotů	52
6	Diskuze	56
7	Závěr	60
8	Použitá literatura	61
9	Internetové zdroje	70
10	Přílohy	72

1 Úvod

Československý vlčák byl jako oficiální plemeno uznán v roce 1989 mezinárodní kynologickou federací a zařazen do skupiny I. Ovčáčtí a honáčtí psi, sekce 1. – ovčáčtí psi s pracovní zkouškou. Po zániku Československa převzala plemeno Slovenská republika.

Vzhled československého vlčáka je fenotypově velmi podobný karpatskému vlku, jehož křížení s německým ovčákem dalo v roce 1955 vzniknout tomuto plemeni.

Jedním z hodnocených znaků, pro zařazení do chovu, je i srst. Netypická srst, odlišná od specifikované v plemenném standardu československého vlčáka, je důvodem pro vyřazení z chovu.

Netypickou srstí je i srst dlouhá, což je způsobeno mutací v genu *Fgf5*, jehož protein inhibuje růst chlupového folikulu a vlasového vlákna. Při mutaci dochází k záměně pořadí aminokyselin výsledného FGF5 proteinu, a tudíž jeho nesprávné funkci. Výsledkem je nestandardně dlouhá srst.

Tato mutace byla poprvé pozorována u myší, a v průběhu let popsána a detekována u mnoha dalších živočišných druhů.

Jelikož mutace vykazuje recesivní autozomální dědičnost, a nachází v jedné z exonových sekvencí genu, které jsou u genomu psa velmi dobře zmapované, byla tato mutace společně s dalšími polymorfismy navržena jako možné genové markery pro určení genotypu československého vlčáka.

Výskyt recesivních homozygotů s dlouhou srstí je malý, tudíž je i nízká segregace recesivní alely. Jak již bylo zmíněno, československý vlčák má svým fenotypem připomínat vlka, včetně krátké srsti. Z toho se usuzuje, že mutovanou alelu vnesl do populace jeden v německých ovčáků parentální generace, křížený s vlkem.

Z mezinárodních genových databází jsou volně dostupné sekvence genomu, společně s vybranými publikacemi o metodách analyzování příslušných genů.

Tato témata byla zpracována v literární rešerši, a následně byla vypracována vlastní metodika molekulární detekce mutace genu *Fgf5* zodpovědné za dlouhou srst u československého vlčáka. Současně byly tyto mutace využity jako markery pro zjištění genotypu výběrového souboru 383 československých vlčáků.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

2.1 Vědecké hypotézy

Před vypracováním diplomové práce byly stanoveny vědecké hypotézy na základě aktuálních poznatků o kauzálních mutacích v genu *Fgf5*, který prokazatelně ovlivňuje růst chlupových folikulů a vlasového vlákna u mnoha živočišných druhů. Vyslovené hypotézy jsou shrnuty v následujících bodech:

- Dlouhá srst u plemene československý vlčák vykazuje recesivní dědičnost a je podmíněna výskytem některé z doposud popsáných kandidátních mutací v genu *Fgf5*, který kóduje fibroblastový růstový faktor 5. Substituční a inserčně – deleční mutace mají charakter umožňující navržení vysoce specifických kodominantních markerů, prostřednictvím kterých lze identifikovat alelické kombinace.
- Frekvence výskytu recesivního znaku dlouhé srsti je v populaci československých vlčáků velmi nízká. Lze tedy předpokládat, že ancestrální mutovaná alela pochází z jednoho konkrétního německého ovčáka, který byl využit při vzniku plemene, tudíž je hypotetickým donorem kandidátní mutace.
- Plemeno československého vlčáka je poměrně mladé s velmi dobře zmapovanými rodokmeny jednotlivých linií použitých při plemenitbě. Proto lze předpokládat možnost výběru modelové populace československých vlčáků se známým genotypem, fenotypem a rodokmenem, prostřednictvím které bude možno zpětně identifikovat donora mutované alely genu *Fgf5*.

2.2 Cíle práce

Cíle diplomové jsou zaměřeny na potvrzení či vyvrácení hypotéz uvedených v předchozí kapitole 2.1. Tyto cíle jsou shrnuty v následujících bodech:

- Na základě předchozích studií a molekulárních dat databáze NCBI navrhnout primery pro amplifikaci exonu 1 genu *Fgf5*. Na získaných reprezentativních sekvencích detekovat kandidátní mutace popsáné u jedinců s dlouhou srstí, a ty pak následně porovnat se sekvencemi jedinců se standardní délkou srsti.
- Mutace FGF5:c.284G>T je typická pro ovčácká plemena psů. Na základě těchto znalostí navrhnout specifický PCR-RFLP.
- Navrhnout specifický In/Del marker pro mutaci FGF5:c.145_150dupACCAGC

- Genotypizace výběrového souboru populace československého vlčáka, minimálně o velikosti 300 jedinců, za využití navržených markerů a následná charakterizace výběrového souboru prostřednictvím statistických a populačně genetických parametrů.
- Prostřednictvím získaných dat a známých fenotypů odhalit genealogickou studií potenciálního donora mutovaných alel genu *Fgf5*.
- Navržení metodiky pro eliminaci výskytu mutované alely bez významného snížení genetické variability plemene.

3 Literární rešerše

3.1 Československý vlčák

Počátek plemene československého vlčáka je datován do roku 1955, kdy Ing. Karel Hartl započal výzkum křížení karpatského vlka a německého ovčáka. V roce 1958 byli úspěšně odchováni první kříženci vykazující fenotypové znaky vlka, což vedlo k myšlence o vyšlechtění nového pracovního plemene.

Odchov filiálních generací a jejich následné křížení s nepříbuznými jedinci plemene německý ovčák vedlo ke snížení zastoupení vlčího genotypu na 6,25 % ve čtvrté filiální generaci.

Do roku 1983 vzniklo několik linií nového plemene, následná plemenitba probíhala pouze v uzavřené populaci. Meziliniovní kříženci byli označováni jako český vlčák.

Československý vlčák byl uznán jako národní plemeno v roce 1982 tehdejším Federálním výborem chovatelských svazů ČSSR. Plemenný standard byl schválen mezinárodní kynologickou federací (FCI) v roce 1989 a potvrzení uznání plemene se uskutečnilo v roce 1999 (Hartl et Jedlička, 1996).

3.1.1 Linie a plemenitba

První linie československého vlčáka byla založena vlčicí Britou a německým ovčákem Cézarem z Březového háje, která dala vzniknout čtyřem filiálním generacím kříženců.

Druhá linie vlčice Brity a německého ovčáka Kurta z Václavky dala vzniknout dvěma filiálním generacím kříženců.

Třetí linie vznikla spojením vlka Arga s fenou německého ovčáka Astrou z SNB, která dala vzniknout dvěma filiálním generacím kříženců.

Další líne vznikly přilitím krve, a to konkrétně pářením vlka Šarika s potomky předchozích křížení, jmenovitě s fenou Xelou z Pohraniční stráže a Urtou z Pohraniční stráže.

Nedodržením chovného programu došlo v letech 1982-1983 k výraznému zvýšení ibredního koeficientu, kdy bylo 77 % slovenských vrhů odchováno po plemeníku Rep z Pohraniční stráže.

Pro udržení přirozené struktury populace bylo uskutečněno krytí vlčice Lejdy německým ovčákem Bojarem von Schoterrhof. Z první filiální generace byl vybrán pes Kazan, který byl následně využit v plemenitbě československých vlčáků (Hartl et Jedlička, 1996).

3.1.2 Genotyp

Výzkum genotypu probíhal sekvenováním genu kódujícím amelogenin z mtDNA, gonozomálních a autozomálních mikrosatelitů získaných ze vzorků Československých vlčáků, Německých ovčáků a Karpatských vlků. Navzdory malé efektivní velikosti populace je inbreední koeficient nízký, předpokládá se, že jde o následek introgrese heterozygotních vlčích alel. Genotyp jedinců československého vlčáka vykazuje výraznou podobnost s genotypy Německého ovčáka i Karpatského vlka, což ukazuje na působení efektu zakladatele a genetického driftu v průběhu plemenitby. Introgrese vlčích alel do genomu československého vlčáka je však limitována, s mnohem vyšším podílem genomu Německého ovčáka, v důsledku opakovaného zpětného křížení (Smetanová et al., 2015).

3.1.3 Plemenný standard

Dle plemenného standartu č. 322 mezinárodní kynologické federace je požadovaný vzhled jedinců přijímaných do plemenitby přesně stanoven. Celkový vzhled musí být pevného konstitučního typu a stavbou těla, osrstěním a barvou srsti připomínat vlka. Požadované vlastnosti na osrstění jsou rovná a uzavřená srst, značně odlišná zimní a letní srst, kdy v zimě převládá mohutná podsada vytvářející s vrchní krycí srstí husté osrstění celého těla. Srst musí pokrývat břicho, vrchní část stehen, šourek, vnitřní část ucha, meziprstí a krk. Barva srsti musí být žlutošedá až stříbrošedá s charakteristickou světlou maskou. Srst na spodní části krku a přední hrudi je rovněž světlá. Jednou z vad, která jedince vylučuje z chovu je i otevřená a netypická srst s jiným než standartním zbarvením, ale i dlouhá srst typická pro například německého ovčáka (1999).

3.2 Délka srsti

3.2.1 Vývoj chlupového folikulu

Vývoj chlupového folikulu je výsledkem interakce neuroektodermu a mesodermu, rozdělované do fáze indukce, organogeneze a buněčné diferenciaci. Proces rozmístování a diferenciaci je řízen interakcí samsopřádajícího se gradientu inhibitorů a aktivujících látek, ustálený kožní epitelem a mezenchymem. Vliv inhibitorů růstu je dominantní a pro další vývoj je nutná částečná blokáce jejich antagonisty. Indukční fibroblast, vznikající kondenzací mezenchymu, přebírá kontrolu nad následnou organogenezí a diferenciací epiteliálních buněk (Schmidt-Ullrich et Paus, 2005).

Klastry specializovaných kožních buněk v přímém kontaktu s epidermální vrstvou stimulují růst kožních zárodečných buněk a vznik chlupového folikulu, odděleného od pokožky membránou bohatou na mezibuněčnou hmotu a růstové faktory (Jahoda et al., 1984). Kožní papila, která se stane součástí báze folikulu, roste směrem dovnitř společně s folikulem. Folikul se stává plně funkční ve chvíli, kdy se vlasová cibulka přiblíží ke spodní vrstvě škály. Báze folikulu se dělí a dceřiné buňky se terminálně diferencují v rostoucí vlasové vlákno (Kishimoto et al., 2000).

Cyklus vývoje chlupového folikulu je rozdělen do tří fází: anagen, katagen a telogen. Na řízení procesů a přechodů do jednotlivých fází se podílí mnoho signálních molekul jako fibroblast růstový faktor FGF5 a EGF, transformující růstový faktor (TGF – β), p53 a p75 receptor neurotrophinu (Orr - Urtreger et al., 1991) (Philpott et al., 1994).

Přechody jednotlivých fází jsou řízeny signálními kaskádami aktivovanými receptory pro růstový faktor, Ras – Raf – MEK – MAPK (Johnson, 2002) a PI3K – PDK1 – Akt (Datta et al., 1999).

Fáze anagen je první fází cyklu chlupového folikulu. Již vzniklé folikuly jsou dlouhé a velmi rovné. Buňky vlasového vlákna terminálně diferencují, vytlačují organely a spojují se keratinovými filamenti bohatými na cystein (Lavker et al., 2003).

Přechod do fáze katagen je specifikována zpomalením diferenciací buněk a postupným zánikem chlupového folikulu. Přechod do fáze katagen se může lišit svým načasováním dle oblasti na těle, přičemž nejčastěji postupuje od kraniální oblasti směrem kaudálně (Alonso et al., 2005).

Fáze katagen je dynamickým přechodem mezi výraznou proliferací a diferenciací buněk v anagenu a znatelným útlumem těchto procesů ve fázi telogen. Dochází k apoptóze epiteliálních buněk vlasové cibulky a jejího ukotvení. Po utlumení veškerých procesů nastává fáze telogen, která může skončit vypadnutím vlasového vlákna – exogen (Müller-Röver et al., 2001).

Obnovení cyklu je možno díky rezervě kožních zárodečných buněk a signalizaci *Wnts* a *shh* (Gat et al., 1998) (Callahan, 2004).

3.2.2 Epidermální růstový faktor EGF

Receptor pro epidermální růstový faktor se nachází v kůži a chlupovém folikulu a podílí se na jeho vývoji jako součást proliferujících epiteliálních komponentů, avšak není přítomen na vrcholu rostoucího folikulu ve fázi anagen. Vystavení nově narozených myší EGF vede k opoždění vývoje chlupového folikulu, snížení četnosti růstu srsti a průměru vlasového vlákna.

Při dodatečném podání EGF dochází k ztenčování, hyperkeratinizaci a hyperproliferaci kůže. U hybridů s částečně odbouranými receptory pro EGF jsou prokázány defekty při vývoji vlasového vlákna. Jedinci se spontánní mutací v genu pro receptor EGF a TGF α vykazují podobný fenotyp charakterizovaný vlnitou srstí, zakroucenými hmatovými vousky, neorganizovanými vlasovými folikuly a hypoplasticitou kůže (Hansen et al., 1997).

3.3 Folikulární růstový faktor FGF

Folikulární růstový faktor je polypeptid ovlivňující chování buňky pomocí transmembránových tyrosin kinázových receptorů (FGFR). Velikost FGF se pohybuje mezi o velikosti 17–34 kDa s velmi konzervativní centrální doménou 120–130 aminokyselin, uspořádaných do 12 β skládaných listů tvořících dohromady trojúhelníkovou formaci. Navázáním proteinu na dimerický FGFR za přítomnosti heparansulfát proteoglykanu dochází k transfosforylaci a aktivaci vnitrobuněčných signálních kaskád (Ras/MAPK, PI3K/Akt a PLC γ /PKC) (Oulion et al., 2012). Většina FGF má N-determinující signálový peptid (Itoh et Ornitz, 2004).

Fgf genová rodina zahrnuje zatím 23 známých genů. *Fgf1* a *Fgf2* jsou odpovědné za stimulaci proliferace fibroblastu (Miyamoto et al., 1993). Společně s dalšími faktory se však podílejí i na stimulaci a inhibici mnoha dalších buněk včetně svalových (Clegg, 1987).

Fylogenetické studie všech savčích *Fgf* genů, následována studií proteostoma, deuterostoma a baculoviridae vedla k rozdělení *Fgf* genové rodiny do osmi skupin. Podskupina A zahrnuje ortology *Fgf1* a *Fgf2*. Podskupina B s ortology *Fgf3*, 7, 10 a 22. Podskupina C s ortology *Fgf4*, 5 a 6. Podskupina D s ortology *Fgf8*, 17, 18 a 24 u obratlovců ale i *Egl – 17*, *Pyr* a *Ths* u protostoma. Podskupina E s ortology *Fgf9*, 16 a 20, ale také *Let-756* u nematod. Podskupina F s ortology *Fgf11*, 12, 13 a 14. Podskupina G s ortology *Fgf15/19*, 21 a 23. Poslední podskupina H je vyhrazena pro specifické *Fgf* členovců a specifické viry členovců (Oulion et al., 2012).

Vliv růstového faktoru FGF na vývoj vlasového folikulu a vlasového vlákna byla prokázána u mnoha živočišných druhů.

3.3.1 *Fgf5* u myši (*Mus musculus*)

Mutací ovlivňujících produkci srsti již bylo identifikováno mnoho, avšak většině případů abnormálního vývoje srsti, včetně vypadávání, byla označena jako strukturální vada vlasového folikulu (Green et Couchman, 1984).

U myši s recesivní mutací v genu pro regulaci růstu (angora *go*) se vyskytovala abnormálně dlouhá srst bez zjevných strukturálních vad. Délka srsti byla tedy připisována době, po kterou byly folikuly ve fázi aktivní produkce (Pennycuik et Raphael, 1984).

Výskyt *Fgf5* mRNA byl prokázán na různých místech v různých stádiích ontogeneze. V myším embryu byla nalezena na počátku gastrulace pouze v oblasti embryonálního ektodermu (Hébert et al., 1990). V dalším vývoji pak v somatickém myotomu a prekurzorech specifických kosterních svalů (Goldfarb et al., 1991). V dospělosti je *Fgf5* mRNA detekovatelná v míše a hipokampu (Haub et al., 1990).

Substituční vektor, s vloženým genem pro rezistenci proti neomycinu a fosfoglycerát kinázou 1 (*Pgk1*) jako promotorem, byl vložen do genu *Fgf5* na exonu 1 na chromozomu 5. To vedlo k narušení kódující sekvence na pozici 113 bp a vzniku mnoha předčasných terminačních kodonů ve třech čtecích rámcích. Tento konstrukt byl vnesen elektroporací do embryonálních kmenových buněk, ze kterých byly následně vybrány G418 rezistentní klony. Pomocí PCR a následné analýzy byly identifikovány amplikony vykazující homologní rekombinace. Buňky s homologní rekombinací byly injikovány do blastocyst pro získání chimérických myší. Heterozygotní potomci těchto myší byli kříženi pro získání homozygotních jedinců, u kterých byla následně prokázána absence wild-type *Fgf5*. Všichni homozygotní jedinci s mutací *Fgf5^{neo}* byli zdraví, fertilní, avšak se znatelně delší srstí než jedinci heterozygotní a wild-type (Hébert et al., 1994).

Na kožních buňkách, průběžně odebíraných od narození do 24 dne po smrti, z wild-type myší byla provedena *in situ* hybridizační analýza. Pozorované folikuly procházely všemi fázemi růstového cyklu. *Fgf5* mRNA však byla detekována až v poslední fázi anagen VI, a to ve spodní třetině vnější pochvy vlasového folikulu. Malé množství *Fgf5* mRNA bylo také detekováno na bázi folikulu. V žádné jiné části folikulu detekována nebyla, a ani v následných fázích cyklu. U myší s mutací v genu *Fgf5* nebyla *Fgf5* mRNA detekována v žádné fázi cyklu. Tím bylo prokázána funkce *Fgf5* jakožto regulátoru progresu vlasového folikulu (Hébert et al., 1994).

Následné pokusy s přímou injekcí FGF5 do kůže potvrdily tyto závěry a prokázaly že FGF5 nemá vliv na tloušťku škůry. Zároveň byla prokázána role FGF5S (kratší verze proteinu

postrádající v sekvenci genu oblast exonu 2 a část exonu 3 jakožto výsledek alternativního sestřihu (Hattori et al., 1996)) jakožto antagonisty FGF5 (Suzuki et al., 2000).

3.3.1.1 *Fgf18*

Sledováním exprese genů z rodiny *Fgf* byla zjištěna míra exprese v různých fázích vývoje vlasového folikulu. Nejsilnější exprese byla pozorována u genů *Fgf1*, *5*, *7*, *10*, *13*, *8* a *22*. *Fgf7* a *10* vykazovaly podobnou míru exprese s nejvyšší mírou ve fázi anagen V. Nejsilnější exprese *Fgf5* a *22* byla pozorována ve fázi anagen VI. Exprese *Fgf18* byla nejvyšší ve fázi telogen v buňkách vnitřní pochvy vlasového folikulu v blízkosti vlasové cibulky. Pozorováním mitogenního efektu na vlasové folikuly byl zjištěn vliv na DNA syntézu ve vlasovém folikulu, papilární buňky škáry, fibroblasty, kožní keratinocyty a vaskulární buňky endotelu (Kawano et al., 2005).

3.3.2 *Fgf5* u psovitých (Canidae)

Délka srsti je jedním z mnoha morfologických rozdílů mezi odlišnými plemeny psů, na který mají vliv zejména dva autozomální major geny (Dawson, 1934) (Little, 1934). Alela pro krátkou srst je dominantní. Pokusem s křížením dlouhosrstých kokršpanělů a krátkosrstých basenji byla prokázáno, že alela pro dlouhou srst je recesivní (Scott, 1964).

U jiných plemen byl zjištěn lokus, kde je alela pro dlouhou srst dominantní a fixována v genotypu. Jedná se zejména o dlouhosrstá plemena typu dlouhosrstý pudl. Odlišná délka srsti oproti plemennému standardu plemene představuje problém pro chovatele, a většinou je i důvodem pro vyřazení jedince z chovu, pokud je délka srsti neslučitelná s původním účelem chovu plemene (Housley et Venta, 2006).

Sekvenováním ampliconů DNA zástupců několika typicky krátkosrstých i dlouhosrstých plemen, byla získána sekvence genu *Fgf5* obsahující tři exony. To bylo potvrzeno i amplifikací *Fgf5* mRNA pomocí reverzní transkriptázy. Dva fragmenty se však lišily svou velikostí o 104 bp, jakožto výsledek dvou alternativních sestřihů. Při porovnání exonu 2 a 3 mezi krátkosrstými a dlouhosrstými plemeny nebyl pozorován rozdíl, avšak u exonu 1 byly objeveny rozdíly ve dvou sekvencích (Housley et Venta, 2006).

Prvním byla 6 bp duplikace ACCAGC v pozici 145–156 bp u delší alely. Následná translace předpokládala zdvojení aminokyselin treonin a serin.

Druhým rozdílem byl SNP G>T na pozici 284 bp, který vede po translaci k záměně cysteinu za fenylalanin. Všichni testovaní homozygotní zástupci dlouhosrstých plemen nesli mutaci 284G>T na obou alelách (Housley et Venta, 2006).

U některých dlouhosrstých plemen (afgánský chrt, eurasier, samojed a sibiřský husky) není fenotyp podmíněn mutacemi pozorovanými v předchozí studii Housley et Venta (2006). Čtyři další mutace v genu *Fgf5* byly objeveny opakovanou sekvenací cDNA s několika přilehlými introny. První z mutací byla transverze T>A na pozici 8193 lokalizována v intronu 1. Tři následné mutace jsou lokalizovány v kódující oblasti genu *Fgf5* na exonu 3. Delece 16 bp na pozici mezi 556–571 a duplikace GG na pozici 559–560 vedou k posunutí čtecího rámce s předčasným terminačním kodonem. Tranzice C>T na pozici 578 způsobuje záměnu alaninu za valin a tvoří nové místo pro štěpení, které však není využíváno, ale zabraňuje štěpení exonu 2 (Dierks et al., 2013).

Pomocí genotypování byly objeveny mutace ovlivňující celkový fenotyp srsti v několika variantách. Plemena s drsnou srstí nesou inzerci 167 bp v genu *Rspo2*, který společně s *Wnt* aktivuje β katenin podílející se na vývoji vlasového folikulu. Tato inzerce ovlivňuje míru exprese genu. V kombinaci s mutací *Krt71* (SNP Arg \rightarrow Trp) byl prokázán u jedinců s drsnou zakroucenou srstí. Kombinace mutací *Rspo2* a *Fgf5* byla prokázána u dlouhosrstých jedinců s jemnou srstí. U dlouhosrstých plemen s vlnitou srstí byla pozorována kombinace mutací *Fgf5* a *Krt71*. Kombinace všech tří mutací byla pozorována u dlouhosrstých plemen s vlnitou srstí a dalších osrstěním hlavy. Žádná z těchto mutací nebyla nalezena v testovaných vlčích a krátkosrstých plemenech (Cadieu et al., 2009).

3.3.3 *Fgf5* u kočky domácí (*Felis silvestris f. catus*)

U kočkovitých je dlouhá srst recesivním znakem. Studií cDNA a pomocí RT-PCR byly získány dva alternativně sestříhané fragmenty. Komparativním sekvenováním cDNA a genomické DNA dlouhosrstých i krátkosrstých plemen byly objeveny čtyři nesynonymní polymorfismy v kódující sekvenci *Fgf5* (Drögemüller et al., 2007).

Nonsense mutace na pozici 194C>A byla nalezena u homozygotních zástupců plemen somálské, perské, ragdoll, mainké mývalí kočky a kříženců. Kosegregace této mutace byla prokázána u dvou rozdílných plemen. Tato mutace byla prokázána jako kauzální pro fenotyp dlouhé srsti. U mainkých mývalích koček byla nalezena v kombinaci s mutací 194C>A i delece T na pozici 474, která způsobuje posunutí čtecího rámce. U krátkosrstých koček nebyla nalezena tato mutace vůbec nebo pouze v jedné z alel. (Drögemüller et al., 2007).

Další mutace v exonu 1 genu *Fgf5* na pozici 182T>A způsobuje záměnu valinu za kyselinu asparagovou, a byla nalezena pouze u norských lesních koček (Drögemüller et al., 2007).

Poslední nalezenou mutací byla nonsense mutace na pozici 475A>C. U některých plemen byla asociována s možností ovlivnění délky srsti, avšak byla nalezena i u homozygota krátkosrstého plemene, proto byl vyloučen její možný vliv na délku srsti (Drögemüller et al., 2007).

Genovou sekvenací bylo objeveno 10 dalších SNP. Pouze čtyři z nich byly považovány za signifikantní. První z nich byla nalezena u nepříbuzných zástupců plemene ragdoll v podobě inserce T na pozici 356 způsobující posunutí čtecího rámce. U norských lesních koček byla nalezena substituce C>T na pozici 406 v exonu 2, což vede k záměně kodónu pro arginin za předčasný terminační kodon. Byly i potvrzeny delece T na pozici 474 a substituce A>C na pozici 475. Všechny mutace jsou autozomálně recesivní (Kehler et al., 2007).

3.3.4 *Fgf5* u sudokopytníků (Cetartiodactyla)

3.3.4.1 Ovce Merino

U plemene Merino je délka srsti hlavním ekonomickým zájmem. Pomocí RT-PCR byl amplifikován gen *Fgf5* z cDNA a byly získány dva různě dlouhé úseky. *Fgf5* a *Fgf5s* (kratší řetězec podléhající alternativnímu sestřihu), odpovídající kódující sekvenci mRNA. Expresí genu *Fgf* byla prokázána ve všech vzorcích tkání kromě ledvina plic, s nejvyšší expresí *Fgf* mRNA v mozku, slezině a kůži. Nižší míra exprese *Fgf* mRNA v srdci a játrech, nejnižší pak v kosterních svalech. Oproti tomu *Fgfs* mRNA byla slabě exprimována pouze v mozku, slezině a kůži. Sekvenací amplikonů bylo objeveno 72 polymorfismů, z čehož pouze dva SNP byly v kódující oblasti. Substituce G>A na pozici 369 exonu 1, vedoucí k nahrazení alaninu threoninem a substituce C>G na pozici 21029 exonu 3 vedoucí k záměně leucinu za valin. Zbylé zjištěné polymorfismy jsou SNP v intronech, kromě jedné mutace typu In/Del v 3'UTG, sloužící jako markery pro další studie (Zhang et al., 2015).

3.3.4.2 Kašmírská koza

Klonováním cDNA genu *Fgf5* byl získán fragment s otevřeným čtecím rámcem. Sekvence nukleotidů je z 99 % homologní s ovčí DNA. FGF5 polypeptid o velikosti 270 AMK obsahuje jedno fosforylační místo pro cAMP a cGMP dependentní protein kinázu, jedenáct fosforylačních míst pro protein kinázu C, čtyři fosforylační místa pro kasein kinázu II, jedno amidační místo, jedno místo pro N-glykosylaci, jedno fosforylační místo pro tyrosin kinázu a heparin vázající růstový faktor (Bao et al., 2015).

Kratší transkript *Fgf5s* je produktem alternativního sestřihu. Pomocí RT-PCR byla detekována *Fgf5* a *Fgf5s* mRNA ve dvanácti vzorcích různých tkání. Vysoká exprese *Fgf5*

mRNA byla zjištěna v mozku, bachoru a kůži. Exprese *Fgf5s* mRNA byla prokázána u vzorků srdce a kůže. Exprese obou mRNA je proměnná v průběhu růstového cyklu vlasových folikulů. Ve fázi katagen převažuje exprese *Fgf5s* a ve fázi telogen pak exprese *Fgf5*. Nejnižší exprese obou mRNA byla zjištěna ve fázi anagen (He et al., 2014).

3.3.4.3 *Lama alpaca*

U lamy alpaky se vyskytují dva fenotypy vlny. Huacaya vlna je charakterizována pevným, jemným a vlnitým vláknem. Suri vlna je delší, rovná a lesklá. Obě isoformy genu *Fgf5* (*Fgf5* a *Fgf5s*) se vyskytují v genotypu lamy. V sekvenci genu *Fgf5* byla nalezena bodová mutace C>T na pozici 499, která vytváří předčasný terminační kodon. Mezi cDNA jedinců obou fenotypy nebyly detekovány polymorfismy v kódujících sekvencích ani ve 3'UTG oblasti (Pallotti et al., 2018).

3.3.5 *Fgf5* u osla (*Asinus*)

Sekvenací genomu dlouhosrstých a krátkosrstých plemen oslů byla objevena recesivní mutace In/Del dvou bází AT na pozici 433-444, způsobující posunutí čtecího rámce. Dále pak recesivní substituční mutace G>A. Obě mutace vedly k vzniku předčasných terminačních kodónů. Fenotyp dlouhé srsti odpovídal přítomnosti In/Del mutace v obou alelách, i při kombinaci In/Del a substituční mutace. Všechna krátkosrstá plemena nesla wild-type alelu alespoň v jedné kopii (Legrand et al., 2014).

3.3.6 *Fgf5* u slonovitých (*Elephantidae*)

Sekvenací všech tří exonů ze vzorků tří druhů slonů (slon africký – *Loxodonta africana*, slon indický – *Elephas maximus* a slon pralesní – *Loxodonta cyclotis*) byla získána sekvence genu *Fgf5*, která byla následně porovnána se sekvencí DNA mamuta (*Mammuthus primigenius*). V sekvencích genu *Fgf5* slonů nebyly nalezeny významné polymorfismy, avšak při porovnání s mamutí DNA byla objevena mutace v promotoru a substituci A>G na pozici 790. Ani jedna z těchto mutací neovlivnila pořadí aminokyselin v peptidu, z čehož bylo vyvozeno, že v DNA slonů i mamutů se vyskytuje funkční gen pro protein FGF5. Z těchto výsledků bylo usouzeno, že mutace v genu *Fgf5* není příčinou délky a hustoty osrstění u mamutů a rozdílů srsti u žijících zástupců slonovitých. Kandidátními geny jsou geny pro keratin a keratin asociovaný protein (KRTAP) (Roca et al., 2009).

3.3.7 *Fgf5* u kytovců (Cetacea)

Studie prokázaly přímý vliv genu *Fgf5* na délku osrstění terestrických savců, ze kterých evolučně pochází i vodní savci. V kůži kytovců dochází k významné expresi genu pro osrstění (*Hr*), který kóduje zinc finger transkripční faktor o velikosti přibližně 130 kDa. Kódovaný protein má transkripční korepresivní funkci ovlivňující nukleární receptory zahrnující receptory pro hormon thyroid (TR), kyselinu retinovou α (ROR α) a vitamin D (VDR). Represe těchto receptorů hraje důležitou roli v regulaci specifických genů zapojených do morfogeneze vlasového vlákna a cyklus vlasového folikulu. Gen *Hr* působí zejména při přechodu buněk do prvního cyklu vývoje vlasového folikulu, jelikož při jeho absenci se zcela zastaví růst vlasového vlákna, což vede k dědičné absolutní alopecii (Chen et al., 2013).

Porovnání genu *Hr* terestrických savců a vybraných kytovců neobjevilo žádné markantní rozdíly. Nebyly přítomny žádné mutace posunující čtecí rámec ani předčasné terminační kodóny. Byly však nalezeny delece a změny pořadí aminokyselin v důležitých funkčních doménách v genu kytovců. Studií genomů společných předků vybraných kytovců bylo zjištěno, že gen *Hr* u kytovců vykazuje značný polymorfismus v oblastech vysoce konzervativních u terestrických savců. Na základě tohoto zjištění se předpokládá, že *Hr* gen u kytovců se pod selekčním tlakem stal pseudogenem (Chen et al., 2013).

Gen *Fgf5* u kytovců vykazoval vysoce konzervativní oblasti v exonu 2 a 3, stejně jako u savců, a nebyla zde nalezena žádná mutace způsobující posunutí čtecího rámce, či předčasný terminační kodon (Chen et al., 2013).

3.3.8 *Fgf5* u kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*)

U ptáků je FGF nesekreční protein s nízkou pravděpodobností výskytu signálního a kotvícího peptidu. Vložení lidského *Fgf5* do ptačího embrya pomocí virového vektoru vedlo ke zvýšení proliferace fibroblastu v končetinách, expanzi perichondria a pojivové tkáně ve vývoji kosterního svalstva. První exprese kurům vlastního *Fgf5* byla pozorována ve stádiu HH8 (Hamburger a Hamilton stádia embryonálního vývoje). Nejvyšší míra exprese byla pozorována ve vznikající otické plakodě, později pak v neurální trubici. Bylo prokázáno, že *Fgf5* u kura domácího ovlivňuje embryonální vývoj vnitřního ucha (Kumar et Chapman, 2012).

3.3.9 *Fgf5* u člověka (*Homo sapiens sapiens*)

Pomocí SNP genotypování 14 homozygotních jedinců, s prokázaným syndromem trichomegalie, byly objeveny mutace v genu *Fgf5* na chromosomu 4. Delece G na pozici 459 intronu 2. Delece TA na pozici 159-160 exonu 1, působící posunutí čtecího rámce pro oba

proteiny (FGF5 a FGF5S). Substituce T>C na pozici 520 exonu 3 má za následek záměnu tyrosinu na histidin, což má negativní dopad na funkci FGF5. Jedinci s těmito mutacemi mají značně delší řasy (8-12 mm) a zřetelně delší vlasová vlákna na rukách než kontrolní jedinci. Žádná z těchto mutací nebyla nalezena v kontrolních vzorcích jedinců bez syndromu trichomegalie ze stejné etnické skupiny (Higgins et al., 2014).

Pomocí imunofluorescence byl prokázán výskyt FGF5 ve vnější pochvě vlasového folikulu. Po vystavení folikulu rekombinovanému proteinu FGF5 došlo k předčasnému vstoupení folikulu do fáze katagen a rychlejšímu růstu vlasového vlákna (Higgins et al., 2014).

Ze studií jasně vyplývá inhibiční vliv FGF5 na růst vlasového folikulu a vlákna. Mnohé studie se proto zabývají přírodními inhibitory FGF5 jako možností léčby geneticky podmíněné předčasné ztráty vlasů. Jednou z látek vykazující inhibiční aktivitu vůči FGF5 je extrakt z kořene Krvavce totenu (*Sanguisorba officinalis*). *In vitro* vykazoval posilující vliv na multiplikaci buněk vnější pochvy vlasového folikulu. *In vivo* nepodporoval růst, ale výrazně redukoval počet folikulů ve fázi telogen. Při klinických pokusech s kontrolní skupinou, které bylo podáváno placebo, bylo pozorováno snížení vypadávání vlasů o 70 % u mužů i žen v rané fázi PHL (pattern hair loss), kterým byl podáván extrakt po dobu 16 týdnů (Burg et al., 2017).

Nižší exprese genu *Fgf5* byla prokázána u depigmentovaných vlasových vláken (Choi et al., 2011).

3.4 Možnosti molekulární detekce mutací

3.4.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (dále jen PCR) slouží k amplifikaci cílových DNA sekvencí. Templátem pro amplifikaci je původní DNA, s cílovou sekvencí označenou primery. Výsledkem reakce jsou syntetizované kopie původního fragmentu, amplikony. Každý nově syntetizovaný amplikon se stává templátem pro další syntézu. Opakovanou cyklickou amplifikací exponenciálně narůstají kopie původního fragmentu, což je podstatou metody PCR. Pro uskutečnění syntézy je nutná přítomnost několika komponentů. Původní DNA jako templát, primery specificky komplementární s počátkem (Forward primer) a koncem (Reverse primer) cílové sekvence, DNA polymeráza (nejčastěji využívaná je *Taq* polymeráza separovaná z *Thermus aquaticus*), volné deoxynukleosid trifosfatázy všech bází (dNTP), roztoky chloridu draselného (KCl) a chloridu hořečnatého (MgCl₂) s pufruční funkcí, hovězí sérový albumin pro stabilizaci reakce (BSA), ENHANCER a voda. PCR probíhá v termocykleru (Clark et Pazdernik, 2012).

Primery potřebné pro označení cílové sekvence na bázi komplementarity jsou k dohledání ve volně přístupné mezinárodní databázi BOLDSystem (2018). Databáze je pravidelně doplňována o nové primery, za současné kontroly stávajícího obsahu více než 120 organizacemi z celého světa (Ratnasingham et Hebert, 2007).

PCR je rozdělena do šesti základních fází. V počáteční fázi iniciace dochází k aktivaci DNA polymerázy jejím vystavením vysoké teplotě po stanovený čas (uvedená vždy v příloženém protokolu konkrétní polymerázy), nejčastěji 94–98 °C na 1–9 minut. Fáze denaturace následuje po iniciaci a slouží k porušení vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi, které udržují DNA ve spiralizované formě. dsDNA je vystavena na 20-30 vteřin teplotě 95-98 °C, čímž vznikají molekuly ssDNA. Ve třetí fázi annealingu se specificky navazují primery, komplementární k předem určeným vazebným místům na ssDNA. Annealing probíhá 20-40 vteřin optimálně za teploty 50–60 °C. Následuje fáze elongace, při které jsou z volných dNTP syntetizována nová vlákna, komplementární k templátu. Fáze elongace trvá 1-2 minuty, při teplotě uvedené v protokolu použité polymerázy (optimální teplota pro *Taq* polymerázu je 70-80 °C). Fáze denaturace, annealingu a elongace se opakuje ve 20-40 cyklech. Po ukončení elongace posledního cyklu následuje fáze závěrečné elongace, kdy se produkty ponechají po dobu 5-15 minut při teplotě 70-74 °C, pro kompletní dosyntetizování všech fragmentů. Závěrečná fáze pozdržení nemá časové omezení. Dochází ke zchlazení produktů amplifikace na 4-15 °C, při které se může krátkodobě uchovávat přímo v termocykleru, který udržuje konstantní teplotu (Saiki et al., 1985) (Saiki et al., 1988).

Existuje mnoho metod zpracovávání, měření a vizualizace produktu amplifikace. Nejčastěji využívaným způsobem je elektroforetická separace nukleových kyselin (viz kapitola 3. 4. 4. Elektroforetická separace nukleových kyselin na agarózovém gelu).

3.4.2 Polymerázová řetězová reakce a štěpení restriční enzymem

Po vyhodnocení sekvenace produktu PCR a stanovení kandidátní sekvence hledané jednobodové mutace SNP, je nutno dohledat příslušný restriční enzym, štěpící danou palindromatickou sekvenci.

Databáze enzymů, značených mezinárodně uznávanou nomenklaturou, a jim příslušných sekvencí je volně dostupná k dohledání prostřednictvím REBASE (2009). Databáze obsahuje dostupné informace o restričních enzymech, palindromatických sekvencích, které štěpí a komerční dostupnosti jednotlivých enzymů. V současné době databáze zahrnuje přes 4 000 biochemicky a geneticky charakterizovaných restričních enzymů. V databázi jsou uvedeny

odkazy na další mezinárodní genové databáze, jako National Center for Biotechnology Information-NCBI (2018), GenBank a PubMed (Roberts et al., 2009).

Přítomnost mutace je potvrzena, pokud daný enzym rozštěpí sekvenci v cílovém tripletu, a dá tak vzniknout dvěma kratším sekvencím, což je umožněno vizualizovat nejčastěji pomocí elektroforetickou separací. Velikost fragmentů je porovnána s hmotnostním standardem a následně odečtena z elektroforeogramu (Roberts et al., 2001).

3.4.3 Značení prostřednictvím genetických markerů

Human Genom Project umožnil mapování lidského genomu prostřednictvím jeho sekvenace, a následný vznik mnoha genových databází (Beyer et al., 2007).

Radiačně hybridizovaná mapa genomu čeledi Canidae zahrnuje přes 720 markerů. V průběhu tvorby genomové mapy byly objeveny spojitosti mezi sekvencemi specifickými pro konkrétní choroby a zatím neznámými polymorfními markery. Dále byly identifikováno přes 382 mikrosatelitní sekvence DNA specifických pro čeleď Canidae a chromozom-specifické genetické markery. Prostřednictvím specifických mikrosatelitů byla RH mapa propojena s mapou vazebných skupin. Toto propojení přineslo detailnější pohled na genom Canidae (Mellersh et al., 2000).

3.4.4 Elektroforetická separace nukleových kyselin na agarózovém gelu

Princip elektroforetické separace spočívá v separaci nukleových kyselin dle velikosti. Využívá se zejména při analytických technikách: mapování pomocí restričních enzymů, stanovení velikost produktů PCR v bp, sekvenační analýzy, zjištění míry polymorfismu v populaci; a dále při preparativních technikách: separace fragmentů pro obnovení a klonování. (Brody et Kern, 2004) .

Elektroforetická separace uplatňuje princip pohybu záporně nabitých nukleových kyselin v elektrickém poli směrem k anodě skrz agarózový gel (polysacharid tvořený podjednotkami galaktózy a 3,6-anhydrogalaktózy), díky narušení vodíkových můstků elektrickým polem. Menší molekuly lépe prostupují póry agarózového gelu rychleji a urazí tak delší vzdálenost, než molekuly větší za stejný čas. Velikost vzorků je následně možno odečíst porovnáním pozice fragmentu s GeneRuler (Lewis, 2015).

Hustota gelu se stanovuje v závislosti na předpokládané velikosti produktů. Obecně platí, že čím menší produkt, tím hustší gel (Stellwagen, 2009).

Hodnota napětí a čas elektroforézy je stanovena na základě velikosti elektroforetické vany (Lewis, 2015).

Vizualizace je zprostředkována přidáním ethydium bromidu (dále jen EtBr) do agarózového gelu. EtBr je vysoce mutagenní látka, která umožňuje po vystavení fragmentů UV světlu v UV Transiluminátoru jejich vizualizaci. Výsledky separace jsou zaznamenány v podobě elektroforeogramů. Alternativním postupem hybridizace DNA s radioizotopy, zaznamenání výsledků následným umístěním fotografického papíru do blízkosti gelu, popřípadě přímé skenování gelu detektorem, měřícím β emise. Pro vizualizaci DNA molekul v celých buňkách využíváno značení digoxigeninem (Alberts et al., 2015).

3.4.5 Sekvenace

Sekvenace je označení metody, používané k určení pořadí nukleotidů ssDNA na principu komplementarity se zkoumaným fragmentem DNA. Nejvýznamnější metody sekvenace jsou Maxam – Gilbertova metoda, Sangerova metoda, pyrosekvenování a metody druhé a třetí generace sekvenování (Carlson, 2010).

Kvalita získaného produktu sekvenace je významně ovlivněna dodržáním protokolu. Vzorek DNA musí být čistý, zbaven reziduí proteinů, RNA a polysacharidů. Před přidáním reakční směsi je nutné, aby byl templát řádně vysušen a přečištěn ethanolem (Nucleics, 2016).

Maxam – Gilbertova metoda je založena na principu štěpení fragmentu chemickými látkami v konkrétní sekvenci. Nevýhodou je využití velkého množství nebezpečných chemických látek, jako radioaktivní izotop fosforu, dimetylsulfát, piperidin a hydrazin (Carlson, 2010).

Sangerova dideoxy terminační metoda zahrnuje použití DNA polymerázy, společně s 2,3-dideoxynukleotidy (ddNTP's), které na principu komplementarity tvoří parciální kopie DNA templátu určeného k sekvenaci. Do reakční směsi jsou přidány ddNTP, a každá báze je odlišena navázaným barvivem. Tato směs je elektroforeticky separována na kapiláře a průchod fragmentů gelem je snímán kamerou, která zaznamenává barvu všech frekvenčních pásem. Získaná data se uchovávají a zpracovávají počítačovým softwarem (Alberts et al., 2015).

Pyrosekvenace využívá základní princip Sangerovy metody za použití DNA polymerázy. Na rozdíl od Sangerovy metody je navázání látek značících jednotlivé báze reverzibilní. Pro značení jsou využívány enzymy vykazující bioluminiscenci, která je snímána a zaznamenávána kamerou. Polymeráza využívaná při pyrosekvenaci je Klenow DNA polymeráza, a bioluminiscenční enzymy jsou ATP sulfuryláza, luciferáza a apyráza. Detekce nukleotidů je založena na uvolnění pyrofosfátu z přítomných enzymů při zabudování nukleotidu, za

současného uvolnění záření. DNA. Metoda pyrosequenace prozatím není vhodná pro detekci rozsáhlých polymorfismů, jelikož je limitována délkou sekvenovaného fragmentu (Ahmadian et al., 2006).

Výhodou nové generace sekvenování (NGS) je zejména vysoká rychlost čtení pořadí nukleotidů. Tyto metody dokáží sekvenovat i DNA fragmenty bez nutnosti předchozí amplifikace. Společným bodem NGS je tvorba genomových knihoven před samotnou sekvenací. Počet chyb při syntéze řetězce byl znatelně snížen, přesto stále převyšuje chybovost Sangerovy metody, a jsou náročné z hlediska ukládání a zpracování dat (Glenn, 2011).

454 GenomeSequencer FLX instrument vychází z principu pyrosequenace. Fragmenty DNA jsou hybridizovány na specifické adaptéry, které umožňují navázání fragmentu na substrát, kde jsou následně amplifikovány emulzní PCR. Denaturované amplikony jsou vloženy na optická vlákna, vedoucí světlo. Platforma, na které sekvenace probíhá, obsahuje stovky tisíc optických vláken, což umožňuje průběh několika paralelních sekvenací najednou. Celý průběh reakce je zaznamenáván kamerou a následně vyhodnocen počítačovým softwarem. Limitním faktorem je velikost sekvenovaného fragmentu, prozatím lze takto sekvenovat fragmenty o velikosti 400–500 bp (Ansorge, 2009).

Illumina (Solexa) genome analyzer metoda je založena na principu sekvenování DNA syntézou fragmentu s adaptérem. Volné terminační nukleotidy s reverzibilně navázanou sondou, jsou začleňovány komplementárně k původnímu vlákně prostřednictvím speciální DNA polymerázy. Adaptéry fragmentů se spájí s komplementárními adaptéry hybridizovanými na platformě. Po syntéze antiparalelního vlákna se vodíkové můstky mezi fragmenty rozpojí. Nově vzniklý fragment přebírá funkci templátu a adaptér funkci primeru. Začleňováním terminačních nukleotidů zaniká reverzibilní vazba sondy, při čemž dochází k emitaci světla, zaznamenávaného kamerou. Signál je poté převeden do digitální podoby a zpracován počítačovým softwarem (Alberts et al., 2015).

Applied Biosystems ABI SOLiD metoda zahrnuje využití emulzní PCR. Konce fragmentů jsou hybridizovány s adaptéry a dsDNA denaturována na ssDNA. Takto upravené fragmenty jsou nanášeny na skleněnou plochu. Na adaptér je následně hybridizován primer společně se směsí oligonukleotidových oktamerů z reakční směsi. Reverzibilní vazbou jsou značeny vždy dvojice nukleotidů, každá z probačních sond barevně odpovídá konkrétnímu nukleotidu. Emitované světlo a je zaznamenáváno kamerou a signál převáděn do digitální podoby. Po detekování emitovaného světla je sonda vymyta, produkt odebrán a další dvojice nukleotidů je vyznačena primerem k ligaci (Ansorge, 2009).

Ion Torrent Sequencing metoda pracuje se zaznamenáváním změn pH při uvolňování vodíkových iontů. Fragменты z genomové knihovny jsou hybridizovány na platformu, kde jsou následně amplifikovány. Po ukončení amplifikace jsou nasyntetizované fragmenty přeneseny do cely společně s komplementárním primerem. Při elongaci komplementárního vlákna dochází k uvolňování vodíkových iontů z volných dNTP, což vede ke změně pH. Každá změna je registrována elektrografickým čipem a převáděna do digitální podoby (Alberts et al., 2015).

Helicos single – molecule sequencing device metoda využívající HeliScopeTM sequencig systém. Nevyžaduje předchozí amplifikaci fragmentů, čímž se snižuje chybovost začleňování nukleotidů, a to zejména v oblasti bohaté na CG. Fragmenty určené k sekvenování jsou hybridizovány na jednorázové skleněné flow cell platformě. Prostřednictvím HeliScopeTM analyzačního systému jsou snímány jednotlivé fyzické pozice nukleotidů v reálném čase. Po dokončení procesu a vyhodnocení získaného obrazu jsou data převedeny do počítačového softwaru pro další zpracování (Thompson et Steinmann, 2001).

NGS technologie umožňují nahrazení DNA čipů při mapování genomu. Vysoce výkonná sekvenace DNA umožňuje přímé odkazování do mezinárodních genomových databází (Ansorge, 2009).

Hlavním cílem NGS je zvýšení přesnosti sekvenace, urychlení celého procesu za minimální chybovosti, prodloužení čtení fragmentu, a tudíž i maximální délku fragmentu, a zejména pak možnost čtení pořadí nukleotidů v reálném čase bez nutnosti předchozí amplifikace fragmentu (Ansorge, 2009).

4 Materiál a metody

Molekulární detekce mutace genu *Fgf5* byla uskutečněna za využití enzymatického restrikčního štěpení a kapilárového obousměrného sekvenování genu.

Samotné detekci předcházelo určení konkrétní polohy kandidátní mutace prostřednictvím počítačového softwaru BioEdit (Hall, ©1999-2005). Sekvence genu *Fgf5* byla převzata z volně dostupné mezinárodní databáze National Center for Biotechnology Information – NCBI (2018) a databáze Ensembl (Zerbino et al., 2018) projektované European Bioinformatics Institute a Wellcome Trust Sanger Institute.

Z výzkumu Housley et. Venta (2006) byly lokalizovány kandidátní sekvence mutací. Konkrétně se jedná o dva polymorfismy. Duplikace 6 bp (ACCAGC) na pozici 145–156 exonu 1 genu *Fgf5* na chromozomu 32, který má po translaci za následek duplikaci threoninu a serinu ve výsledném proteinu FGF5. SNP G>T na pozici 284 exonu 1 genu *Fgf5* na chromozomu 32 vede k záměně původního cysteinu za fenylalanin.

4.1 Gen *Fgf5*, F a R primery

Gen *Fgf5* je lokalizován na chromozomu 32. Z tohoto genu byl vybrán exon 1 pro restrikční štěpení, fragmentační analýzu a sekvenaci. Pro každou z těchto metod byly navrženy dvojice primerů F a R programem Primer 3 (Koressaar et Remm, 2007) (Untergasser et al., 2012). Pro restrikční štěpení byla navržena dvojice primerů FGF5-284-F a FGF5-284-R. Pro segmentační analýzu byly navrženy primery FGF5-INDEL-F a FGF5-INDEL-R. Pro sekvenaci celého exonu 1 byly navrženy primery FGF5-EXON1-F a FGF5-EXON1-R. Sekvence všech primerů jsou uvedeny v kapitole 5.1 Navržení F a R primerů pro jednotlivé metody.

4.2 Izolace DNA

Vzorky DNA 383 zástupců plemene československý vlčák byly odebrány se souhlasem majitelů na oficiálních výstavách CMKU a chovných stanicích. Pro dodržení etiky chovu nebyla uvedena jména testovaných jedinců. Odběr byl proveden neinvazivní metodou stěrů epiteliálních buněk bukální sliznice, za použití sterilních cytologických kartáčků.

Takto odebraná DNA byla následně izolována dle protokolu NucleoSpin Tissue (Machery-Nagel). Nekontaminované vzorky DNA na cytologickém kartáčku byly vloženy do sterilních zkumavek (1,5 ml). Struktura buněk bukálních sliznic byla následně rozrušena puřrem T a proteinázou P. Vzorky byl řádně promíchány vibrační třepačkou (TechnoKartell

TK3S) a vloženy do termobloku na dobu 15 minut za konstantní teploty 56 °C. Po inkubaci a řádném promíchání byl přidán pufr B3. Vzorky byly opět promíchány vibrační třepačkou a vloženy zpět do termobloku na dobu 10 minut za konstantní teploty 70 °C. Následně byly vyjmuty ze zkumavek cytologické kartáčky a do směsi byl přidán absolutní ethanol a vzorky ručně, překlápěním promíchány. Promíchané vzorky byly přeneseny do zkumavek se silikátovými filtry, dále pak opakovaně vkládány do odstředivky a promývány pufráčními roztoky BW a B5. Po finálním promytí a odstředění byly silikátové filtry přeneseny do čistých zkumavek a následně promyty pufrém BE, za současného uvolnění DNA do roztoku. Odstředěním separované vzorky byly kvantifikovány pomocí UV spektrofotometru (NanoPhotometr Implen), uzavřeny, řádně označeny a uloženy k zamrazení.

4.3 Detekce mutace FGF5:c.284G>T v exonu 1 restrikčním štěpením

Izolovaná DNA byla využita v detekci mutace genu *Fgf5* za využití dvou analytických metod. První metodou bylo vystavení produktů amplifikace restrikčnímu enzymu *PstI*. Výsledný produkt byl separován elektroforeticky a výsledky zaznamenány v podobě elektroforeogramu.

4.3.1 Restrikční enzym *PstI*

Restrikční enzym *PstI* (Thermo SCIENTIFIC), poprvé extrahován z bakterie *Providencia stuartii*, rozpoznává a štěpí palindromatickou sekvenci 5' ... C T G C A G ...3' na pozici 125 bp a 150 bp exonu 1 genu *Fgf5* za optimální teploty 37 °C. Výsledkem jsou fragmenty různé velikosti.

4.3.2 Složení premixu pro PCR

Pro analýzu byly použity amplikony, které vznikly při využití primerů FGF5-284-F a FGF5-284-R. Jelikož navržení specifických primerů je výsledkem řešení diplomové práce, je sekvence primerů, včetně jejich pozic v exonu 1 genu *Fgf5*, uvedena v kapitole 5. 1. 1. Pro amplifikace bylo použito složení reakce uvedené v tabulce 1.:

Komponent	Koncentrace
DNA 10 ng/ 1µl	30 ng . 12,5 µl ⁻¹
Pufř KCl	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	200 µM
Primer F	0,4 µM
Primer R	0,4 µM
Enhancer – oxalacetát (Top-Bio)	2 mM
BSA	5 ng . 12,5 µl ⁻¹
<i>Taq</i> polymeráza (Thermo SCIENTIFIC)	0,7U . 12,5 µl ⁻¹

Tabulka 1: Složení a koncentrace jednotlivých komponentů pro PCR amplifikaci genu *Fgf5* s využitím primerů FGF5-284-F a FGF5-284-R

4.3.3 Program FGF284 a amplifikace DNA

Šestnáct vybraných vzorků bylo podrobena amplifikaci při předem navrženém teplotním gradientu pro zjištění optimální teploty nasedání primerů na fragmenty ssDNA. Po elektroforetické separaci byla optimální teplota stanovena na 63 °C.

Program FGF5284 byl v termocykleru (C 1000 Thermal Cycler) nastaven následovně:

Iniciace	95 °C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	95 °C	30 sekund	} 34 cyklů
Annealing	63 °C	20 sekund	
Elongace	72 °C	30 sekund	
Finální elongace	72 °C	420 sekund	1 cyklus
Fáze udržování	12 °C	∞	

4.3.4 Příprava agarózového gelu

Na základě předchozí znalosti velikosti amplifikovaného fragmentu určeného k separaci byla stanovena hustota gelu na 4 %.

Na analytických vahách bylo naváženo 8 g agarózy a společně s 200 ml 1x TBE (roztok tris(hydroxymethyl)aminomethanu, kyseliny borité a kyseliny ethylendiamintetraoctové – EDTA, ředěné s vodou v poměru 1:100) přeneseno do Erlenmeyerovy baňky. Roztok byl za

občasného promíchání zahříván po dobu 3-5 minut společně s magnetickým míchadlem pro případné odhalení utajeného varu.

Po rozpuštění agarózy byla baňka přenesena na magnetickou míchačku pod laboratorní digestoří, kde bylo následně do roztoku přidáno 12,5 μ l EtBr. Za neustálého míchání byla teplota roztoku snížena na 60 °C, a po vyjmutí magnetického míchadla byl roztok přenesen do předem připravené formy se 100 celami v 5 řadách. Po 45 minutách byl gel připraven na přenos do elektroforetické vany.

4.3.5 Elektroforetická separace amplifikovaných fragmentů

Z celkového objemu 12,5 μ l produktu amplifikace bylo přeneseno 5 μ l do sterilních PCR zkumavek (0,2 ml), které byly shodně označeny s příslušným produktem amplifikace. Takto označené zkumavky byly uloženy k zamrazení pro následnou analýzu za využití restričního enzymu.

Ve všech zkumavkách původních produktů amplifikace bylo ponecháno 7,5 μ l. Tyto produkty byly obarveny 2 μ l nanášecího pufru, a nanесeny mikropipetou s nastavitelným objemem na 4 % agarózový gel. Na poslední pozici každé řady byl nanесen hmotnostní standard, připravený z 8 μ l H₂O, 1 μ l GeneRuler100 bp Plus DNA ladder (Thermo SCIENTIFIC) a 2 μ l nanášecího pufru.

Elektroforetická separace byla prováděna po dobu 60 minut při napětí 100 V. Po celou dobu byl průběžně sledován pohyb fragmentů a po uplynutí stanovené doby byl gel vyjmut a fragmenty vizualizovány prostřednictvím UV Transiluminátoru (BioRad ChemiDoc XRS). Výsledky byly zaznamenány prostřednictvím programu QuantityOne systému GelDoc v podobě elektroforeogramu a uchovány pro následný výběr vzorků pro enzymatické štěpení.

4.3.6 Restriční štěpení

Po vyhodnocení elektroforeogramů byly vybrány vzorky, u kterých prokazatelně proběhla amplifikace. U těchto vzorků bylo následně provedeno restriční štěpení za použití enzymu *Pst*I, se kterým byl společně dodán pufr O.

Dle přiloženého protokolu k enzymu *Pst*I, byl stanoven přesný poměr komponentů premixu určeného na jeden vzorek.

Objem reakční směsi pro štěpení jednoho vzorku byl vypočten následovně:

Komponent	Objem μl
Produkt PCR	5 μl
H ₂ O	9 μl
10 x Pufř O	1 μl
<i>Pst</i> I	1 μl

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro restrikční štěpení

Řádně označené zkumavky s reakční směsí byly inkubovány dle protokolu enzymu *Pst*I v termocykleru po dobu 16 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí doby nutné k inkubaci byl enzym inaktivován dle protokolu.

Produkty enzymatického štěpení byly obarveny 2 μl nanášecího pufru, a naneseny na 4 % agarózový gel společně s hmotnostním standardem. Elektroforetická separace probíhala 60 minut při napětí 100 V. Následně byl gel vyjmut a výsledky vizualizovány prostřednictvím UV Transiluminátoru. Výsledné elektroforeogramy byly porovnány s předchozími elektroforeogramy po amplifikaci.

4.4 Detekce mutace FGF5:c.140_150dupACCAGC v exonu 1 kapilární elektroforetickou separací

Pro analýzu byly použity amplikony, které vznikly při využití primerů FGF5-INDEL-F (značený fluorescenčí barvou VIC) a FGF5-INDEL-R. Jelikož navržení specifických primerů je výsledkem řešení diplomové práce, je sekvence primerů, včetně jejich pozic v exonu 1 genu *Fgf5*, uvedena v kapitole 5. 1. 2. Pro amplifikaci bylo použito shodné složení reakce, jako je uvedeno v tabulce 1. Pro amplifikaci byl použit následující program.

Program FGF5IND byl v termocykleru (C 1000 Thermal Cycler) nastaven následovně:

Iniciace	95 °C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	95 °C	30 sekund	} 34 cyklů
Annealing	62 °C	20 sekund	
Elongace	72 °C	30 sekund	
Finální elongace	72 °C	420 sekund	1 cyklus
Fáze udržování	12 °C	∞	

Získané amplikony byly naředěny a doplněny hmotnostním standardem dle schématu uvedeného v tabulce 3.

Komponent		Objem (μl)
Naředěný produkt PCR	1 μl produkt PCR	1 μl
	19 μl H ₂ O	
LIZ600 (Thermo SCIENTIFIC)		0,2 μl
Hi-Di Formamid		12 μl

Tabulka 3: Objemové složení reakční směsi pro fragmentační analýzu

Připravené vzorky byly denaturovány v termocykleru při 95 °C a po 5 minutách zchlazeny na 4 °C. Vzorky byly následně podrobeny fragmentační analýze kapilární elektroforetickou separací (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Thermo SCIENTIFIC).

Parametry fragmentační analýzy	Hodnoty přístroje
Délka kapiláry	36 cm
Modul	GS STR POP4 (1 ml) G5
Polymer	POP4
Virtuální filtr	G5
Doba nástřiku	5 s
Napětí při nástřiku	15 kV
Teplota při separaci	60 °C
Napětí při separaci	15 kV
Doba separace	24 min

Tabulka 4: Parametry přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer využitý při fragmentační analýze

4.5 Sekvenační analýza exonu 1 genu *Fgf5*

Pro analýzu byly použity amplikony, které vznikly při využití primerů FGF5-EXON1-F a FGF5-EXON1-R. Jelikož navržení specifických primerů je výsledkem řešení diplomové práce, je sekvence primerů, včetně jejich pozic v exonu 1 genu *Fgf5*, uvedena v kapitole 5. 1. 3. Pro amplifikaci bylo použito shodné složení reakce, jako je uvedeno v tabulce 1. Pro amplifikaci byl použit následující program.

Program FGF5EXON1 byl v termocykleru (C 1000 Thermal Cycler) nastaven následovně:

Iniciace	95 °C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	95 °C	30 sekund	} 34 cyklů
Annealing	58 °C	20 sekund	
Elongace	72 °C	30 sekund	
Finální elongace	72 °C	420 sekund	1 cyklus
Fáze udržování	12 °C	∞	

4.5.1 Extrakce a purifikace vzorků z agarózového gelu

Amplifikované fragmenty byly separovány v 1,5 % agarózovém gelu v 1 x TBE pufru při konstantním 120 V po dobu 40 minut.

Z agarózového gelu byly skalpelem vyjmuty cely s příslušnými produkty PCR a jednotlivé vzorky zváženy na analytických vahách. Dále se postupovalo dle protokolu GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo SCIENTIFIC)

Vzorky byly přeneseny do řádně označených zkumavek, do kterých bylo přidáno odpovídající množství rozpouštěcího pufru v poměru 1:1 k hmotnosti konkrétního vzorku. Působení pufru probíhalo po dobu 10 minut v termobloku nastaveném na teplotu 55 °C za promíchávání vibrační třepačkou každé 2 minuty.

Po vizuální kontrole kompletního rozpuštění gelu byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu, a do směsi přidán izopropanol v poměru 1:1 k hmotnosti konkrétních vzorků. Takto smíchané vzorky byly vloženy do odstředivky na 30 vteřin při maximálních otáčkách.

Z rozpuštěných produktů bylo přeneseno 800 µl do zkumavek se silikátovými filtry, které byly následně vloženy do odstředivky na 1 minutu. Následně byly silikátové filtry s PCR produktem vloženy do čistých zkumavek, bylo přidáno 160 µl vazebného pufru a zkumavky vloženy do odstředivky na 1 minutu při max. otáčkách. Po odstředění byly silikátové filtry opět

vloženy do čistých zkumavek, promyty 700 μl promývacího pufru a vloženy do odstředivky na 1 minutu při max. otáčkách. Kvantita produktů byla ověřena UV spektrofotometrem.

4.5.2 Sekvenační reakce

Reakční směs pro sekvenační reakci byla stanovena následovně:

Komponent	Objem (μl)
purifikovaná DNA	5 μl
Sekvenační mix ABI	2 μl
1 μM primer F/R	3,2 μl
Sekvenační pufr ABI	4 μl
H ₂ O	5,8 μl

Tabulka 5: Reakční směs pro sekvenační reakci

4.5.3 Purifikace produktů sekvenační reakce a jejich fragmentace kapilární elektroforetickou separací

K produktům sekvenační reakce o objemu 20 μl byl přidán 96 % ethanol a 3M octan sodný v poměru 1:2:0,1. Reakční směs byla ponechána 15 minut při laboratorní teplotě a následně odstředěna při maximálních otáčkách po dobu 30 minut. Směs ethanolu a octanu sodného byla následně opatrně odsáta, aby nedošlo k odstranění vzorku DNA usazeného na dně zkumavek. Následně bylo k vzorkům přidáno 2 x 125 μl 70 % ethanolu a zkumavky vloženy do odstředivky na 15 minut při max. otáčkách. Tento krok byl následně zopakován. Po finálním odstranění ethanolu byly zkumavky se vzorky vloženy na 30 minut do termobloku nastaveného na teplotu 30 °C. Po evaporaci zbylého ethanolu byly vzorky rozpuštěny v 15 μl Hi-Di formamidu. Vzorky byly denaturovány v termocykleru při teplotě 95 °C po dobu 70 minut a následně ochlazeny 0 °C. Takto připravené vzorky byly použity pro separaci pomocí kapilární elektroforézy. Podmínky separace jsou uvedeny v tabulce 6.

Parametry sekvenace	Hodnoty přístroje
Délka kapiláry	50 cm
Modul	SeqPOP6 (1ml) E
Polymer	POP6
Virtuální filtr	E
Doba nástřiku	30 s
Napětí při nástřiku	2,5 kV
Teplota při separaci	50 °C
Napětí při separaci	11,3 kV
Doba separace	120 min

Tabulka 6: Parametry sekvenace přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

4.5.4 Interpretace sekvenace

Data získaná sekvenací byla převedena do programu BioEdit (Hall, ©1999-2005), kde byla následně analyzována. Kontrola kvality sekvenace byla uskutečněna srovnáním forwardové a reversní sekvence.

4.6 Statistické zpracování dat

Z výsledků jednotlivých analytických metod byla obdržena data o segregaci dominantní a recesivní alely sledovaného znaku ve výběrovém souboru (N) populace plemene československý vlčák. Z těchto dat byly na základě Hardy-Weinbergova zákona vypočteny absolutní (D, H, R) a relativní (d, h, r) frekvence genotypů dle níže uvedených vzorců.

$$N = D + H + R$$

$$d = \frac{D}{N} \quad h = \frac{H}{N} \quad r = \frac{R}{N}$$

Z frekvencí genotypů byly následně vypočteny absolutní (P, Q) a relativní (p, q) frekvence alel sledovaného znaku, dle uvedených vzorců.

$$2N = P + Q \quad p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$P = 2D + H \quad Q = 2R + H$$

$$p = \frac{2D+H}{2N} = \frac{P}{2N} \qquad q = \frac{2R+H}{2N} = \frac{Q}{2N}$$

Výběrový soubor byl rozdělen do skupin dle věku, pohlaví a původu, a mezi jednotlivými skupinami pak byla porovnána frekvence alel sledovaného znaku prostřednictvím neparametrického χ^2 testu a výpočtem pravděpodobnosti. Tyto výpočty byly provedeny v programu Statistica (StatSoft, 2013).

4.7 Vyhodnocení frekvencí alel genu *Fgf5* z pohledu populační genetiky

Z výsledků provedených analýz byla obdržena data, na základě kterých byla určena segregace alel. Tyto údaje byly následně hodnoceny z hlediska populační genetiky

4.7.1 Pozorovaná heterozygotnost (H_O)

Pozorovaná (observed) heterozygotnost je dána podílem počtu heterozygotních jedinců pro sledovaný znak, značený genetickým markerem, a celkového počtu výběrového souboru (Hartl et Clark, 2007). Výpočet pozorované heterozygotnosti byl proveden dle níže uvedeného vzorce (Gillet et al., 2005).

$$H_O = \sum_{i < j} p_{ij}$$

4.7.2 Očekávaná heterozygotnost (H_E)

Očekávaná (expected) heterozygotnost je dána podílem očekávaných heterozygotů v populaci, vykazující rovnováhu dle Hardy-Weinbergova zákona (Hamilton, 2009). Výpočet očekávané heterozygotnosti byl proveden dle níže uvedeného vzorce.

$$H_E = 1 - \sum p_i^2$$

4.7.3 Stupeň inbreedingu (F_{IS})

Předmětem studie diplomové práce bylo plemeno psa chovaného člověkem, z čehož lze předpokládat přítomnost selekce jedinců připouštěných k plemenitbě. Vzhledem k malé efektivní velikosti původní populace a následné selekce lze vyvodit teoretickou možnost vzniku inbreední populace. Pro analyzovaný gen *Fgf5* byl vypočten stupeň inbreedingu dle níže uvedeného vzorce (Li et Horvitz, 1953).

$$F_{IS} = \frac{H_E - H_O}{H_E}$$

4.7.4 Následky úplné selekce proti recesivně homozygotním jedincům

Fenotypový projev přítomnosti recesivní alely v obou kopiích genu *Fgf5* je nežádoucí a zejména pak v rozporu s plemenným standardem. Recesivní homozygoti ve sledovaném znaku proto nejsou připouštěni do plemenitby. Na základě Hardy-Weinbergova zákona bylo vypočteno předpokládané snižování frekvence recesivní alely v následujících 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19 a 20 generacích, při uplatnění úplné selekce vůči recesivním homozygotům ve sledovaném znaku. Dále bylo vypočteno, za kolik generací se frekvence recesivní alely sníží pod určitou hranici. Pro výpočty byly použity vzorce uvedeny níže.

$$q_n = \frac{q_0}{1 + nq_0}$$

$$t = \frac{1}{q_t} - \frac{1}{q_0}$$

4.8 Genealogická studie

Prostřednictvím mezinárodní databáze *WolfDog database* (2013) rodokmenů plemene československý vlčák, byli u jedinců s mutací alespoň v jedné kopii genu dohledáváni předci a z nich následně identifikován jeden společný.

5 Výsledky

Z analýz popsaných v kapitole 4. Materiál a metody byly zaznamenány a vyhodnoceny následující výsledky.

5.1 Navržení F a R primerů pro jednotlivé metody

Obě stanovené kandidátní sekvence mutací se nalézají na exonu 1 genu *Fgf5*. Pro zvýšení kvality a úspěšnosti amplifikace a následných analýz, byly dvojice primerů navrženy tak, aby výsledný produkt byl menší než celý exon 1, ale zároveň zahrnoval cílové sekvence.

5.1.1 Primery FGF5-284-F a FGF5-284-R pro restrikční štepení exonu 1

Tato dvojice primerů ohraničuje sekvenci o délce 180 bp. Primer FGF5-284-F je oligonukleotid o délce 23 bp, začínající na pozici 181 s následným pořadím nukleotidů:

5'...GTCTTCCTCTTCTTCCTCCGTCT...3'

Primer FGF-284-R je oligonukleotid o délce 20 bp, začínající na pozici 360 s následným pořadím nukleotidů:

3'...GAGCCATTGACTTTGCCATC...5'

- GO: Cellular component
- GO: Molecular function
- GO: Biological process
- Phenotypes
- Genetic Variation
 - Variant table
 - Variant image
 - Structural variants
- Gene expression
- Pathway
- Regulation
- External references
- Supporting evidence
- ID History
- Gene history

Configure this page

Custom tracks

Download sequence

Share this page

Bookmark this page

FGF5-201	ENSCAFT00000038532.2	873	270aa	Protein coding	F1PT52	NM_001048129 NP_001041594
FGF5-202	ENSCAFT00000014095.3	769	125aa	Protein coding	F1Q427	-

Marked-up sequence

Download sequence

BLAST this sequence

Exons FGF5 exons All exons in this region

Markup loaded

```

>chromosome: CanFam3.1:32:4508465:4529515:1
CGGGTGGGCGAGGTGGGCGAGGACGCGAGCTCCCTTCCCGTTTGGACCCCCCCCCAC
CCCCGGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGTTCGCGGTGCTGCTGCCCGGGGATTTCGTACG
CTCAGCGGAGCCGAGAATCANNNNNNNNNCCGAGCGCCGCGCAGCCTGGGCCCCAGCGA
GAGGGACGCGGGCGGCTCCGGAGGGCGCCGGGGTGCCTGGCCGGGTCTGCGCGTGCCC
GGCGTCGGGGTGCAGCTCGCGCCCTCCCGCTTCCCGTCCCGTCCCGTCCCGCTCCCGATCCC
CTCCCGCTGCACACCCCGCCCGGGGCGCCGGGCTCCCTCCCGCCCGCCGGGAG
AGTACACAAAGCGGGGGTGGGGGAAGCTTCGACGGCGTGCACGGAGCGGTGAGGTCAC
CGGCGGTATAAATATCCAGGACCCGCGCCGAGCCCGTTCGAGTGGCCTCCCGCTCGC
TCCCGCTCCCTCCTCCCGAGGCTATGTCCACCCGGGGCGGCGAGGGGGCAGCGCCA
GAGGCACGCGAGCCGCGGGGGTCCCGAGCCAGAACCGGCCCTACAAGATCGCTTAG
AGCCCCCGGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCAGCCACT
GATCCTCAGCGCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACC
CGCTGCCACCGCCGGAACCCGGGCGGCGGGCGGCGAGCAGCACCAGCGGGGGCAGCAG
FGF5-284-F GTCTTCTTCTTCTCCTCCGTCTCCTCCGCCCCGGGGCTTCGCGGGCATCCGAGGAAG
CGGCTCGGAGCAGGCAGCTTCCAGTGGAGCCCTCGGGCGCCGACCGGCAGCCTCTA
CTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGATGGCAAAGTCAATGGCTC FGF5-284-R
CCAGGAAGCCAATATGTTAAATAAGTTGCTCGCGCTCCCGGACAGCGCGTCTAAGCGG
ACGGCGGGGACCCGGGAGGGACCCGCTTGTITTTGCACCCTGGCGCCCTGGCCGCCCT
GGCCCTGGGACCCCGCCCGCTCGAAACCGCCGCGGGGGGGTGGGGTGGGGGGG

```

Obrázek 2: Pozice primerů FGF5-284-F a FGF5-284-R na sekvenci exonu 1 genu *Fgf5* získané z databáze Ensembl (Zerbino et al., 2018).

5.1.2 Primery FGF5-INDEL-F a FGF5-INDEL R pro fragmentační analýzu exonu 1

Tato dvojice primerů ohraničuje sekvenci o délce 124 bp. Primer FGF5-INDEL-F je oligonukleotid o délce 18 bp, začínající na pozici 77 s následným pořadím nukleotidů:

5'... GCTCACGGGGAGAAGCAC...3'

Primer FGF5-INDEL-R je oligonukleotid o délce 20 bp, začínající na pozici 200 s následným pořadím nukleotidů:

3'...CGGAGGAAGAAGAGGAAGAC...5'

Primer3 Output

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO          start  len  tm   gc%   any   3'  seg
LEFT PRIMER    77    18  61.98 66.67 5.00 0.00 GCTCACGGGGAGAAGCAC
RIGHT PRIMER   200   20  58.05 55.00 2.00 1.00 CGGAGGAAGAAGAGGAAGAC
SEQUENCE SIZE: 380
INCLUDED REGION SIZE: 380

PRODUCT SIZE: 124, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

   1  AGCCCCGCGGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCAGCCACCT
   61 GATCCTCAGCGCCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACC
      >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
  121 CGCTGCCACCGGCCGGAACCCGGGGCGGCGGGCGGCGAGCAGCACCAGCGGGGGCAGCAGC
  181 GTCTTCCTCTTCTTCCTCCGTCTCCTCCGCCCCGGGGCTTCGCCGGGCATCCGAGGAAG
      <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
  241 CGGCTCGGAGCAGGGCAGCTTCCAGTGGAGCCCCTCGGGGCGCCGGACCAGGCAGCCTCTA
  301 CTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGGATGGCAAAGTCAATGGCTC
  361 CCAGGAAGCCAATATGTTAA
```

Obrázek 3: Navržení primerů v programu Primer 3 (Koressaar et Remm, 2007) (Untergasser et al., 2012) FGF5-INDEL-F a FGF5-INDEL-R, pro fragmentační analýzu.

- GO: Cellular component
- GO: Molecular function
- GO: Biological process
- Phenotypes
- Genetic Variation
 - Variant table
 - Variant image
 - Structural variants
- Gene expression
- Pathway
- Regulation
- External references
- Supporting evidence
- ID History
 - Gene history

FGF5-201	ENSCAF00000038532.2	873	270aa	Protein coding	F1PT52	NM_001048129	NP_001041594
FGF5-202	ENSCAF00000014095.3	769	125aa	Protein coding	F1Q427	-	-

Marked-up sequence ?

Download sequence
BLAST this sequence

Exons FGF5 exons All exons in this region

Markup loaded

```

>chromosome: CanFam3.1:32:4508465:4529515:1
CGGGTGGGCGAGGTGGGCGAGGACGCGAGCTCCCTTCCCCGTTGGACCCCCCCCCAC
CCCCGGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGTTGCGGGTGCTGCTGCCGGGGATTTCGTACG
CTCGAGCGGAGCCGAGAATCNNNNNNNNNNCCGAGCGCCGCGCAGCCTGGGCCCCAGCGA
GAGGGACGCGGGGGGGCTCCGGAGGGCGGGGGTGCCTGGCCGGGTCTGCGCTGCC
GGCGTCGGGGTGCAGCTCGCGCCCTCCCGCTTCCCTCCCACTCGCCGCTCCTCCATCCC
CTCCCGCTGCACACCCCGCCCGGGGGCGCCGGGCTCCCTCCCGCCCGCGCGGGAG
AGTACACAAAGCGGGGGTGGGGGAAGCTTCGACGGCTGCACGGAGCGGTGAGGTCAC
CGGCGGTATAAATATCCCAGGACCCGCGCCGAGCCCGTTTCGAGTGGCCTCCCGCTCGC
TCCCGCTCCCTCTCCCGAGGCTATGTCCACCCGGGGCGGCGAGGGGGCAGCGCCA
GAGGCACGACCGCGGGGGGCTGCCAGCCAGAACCGCCCTACAAGATGCGCTTAG
AGCCCCGGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCAGCCACCT
FGF5-INDEL-F GATCCTCAGCGCTGCTCACGGGGAGAAGCAC}TCGCCCCCAAAGGGCAACCCGGACC
CGTGCACCCGGCCGAACCCGGGGCGCGGGCGGCAGCAGCACCAGCGGGGACAGAC
FGF5-INDEL-R GTCTTCCTCTTCTCCTCCG}TCTCCTCGCCCCGGGGCTTCGCCGGGCATCCGAGGAAG
CGGCTCGGAGCAGGCGAGCTTCCAGTGGAGCCCTCGGGCGCCGACCGGCGAGCCTCTA
CTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGGATGGCAAAGTCAATGGCTC
CCAGGAAGCCAATATGTTAAAGTAAGTTGCTCGCGCTCCCGGCAGAGCGGTCTTAAGCGG
ACGGCGGGGACCCGGGAGGACCGCGTTGTTTTGCACCCTGGCCGCTTGGCCGCTT
GGCCCTGGGACCCCGCCGCCCTCGAAAACCGCCGCGGGGGGGGTGGGGTGGGGGGG

```

Obrázek 4: : Pozice primerů FGF5-INDEL-F a FGF5-INDEL-R na sekvenci exonu 1 genu *Fgf5* získané z databáze Ensembl (Zerbino et al., 2018)

- GO: Molecular function
- GO: Biological process
- GO: Cellular component
- Phenotypes
- Genetic Variation
 - Variant table
 - Variant image
 - Structural variants
- Gene expression
- Pathway
- Regulation
- External references
- Supporting evidence
- ID History
 - Gene history

FGF5-201	ENSCRAFT00000038532.2	873	270aa	Protein coding	F1PT52	NM_001048129 NP_001041594
FGF5-202	ENSCRAFT00000014095.3	769	125aa	Protein coding	F1Q427	-

Marked-up sequence ?

[Download sequence](#)
[BLAST this sequence](#)

Exons FGF5 exons All exons in this region

Markup loaded

```

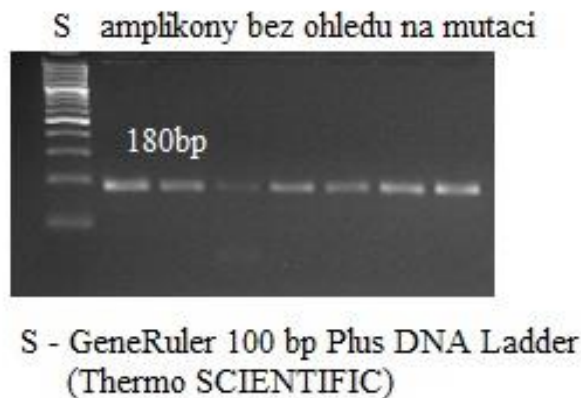
>chromosome:CanFam3.1:32:4508465:4529515:1
CGGGTGGGCGAGGTGGGCGAGGACGCGAGCTCCCTTCCCGTTTGGACCCCCCCCCAC
CCCCGCCCGGCCCCGGCCCGGCGCCGTTGCGGGTGTGCTGCCCGGGGATTTCGTACG
CTCGAGCGGAGCCGAGAATCANNNNNNNNNCCGAGCGCCGCGCAGCCTGGGCCCCAGCGA
GAGGACGCGGGGCGGCTCCGGAGGCGCGGGGGTGCSTGGCCGGGTCTGGCGTGCCC
GGCGTCGGGGTGCAGCTCGCGCCCTCCCGCTTCCCTCCCCTCGCGTCTCCCATCCC
CTCCCGCTGCACACCCCGCCCCGGGGCCGCGGGCTCCCTCCCGCCCCGGCCGGAG
AGTACACAAAGCGGCGGGTGAGGGGAAGCTTCGCAGGCGTGCACGGAGCGGTGAGGTCAC
CGGCGGTATAAATATCCCAGGACCCGCGCCGAGCCCCGTTTCGAGTGGCCTCCCGCTCGC
TCCCCCTCCCTCTCCTCCCGAGGCTATGTCCACCCGGGGCGGCGAGGGGGCAGCGCCA
GAGGCACGCGAGCCGCGGGGGCTGCCGAGCCAGAACCGGCCCTACAAGATGCGCTTAG
FGF5-EXON1-F AGCCCCCGCGGCTGGAAGAATGAGCTGTCCCTCCTCCTCCTCTTCTCAGCCACCT
GATCCTCAGCGCCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACC
CGCTGCCACCGGCCGGAACCCGGGCGGGCGGGCGGCGAGCAGCACCAGCGGGGCACGAC
GTCTTCTCTTCTTCTCCTCGTCTCCTCGGCCCGGGGGTTCGCCGGGCATCCGAGGAAG
CGGCTCGGAGCAGGGCAGCTTCCAGTGGAGCCCCCTCGGGGCGCCGACCGGCAGCCTCTA
FGF-EXON1-R CTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCGGATGGCAA|GTCAATGGCTC
CCAGGAAGCCAATATGTTAA|GTAAGTTGCTCGCGTCCCGGCAGAGCGGTCCTAAGCGG
ACGGCGGGGACCCGGGAGGACCGCGGTTGTTTTGCACCCCTGGCCGCCCTGGCCGCCCT
GGCCCTGGGACCCCGCGGCCCTCGAAACCGCGCGGGGGGGGTGGGGTGGGGGGC

```

Obrázek 6: Pozice primerů FGF5-EXON1-F a FGF5-EXON1-R na sekvenci exonu 1 genu *Fgf5* získané z databáze Ensembl (Zerbino *et al.*, 2018).

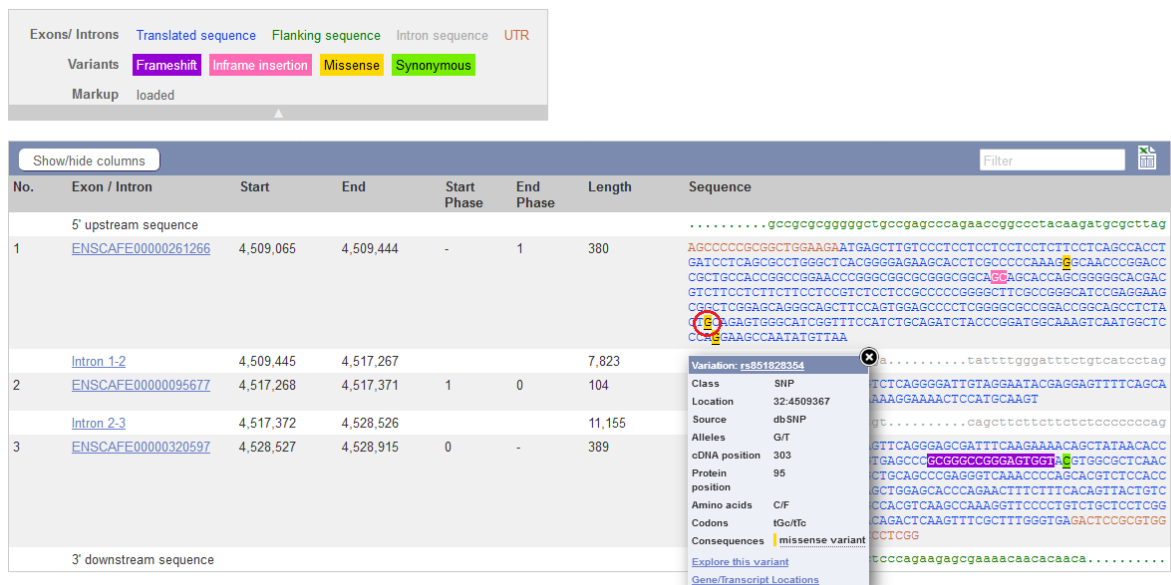
5.2 Detekce mutace FGF5:c.284G>T na exonu 1 restričním štěpením

Před samotným štěpením byla z elektroforeogramu odečtena velikost amplifikovaných produktů porovnáním s hmotnostním standardem. Z níže uvedeného elektroforeogramu je patrné, že velikost produktu amplifikace za použití primerů FGF5-284-F a FGF5-284-R se blíží 200 bp, tudíž proběhla úspěšně ve všech vzorcích.



Obrázek 7: Elektroforeogram ampliconů před restričním štěpením. Velikost odečtena od hmotnostního standardu (S)

Restriční enzym *Pst*1 rozpoznává palindromickou sekvenci 5'.CTGCAG 3'. Ta se v cílové sekvenci 180 bp vyskytuje ve dvou místech, a to na pozici 125 a 150. Polymorfismus substituce G>T se vyskytuje v první palindromické sekvenci.

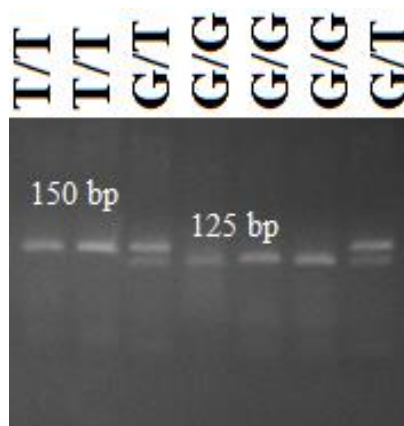


Obrázek 8: Pozice substituční mutace G>T v první palindromické sekvenci rozeznávané restričním enzymem *Pst*1. Nemutovaná sekvence alely (G) genu *Fgf5* na exonu 1 získána z databáze Ensembl (Zerbino et al., 2018).

U mutované (T) alely tedy dochází k rozštěpení fragmentu pouze v jednom místě a vznikají tak 2 fragmenty o velikosti 150 bp a 30 bp.

U nemutované (G) alely dochází ke štěpení ve dvou místech, a vznikají tak 3 fragmenty o velikosti 125bp, 25 bp a 30 bp.

Vizualizovatelné byly pouze fragmenty 150 bp a 125 bp, jelikož zbylé fragmenty (25 bp a 30 bp) nemají minimální potřebnou velikost pro detekci elektroforetickou separací na agarózovém gelu.



Obrázek 9: Elektroforeogram výsledků štěpení ampliconů restričním enzymem *Pst1*

Na výsledných elektroforeogramech byly odečteny velikosti rozštěpených fragmentů porovnáním s hmotnostním standardem s následujícími výsledky:

Počet (délka) fragmentů po <i>Pst1</i>	Počet vzorků
3 (125 bp/25 bp/30 bp)	340
3 (125 bp/25 bp/30 bp)/2 (150 bp/30 bp)	41
2 (150 bp/30 bp)	2

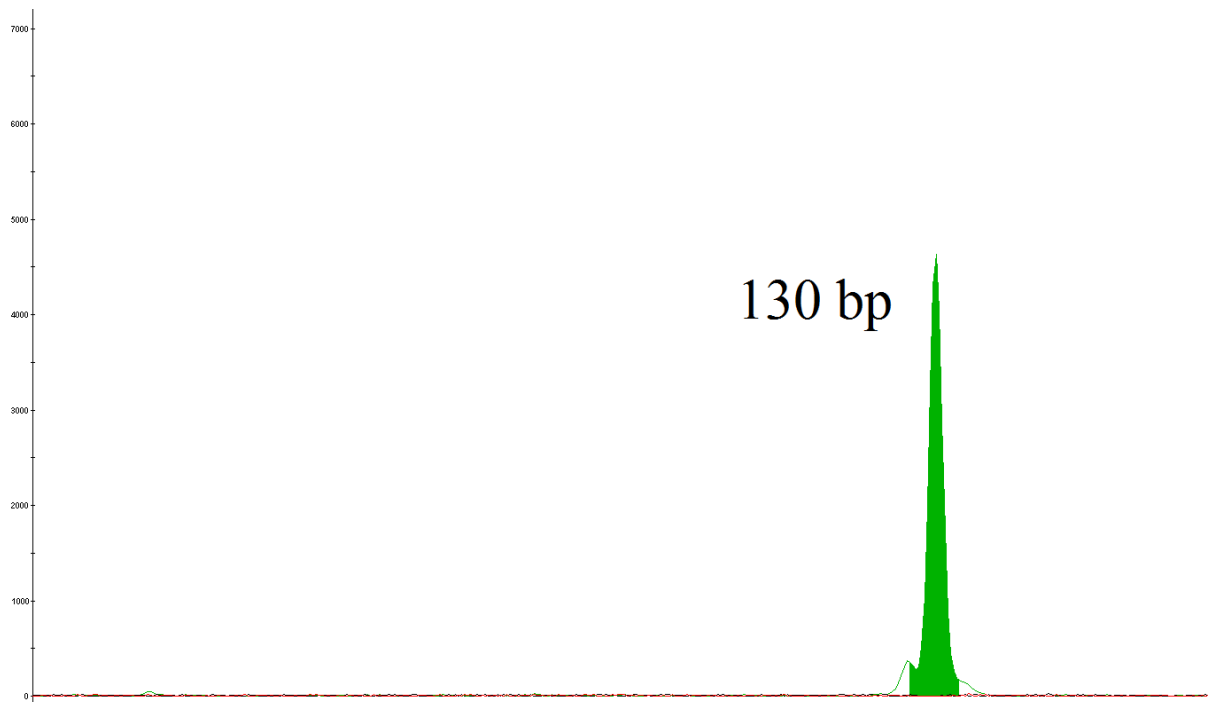
Tabulka 7: Výsledky štěpení restričním enzymem *Pst1*

Genotyp	Absolutní frekvence genotypu
<i>G/G</i>	340
<i>G/T</i>	41
<i>T/T</i>	2

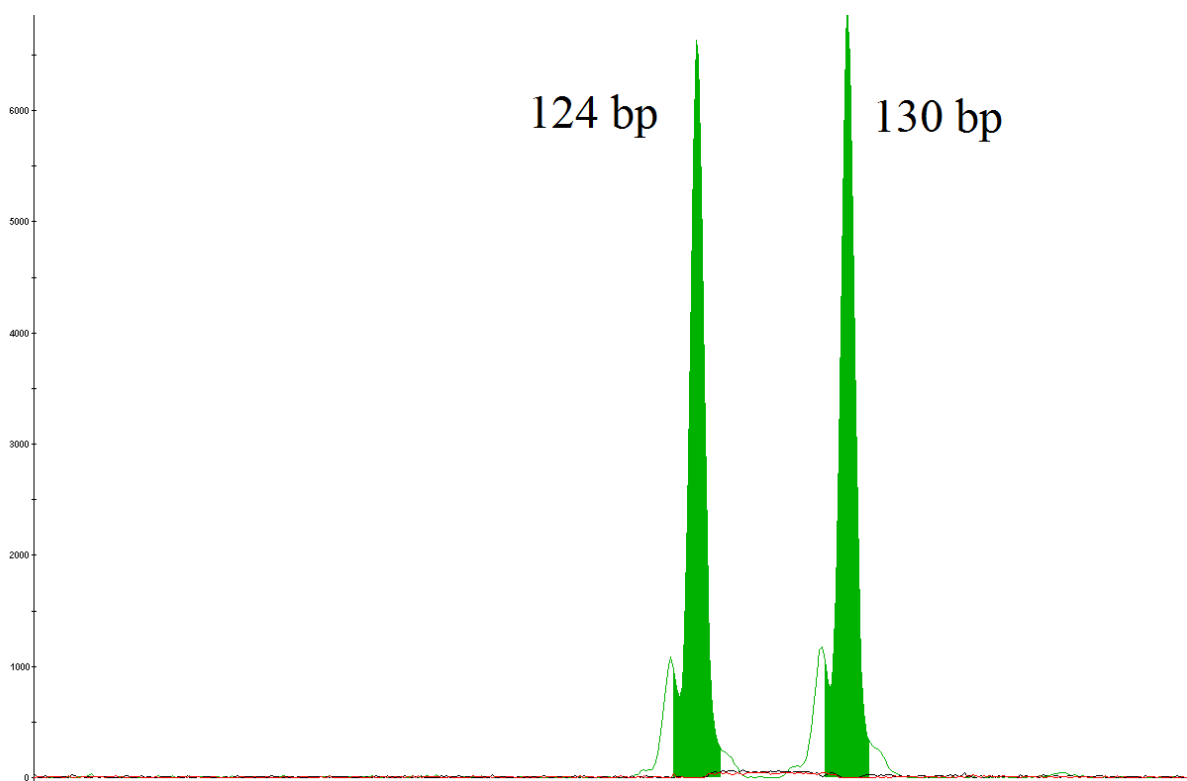
Tabulka 8: Absolutní frekvence genotypů získané na základě polymorfismu délky restričních fragmentů, s využitím SNP markeru substituce G284T

5.3 Detekce mutace FGF5:c.145_150dupACCAGC v exonu 1 fragmentační analýzou

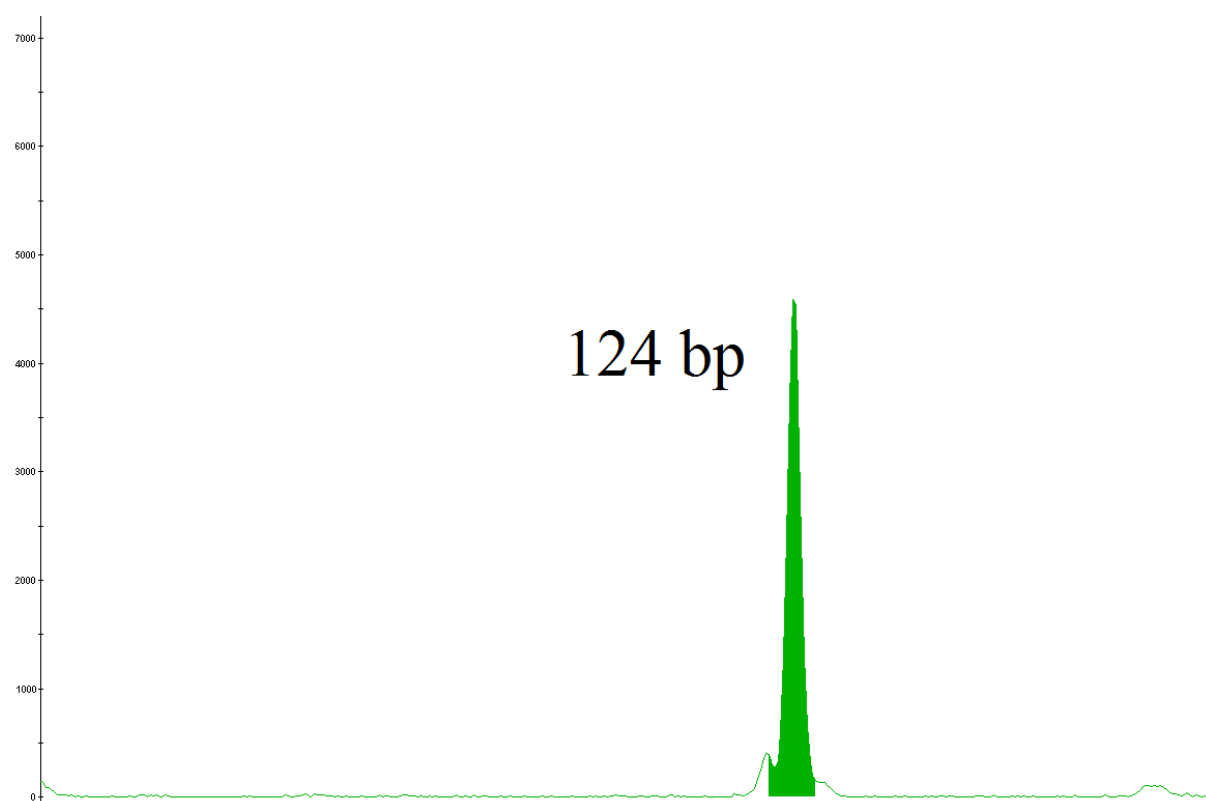
U vzorků DNA s primery FGF5-INDEL-F a FGF5-INDEL-R vyznačenou cílovou frekvencí byl sledován polymorfismus, s využitím duplikace 6 bp na pozici 145-156 exonu 1 genu *Fgf5* jako genetického markeru. Velikost ampliconů alel bez duplikace byla 124 bp. Velikost ampliconů s duplikací byla 130 bp. Zpracováním obdržných dat byly zjištěny genotypy všech jedinců pro sledovanou mutaci.



Obrázek 10: Výsledek fragmentační analýzy u dominantního homozygota (*InDel/InDel*) ve sledovaném znaku s velikostí alel 130 bp



Obrázek 11: Výsledek fragmentační analýzy u heterozygota (InDel/N) ve sledovaném znaku s velikostí alel 124 bp a 130 bp



Obrázek 12: Výsledek fragmentační analýzy u recesivního homozygota (N/N) ve sledovaném znaku s velikostí alel 124 bp

Jedinci, u kterých byla detekována duplikace alespoň v jedné kopii genu se shodovali s fenotypem dominantního homozygota.

Jedinců s genotypem dominantního homozygota *InDel/InDel* (duplikace v obou kopiích genu) pro sledovaný znak bylo 340. Heterozygotů *InDel/N* pro sledovaný znak (duplikace v jedné ze dvou alel) bylo 41, a recesivní homozygoti *N/N* ve sledovaném znaku (duplikace nebyla detekována ani jedné z alel) byli 2.

5.4 Porovnání výsledků restrikčního štěpení a fragmentační analýzy

Při srovnání výsledků z obou analýz bylo zjištěno, že genotyp dominantního homozygota *G/G* má stejný fenotypový projev jako dominantní homozygot *InDel/InDel*. Stejně tak recesivní homozygot *T/T* vykazuje stejný fenotypový projev jako recesivní homozygot *N/N*. Toto zjištění bylo porovnáno s výsledky sekvenační analýzy.

5.5 Detekce mutací sekvenační analýzou celého exonu 1

Osekvenované fragmenty ssDNA označené primery FGF5-EXON1-F a FGF-eXON1-R byly zpracovány v programu BioEdit (Hall, ©1999-2005). Srovnáním F a R fragmentů shodných vzorků na principu komplementarity, bylo potvrzeno, že sekvenace proběhla správně.

Zároveň bylo potvrzeno zjištění z předchozích dvou analýz.

V sekvenci exonu 1 genu *Fgf5* dominantního homozygota byla detekována duplikace 6 bp dlouhého úseku ACCAGC na pozici 155–167. Na pozici 301 se nacházel původní nukleotid G. Tato alela nevykazující mutaci typu substituce G>T byla označena *W* (wild).

```
5'...CGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCAG
CCACCTGATCCTCAGCGCCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCC
CAAAGGGCAACCCGACCCGCTGCCACCGGCCGGAACCCGGGCGGCG
CGGGCGGCAGCAGCACCAGCACCAGCGGGGGCACGACGTCTTCCTCTT
CTCCTCCGTCTCCTCCGCCCCCGGGCTTCGCCGGGCATCCGAGGAA
GCGGCTCGGAGCAGGGCAGCTTCCAGTGGAGCCCCTCGGGGCGCCGG
ACCGGCAGCCTCTACTGCAGAGTGGGCATCGGTTCCATCTGCAGATC
TACCCGGATGGCAAAGTCAATGGCTCCCAGGAAG...3'
```

Žlutě jsou označeny cílové sekvence pro nasedání primerů FGF5-EXON1-F (směr 5'→3') a FGF5-EXON1-R (směr 3'→5'). Zeleně je vyznačena duplikace 6 bp sekvence. Červeně je vyznačena pozice, kde dochází k substituci G>T u mutované alely.

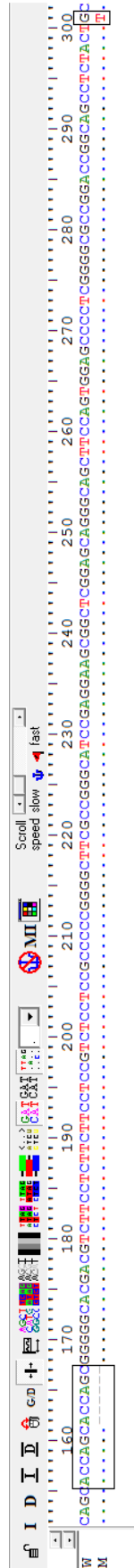
V sekvenci exonu 1 genu *Fgf5* recesivního homozygota duplikace na pozici 155-167 detekována nebyla. Na pozici 301 se nacházel SNP G>T. Tato alela vykazující polymorfismus G295T byla označena *m* (mutated).

```
5'...CGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCA
GCCACCTGATCCTCAGCGCCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCC
CCCAAAGGGCAACCCGGACCCGCTGCCACCGGCCGGAACCCGGGCG
GCGCGGGCGGCAGCAGCACCAGCGGGGGCACGACGTCTTCCTCTTCT
TCCTCCGTCTCCTCCGCCCCGGGGCTTCGCCGGGCATCCGAGGAAG
CGGCTCGGAGCAGGGCAGCTTCCAGTGGAGCCCCTCGGGGCGCCGG
ACCGGCAGCCTCTACTTCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGAT
CTACCCGGATGGCAAAGTCAATGGCTCCCAGGAAG...3'
```

Žlutě jsou označeny cílové sekvence pro nasedání primerů FGF5-EXON1-F (směr 5'→3') a FGF5-EXON1-R (směr 3'→5'). Zeleně je vyznačena oblast kde se u *m* alely duplikace 6 bp sekvence nenachází. Červeně je vyznačena pozice substituce G>T.

Alela *W* je dlouhá 366 bp. Alela *m* je dlouhá 360 bp. Rozdíl délky alely *W* a *m* je přesně 6 bp, které nejsou duplikovány v alele *m*.

U jedinců s heterozygotním genotypem byly detekovány oba polymorfismy, nikdy však na stejné alele. Heterozygoti mají obě alely *W* i *m*, pouze v jedné kopii.



Obrázek 13: Porovnání sekvence W a m alely ze softwaru BioEdit (Hall, ©1999-2005).

5.6 Shrnutí poznatků molekulární detekce

Dominantní homozygot pro oba detekované genetické markery nese alelu *W* ve dvou kopiích. V kandidátní sekvenci substituce $G>T$ je původní nukleotid *G*, tudíž jsou zachovány obě rozpoznávací sekvence pro restriční enzym *Pst*I. Při restričním štěpení ampliconů DNA s genotypem *G/G* ve sledovaném znaku vzniká produkt 3 fragmentů o velikosti 125 bp, 25 bp a 30 bp. Při fragmentační analýze genotypu *InDel/InDel* ve sledovaném znaku je výsledný fragment dlouhý 130 bp. Fenotypovým projevem genotypu *W/W* je krátká srst, dominantní pro plemeno československý vlčák.

Heterozygotní jedinci v obou detekovaných markerech nesou jednu kopii alely *W* a jednu kopii alely *m*. Při restričním štěpení ampliconu DNA s genotypem *G/T*, enzymem *Pst*I, vznikají dvě sady fragmentů 125 bp, 25 bp, 30 bp (*G*) a 150 bp, 30 bp (*T*). Při fragmentační analýze genotypu *InDel/N* jsou výsledkem dva fragmenty s rozdílnou velikostí 124 bp a 130 bp. Fenotypový projev genotypu *W/m* je stejný jako u dominantního homozygota *W/W*. Avšak bylo pozorováno hustší osrstění, zejména u samců v oblasti krku.

Recesivní homozygot v obou detekovaných markerech nese alelu *m* ve dvou kopiích. V kandidátní sekvenci substituce $G>T$ je nukleotid *T* namísto původního *G*, tudíž zaniká jedna rozpoznávací sekvence pro restriční enzym *Pst*I. Při restričním štěpení ampliconů DNA s genotypem *T/T* ve sledovaném znaku vzniká produkt 2 fragmentů o velikosti 150 bp a 30 bp. Při fragmentační analýze genotypu *N/N* ve sledovaném znaku je výsledný fragment dlouhý 124 bp. Fenotypovým projevem genotypu *m/m* je dlouhá srst, která je v rozporu s plemenným standardem československého vlčáka (1999) a tudíž nežádoucí v chovu.



Obrázek 14: Porovnání štěňat československého vlčáka. Pelo Lungo (na obou obrázcích vlevo) – recesivní homozygot s fenotypovým projevem dlouhé srsti. Pelo Normale (na obou obrázcích vpravo) – nese alespoň jednu nemutovanou dominantní alelu *W*, fenotyp odpovídá dominantní krátké srsti (Camatta, 2017).



Obrázek 15: Fenotypový projev dlouhé srsti genotypu recesivního homozygota (m/m) ve sledovaném znaku (autorka fotografie © Kristýna Čermáková 2018)

5.7 Hodnocení výběrového souboru z hlediska populační genetiky

Data z výše zmíněných analýz byla zaznamenána do tabulky (viz tabulka 20 v přílohách).

$$\begin{aligned} N &= 383 \\ D &= W/W \\ H &= W/m \\ R &= m/m \\ P &= W \\ Q &= m \end{aligned}$$

Genotyp	Absolutní frekvence genotypu	Relativní frekvence genotypu
<i>W/W</i>	340	0,8877
<i>W/m</i>	41	0,1071
<i>m/m</i>	2	0,0052

Tabulka 9: Absolutní a relativní frekvence genotypu *W/W*, *W/m* a *m/m*

Alela	Absolutní frekvence alel	Relativní frekvence alel
<i>W</i>	721	0,9412
<i>m</i>	45	0,0588

Tabulka 10: Absolutní a relativní frekvence dominantní alely *W* a recesivní alely *m*

Absolutní a relativní četnosti genotypu i alel byly využity pro výpočet pozorované a očekávané heterozygotnosti.

$$H_O = 0,1071$$

$$H_E = 0,1106$$

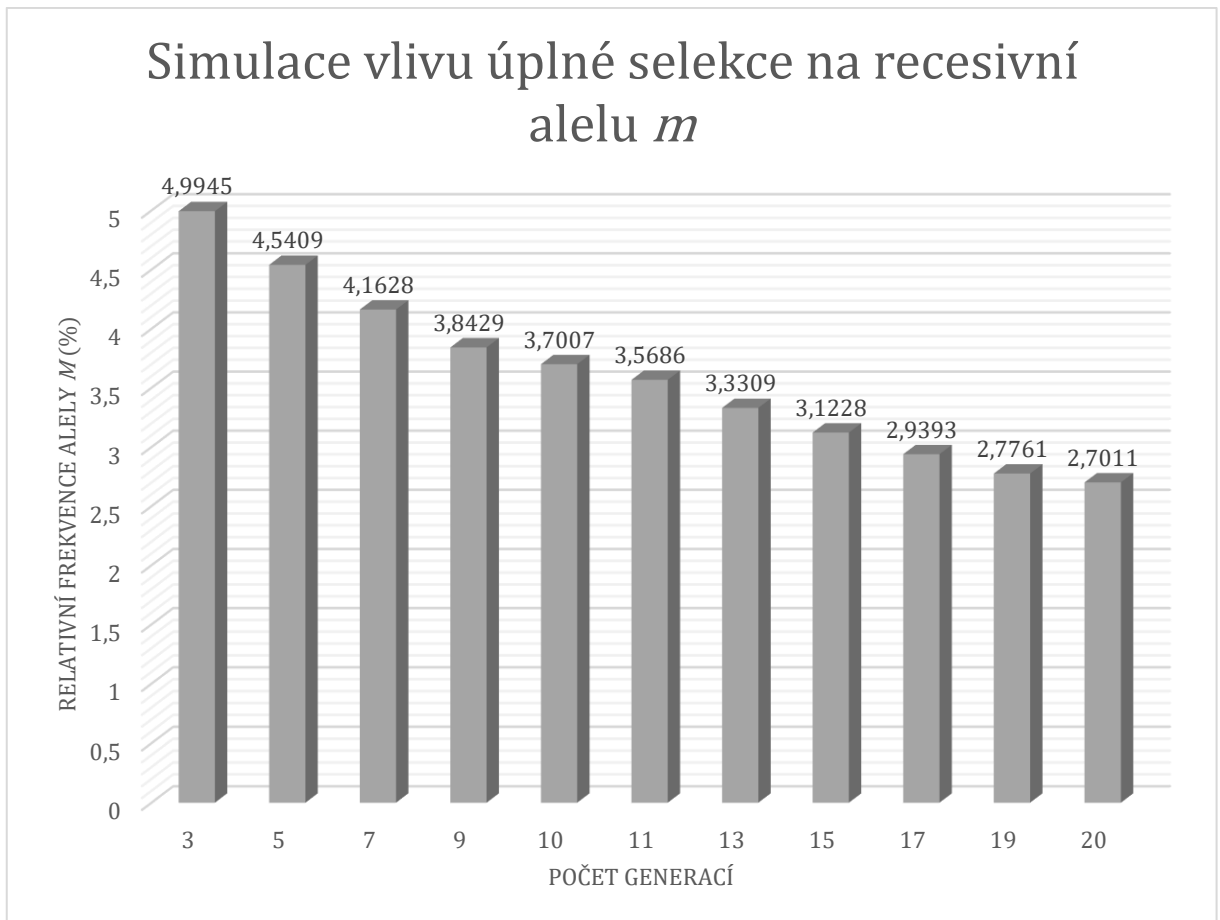
Výsledky pozorované a očekávané heterozygotnosti byly dále využity pro výpočet koeficientu inbreedingu.

$$F_{IS} = 0,0320$$

Velmi nízká hodnota F_{IS} značí, že testovaný výběrový soubor populace není ve sledovaném znaku inbreední.

Z relativní frekvence recesivní alely byly vypočítány očekávané relativní frekvence při tvrdé selekci po 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19 a 20 generacích.

$q_0 = 0,05875$, $q_3 = 0,0499$, $q_5 = 0,0454$, $q_7 = 0,0416$, $q_9 = 0,0384$, $q_{10} = 0,0370$,
 $q_{11} = 0,0357$, $q_{13} = 0,0333$, $q_{15} = 0,0312$, $q_{17} = 0,0294$, $q_{19} = 0,0278$, $q_{20} = 0,0270$



Graf 1: Matematická simulace vlivu úplné negativní selekce recesivních homozygotů m/m na relativní frekvenci alely m v následujících generacích

Fenotypový projev genotypu m/m je dlouhá srst, která je u plemene nežádoucí. Jedinci, kteří mají tento genotyp, jsou vyřazováni z chovu. Selektce vůči recesivní alele m tedy již probíhá. Z výše uvedeného grafu je patrná klesající relativní frekvence alely m . Pro snížení frekvence recesivní alely na 1 % ($q_t = 0,01$) by bylo nutno provádět tvrdou selekci vůči recesivní alele po 83 generací ($t = 82,9778$).

5.8 Statistické zpracování dat

Rozdělení výběrového souboru do skupin bylo vypracováno na základě informací (věk, pohlaví, země původu) o konkrétních jedincích z Wolfdog database (2013).

V první skupině byla data tříděna dle věku, a jedinci následně rozděleni dle stáří v měsících do tří kategorií.

Kategorie	Věk (v měsících)	Počet jedinců (N)	Absolutní frekvence genotypu
1	⟨1; 80⟩	138	D ₁ =123
			H ₁ =13
			R ₁ =2
2	⟨81; 120⟩	158	D ₂ =158
			H ₂ =18
			R ₂ =0
3	⟨121; 251⟩	87	D ₃ =77
			H ₃ =10
			R ₃ =0

Tabulka 11: Rozdělení výběrového souboru do tří kategorií dle věku v měsících, včetně zastoupení genotypů v jednotlivých kategoriích

Kategorie	Alela <i>W</i>		Alela <i>m</i>	
	P	p	Q	q
1	P ₁ =259	p ₁ =0,9384	Q ₁ =17	q ₁ =0,0616
2	P ₂ =298	p ₂ =0,9430	Q ₂ =18	q ₂ =0,0570
3	P ₃ =164	p ₃ =0,9425	Q ₃ =10	q ₃ =0,0575

Tabulka 12: Segregace dominantní alely *W* a recesivní alely *m* v jednotlivých věkových kategoriích, včetně absolutní a relativní frekvence obou alel

Byla stanovena nulová hypotéza, že není rozdíl mezi poměry segregací alel *W* a *m* v různých věkových skupinách testované populace ($\alpha=0,05$). Tato hypotéza byla testována χ^2 testem.

	Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3
Kategorie 1		$\chi^2=0,06$	$\chi^2=0,03$
		$p=0,8116$	$p=0,8577$
Kategorie 2	$\chi^2=0,06$		$\chi^2=0,00$
	$p=0,8116$		$p=0,9815$
Kategorie 3	$\chi^2=0,03$	$\chi^2=0,00$	
	$p=0,8577$	$p=0,9815$	

Tabulka 13: Vypočtené hodnoty χ^2 testu a hodnoty p pro jednotlivé věkové kategorie

Hodnoty χ^2 testu byly porovnány s kritickou hodnotou χ^2 testu ($k-1$) při 2 stupních volnosti, která je hladině významnosti $\alpha=0,05$ rovna 5,991. Žádná z vypočtených hodnot χ^2 nepřesáhla kritickou hodnotu. Hodnota p všech porovnávaných kategorií byla vyšší než α , tudíž nelze vyloučit nulovou hypotézu. Neexistuje statisticky prokazatelný rozdíl mezi poměry segregací alel W a m v různých věkových skupinách populace.

Ve druhé skupině byla data porovnávána v závislosti na pohlaví.

Pohlaví	Počet jedinců (N)	Absolutní frekvence genotypu
F	185	$D_F=168$
		$H_F=16$
		$R_F=1$
M	198	$D_M=172$
		$H_M=25$
		$R_M=1$

Tabulka 14: Rozdělení výběrového souboru do dvou kategorií dle pohlaví, a zastoupení genotypů

Pohlaví	Alela W		Alela m	
F	$P_F=352$	$p_F=0,09514$	$Q_F=18$	$q_F=0,0487$
M	$P_M=369$	$p_M=0,9318$	$Q_M=27$	$q_M=0,0682$

Tabulka 15: Segregace dominantní alely W a recesivní alely m u obou pohlaví, včetně absolutní a relativní frekvence obou alel

Byla stanovena nulová hypotéza, že neexistuje prokazatelný rozdíl mezi poměry segregací alel W a m v závislosti na pohlaví jedinců výběrového souboru ($\alpha=0,05$). Hypotéza byla ověřena χ^2 testem.

	F	M
F		$\chi^2=1,32$
F		$p=0,2506$
M	$\chi^2=1,32$	
M	$p=0,2506$	

Tabulka 16: Vypočtené hodnoty χ^2 testu a hodnoty p pro obě pohlaví

Hodnota χ^2 testu byla porovnána s kritickou hodnotou χ^2 testu ($k-1$) při 1 stupni volnosti, která je hladině významnosti $\alpha=0,05$ rovna 3,841. Vypočtená hodnota χ^2 nepřesáhla $k-1$. Hodnota p byla vyšší než α , tudíž nelze vyloučit nulovou hypotézu. Neexistuje statisticky prokazatelný rozdíl mezi poměry segregací alel W a m v závislosti na pohlaví.

Ve třetí skupině byla porovnáována data jedinců z České a Slovenské republiky s jedinci s ostatních zemí.

Původ	Počet jedinců (N)	Absolutní frekvence genotypu
CZ/SVK	233	$D_{CZ/SVK}=197$
		$H_{CZ/SVK}=34$
		$R_{CZ/SVK}=2$
FO	150	$D_{FO}=143$
		$H_{FO}=7$
		$R_{FO}=0$

Tabulka 17: Rozdělení výběrového souboru do dvou kategorií dle původu, a zastoupení genotypů

Původ	Alela <i>W</i>		Alela <i>m</i>	
	CZ/SVK	$P_{CZ/SVK}=428$	$p_{CZ/SVK}=0,9185$	$Q_{CZ/SVK}=38$
FO	$P_{FO}=293$	$p_{FO}=0,9767$	$Q_{FO}=7$	$q_{FO}=0,0233$

Tabulka 18: Segregace dominantní alely *W* a recesivní alely *m* u obou kategorií, včetně absolutní a relativní frekvence obou alel

Byla stanovena nulová hypotéza, že neexistuje prokazatelný rozdíl mezi poměry segregací v závislosti na zemi původu jedinců výběrového souboru ($\alpha=0,05$). Hypotéza byla ověřena χ^2 testem.

	CZ/SVK	FO
CZ/SVK		$\chi^2=11,18$ $p=0,0008$
FO	$\chi^2=11,18$ $p=0,0008$	

Tabulka 19: Vypočtené hodnoty χ^2 testu a hodnoty *p* pro obě kategorie

Hodnota χ^2 testu byla porovnána s kritickou hodnotou χ^2 testu ($k-1$) při 1 stupni volnosti, která je hladině významnosti $\alpha=0,05$ rovna 3,841. Vypočtená hodnota χ^2 přesáhla $k-1$. Hodnota *p* byla nižší než α , tudíž nulová hypotéza byla zamítnuta. Existuje statisticky prokazatelný rozdíl mezi poměry segregací alel *W* a *m* v závislosti na původu jedince.

5.9 Genealogická studie recesivních homozygotů a heterozygotů

U jedinců nesoucích alespoň jednu kopii mutované alely *m*, byl dohledán rodokmen v databázi československých vlčáků *Wolfdog database* (2013). U těchto jedinců byli v jejich rodokmenech vyhledáváni společní předci, kteří se opakovali a tvořili ucelenou linii. Při řešení této části bylo vycházeno z hypotézy, že donorem mutované alely způsobující dlouhou srst, je představitel německého ovčáka. Vzhledem k nízkému výskytu mutované alely v současné populaci československých vlčáků vyhledávání potenciálních donorů vycházelo z předpokladu, že původcem mutované alely byl pouze jeden reprezentant plemene německý

ovčák. Na následujícím obrázku je uveden vzorový výstup databáze Wolfdog database (2013), ve kterém jsou podchyceny původní hybridizace německých ovčáků a vlků.

Shortest distance of generations **DIST** Count in complete pedigree **COUNT**

	DIST	COUNT	%
Brita 1960-05-21 - Kurt z Václavky 1958-05-26 - Cezar z Březového háje	10	462	9.2 %
Argo 1968-00-00 - Asta z SNB	8	103	2.05 %
Šarik 1974-05-13 - Urta z Pohraniční stráže 1974-04-08 - Xela z Pohraniční stráže (F3)	7	140	2.79 %
Lejdy 1983-04-28 Bojar vom Schotterhof	8	1	0.02 %
Cezar z Březového háje 1958-05-26 - Brita	12	120	2.39 %
Kurt z Václavky 1960-05-21 - Brita	10	342	6.81 %
Asta z SNB 1968-00-00 - Argo	8	103	2.05 %
Bojar vom Schotterhof 1983-04-28 - Lejdy	8	1	0.02 %

Obrázek 16: Výstup z databáze Wolfdog database (2013) ukazující počet generací ke konkrétnímu předkovi

Ze 43 nositelů alespoň jedné kopie mutované alely *m* byl u 41 nalezen v 9-10 parentální generaci Kazan z pohraniční stráže. Tento pes byl F1 potomkem vlčice Lady a německého ovčáka Bojara vom Schotterhof, a byl hojně využíván v plemenitbě československého vlčáka. Na obrázku 17 je znázorněn výsledek analýzy rodokmenů, který odhalil předpokládané jediné křížení s donorem dlouhosrstosti. Rodokmenová analýza zároveň odhalila rodičovské páry, které poskytli dlouhosrsté štěně, a měli potenciálního nosiče mutované alely jak na straně feny, tak na straně otce

† **Bojar vom Schotterhof** ♂
German Shepherd

Gender: male
Data for registered users only

▶ Breeder Germany 🇩🇪

▶ Owner Slovakia 🇸🇰

▶ Siblings overall: 0

▼ Offspring overall: 1

1983-04-28 - Lejdy

†  ♂ Kazan z Pohraniční stráže (F1)

Obrázek 17: Výstup z databáze Wolfdog database (2013) pro německého ovčáka Bojara vom Schotterhor, který byl připuštěn s vlčicí Lady, a to pouze jednou. Potomkem F1 tohoto křížení byl pouze Kazan z Pohraniční stráže

Na základě molekulárních dat a výsledků rodokmenových studií byla ve spolupráci konzultantkou diplomové práce Ing. Danielou Čílovou a italským chovatelem československých vlčáků Alessiem Camattou vytvořena genová mapa sledující výskyt recesivní alely *m* v chovných liniích československého vlčáka.

6 Diskuze

Metodika práce byla navržena na základě předchozích studií polymorfismu genu *Fgf5* u mnoha živočišných druhů. Kandidátní mutace byly navrženy na základě výzkumu Housley et Venta (2006). Mutace detekované v obou pracích byly shodné, avšak lišily se svou polohou o 10-15 bp. Příčinou je rozdílný postup a cílová sekvence studie, která byla v této práci omezena pouze na exon 1, nikoliv celý gen *Fgf5*. Cílem práce bylo i navržení vlastních primerů pro analýzu, čímž byla posunuta pozice začátku amplifikace i sekvenace, a proto se produkt v obou pracích lišil svou velikostí i pozicemi mutací.

Gen *Fgf5* byl podroben třem různým molekulárně genetickým analytickým metodám. Restričním štěpení, fragmentační analýze a sekvenční analýze. Každá z těchto metod spolehlivě detekovala kandidátní polymorfismus, z čehož byl následně stanoven genotyp jedinců. Detekované polymorfismy FGF5:c.284G>T a FGF5:c.145_150dupACCAGC byly prokázány jako spolehlivé markery, jelikož výsledky získané třemi různými metodami spolu korespondovaly.

Gen *Fgf5* má u většiny živočichů funkci inhibitoru cyklu chlupového folikulu (Dierks et al., 2013) (Suzuki et al., 2000). Detekcí obou mutací a porovnáním s fenotypem genotypovaných jedinců byla prokázána kauzalita mutací FGF5:c.284G>T a FGF5:c.140_150dupACCAGC v genu *Fgf5* pro narušení jeho inhibiční aktivity u československých vlčáků.

U plemene československý vlčák je krátká srst děděna dominantně. Lze tedy předpokládat, že zde došlo k fixaci alely pro krátkou srst, jako je tomu u mnoha dalších krátkosrstých plemen (Housley et Venta, 2006). Dlouhá srst je u jedinců tohoto plemene nejen důvodem pro vyřazení z chovu dle plemenného standardu (FCI, 1999), ale i nežádoucím a nepraktickým znakem. Jedná se o plemeno pracovní, vyžadující velkou pohybovou aktivitu, a péče o dlouhou srst je nezbytná a velmi náročná. Československý vlčák má fenotypem připomínat vlka, pro které je typická krátká srst (letní srst) (FCI, 1999). I u vlka lze tedy předpokládat fixace alely pro krátkou srst jako dominantní. Tento fakt potvrzuje i studie Cadieu et al. (2009), ve které nebyly u žádného z testovaných vlků detekovány kauzální mutace popsané v předchozích pracích. Z těchto poznatků lze vyvodit závěr, že mutovanou alelu vnesl do populace některý z německých ovčáků použitý pro krytí vlků při vzniku plemene.

Genealogickou studií jedinců nesoucí mutovanou alelu alespoň v jedné kopii byli dohledáni předci až do první filiální a parentální generace ve Wolfdog database (2013). Porovnáním těchto rodokmenů byl u většiny jedinců zjištěn společný předek Kazan z první

filiální generace křížení vlčice Lady s německým ovčákem Bojarem vom Schotterhofem (Hartl et Jedlička, 1996). V předchozím odstavci byl vyvozen závěr, že mutovanou alelu vnesl do populace československých vlčáků německý ovčák. Jelikož téměř u všech jedinců byl společným předkem právě tento německý ovčák, lze předpokládat, že právě Bojar byl původním nositelem mutované alely. Jeho potomek Kazan byl následně hojně využíván v plemenitbě československých vlčáků na území České republiky (Hartl et Jedlička, 1996). Toto tvrzení potvrzuje i fakt, že Bojar byl použit ke krytí pouze jednou s výsledkem jednoho potomka v F1 generaci, čemuž odpovídá velmi nízká frekvence alely *m* v populaci československého vlčáka. Za prokazatelného nosiče mutované alely *m* by Bojar mohl být označen v případě, kdyby byl využíván v chovu německého ovčáka a plodil dlouhosrsté potomky, což bylo ověřováno v German Shepherd Dog Pedigree Database (2013). Tato databáze zahrnuje pouze jedince přijaté do chovu, a dlouhosrstí jedinci jsou z chovu vyřazováni na základě plemenného standardu německého ovčáka (2001), proto data nebylo možno dohledat. Vizuální porovnání fenotypu sourozenců, rodičů a potomků Bojara nebylo možné v důsledku nepřítomnosti fotodokumentace jedinců.

Pouze u dvou psů, kteří byli oba nositelné alely *m* alespoň v jedné kopii, nebyl prokázán výskyt Bojara v rodokmenu. Zajímavým zjištěním bylo, že tyto dva jedinci byli ve vztahu – polo sourozenci po společném otci. Jejich matky nebyly nositelkami mutované alely. Společný otec byl dodatečně genotypizován jako heterozygot *W/m*, přesto že v jeho rodokmenu se Bojar nevyskytuje. Vzhledem k tomu že se jednalo o jedinečnou situaci, která se vymykala vědecké hypotéze lze vyslovit následující možné teorie vysvětlující tento fakt:

- 1.) Rodokmen tohoto jedince uvedený ve *Wolfdog* database (2013) neodpovídá skutečnosti, a v jeho předcích mohlo dojít k nezaznamenanému nežádoucímu krytí s donorem mutované alely.

- 2.) Při vzniku československého vlčáka byl donorem mutované alely další německý ovčák a alela tohoto původu se projevila až u námi hodnocených potomků.

- 3.) U genu *Fgf5* těchto jedinců mohlo dojít k identické spontánní mutaci.

Analyzováním četností alel v různých geografických oblastech byl statisticky prokázán rozdíl poměrů segregace alel v České republice a na Slovensku vůči ostatním zemím.

Jak již bylo zmíněno, jedná se o relativně nové plemeno, které bylo zejména ze začátku stabilizováno příbuzenskou plemenitbou, při které klesá stupeň heterozygotnosti (Leroy, 2011). Kumulaci recesivních alel bylo zabráněno zejména přiléváním krve v počátcích šlechtitelského programu, vznikem nových linií (Hartl et Jedlička, 1996). Dodržování tohoto šlechtitelského programu společně s vysokou mírou heterozygotnosti vlčího genomu má za následek nízký

stupeň inbreedingu ve sledovaném znaku i přes malou efektní velikost populace (Smetanová et al., 2015). Tyto závěry byly potvrzeny výpočtem koeficientu inbreedingu z výběrového vzorku populace.

Nízká frekvence recesivních alel je dána i negativní selekcí po uznání československého vlčáka za oficiální plemeno, kdy jedinci přijímaní do chovu musí splňovat podmínky plemenného standardu (1999). Avšak v testované populaci byli přítomni i jedinci narození před nebo v době oficiálního uznání plemenného standardu a porovnáním s jedinci mladšími nebyl zjištěn statisticky prokazatelný rozdíl mezi poměry segregací alel v těchto věkových skupinách.

Vývoj frekvence recesivní alely je nutné sledovat po delší časový úsek. Z genealogické studie vyplývá fakt, že většina jedinců ve věku 7-10 let je vzdálená přibližně 10 generací od nejbližšího vlčího předka. Z analýzy vzorku populace z pohledu populační genetiky vyplývá, že za 10 generací klesne frekvence recesivní alely přibližně o 2,1 %, a to pouze v případě úplné selekce. Za současné frekvence výskytu recesivní alely (5,9%) by trvalo přibližně 83 generací, než by frekvence recesivní alely klesla pod 1 %. Vymizení recesivní alely je vysoce nepravděpodobné i přes negativní selekci vůči recesivním homozygotům. I přes vysoký počet dominantních homozygotů, počet heterozygotů není zanedbatelný stejně jako pravděpodobnost jejich vzájemného páření, ze kterého může vzejít v potomstvu recesivní homozygot (VonHoldt et al., 2013).

U heterozygotů se projevuje dominantní krátká srst (Cadiou et al., 2009) (Dierks et al., 2013) (Housley et Venta, 2006). Přesto bylo pozorováno, zejména u samců, hustší osrstění v oblasti krku, což může mít vliv na preference při vybírání psa pro připouštění. I přes tato pozorování nelze odlišit dominantního homozygota a heterozygota pouze podle fenotypu. Rozlišením genotypu třemi různými molekulárně genetickými metodami za využití detekovaných polymorfismů jako markerů se zabývala tato práce.

Pro eliminaci možnosti recesivních homozygotů v potomstvu za současného zachování plemenného standardu by bylo ideální pro chovatele připouštět k páření pouze dominantní homozygoty. To by však vedlo k postupnému snižování variability populace (Lynch et Walsh, 1998) a po čase pravděpodobně i inbreední depresi (Leroy, 2011). Ideálním postupem se jeví možnost genotypizace jedním z markerů uvedených v této práci a následné páření dominantního homozygota s heterozygotem. U plemene probíhá řízené připouštění, na které dohlíží poradce chovu, pro udržení inbreedingu na nízké úrovni. Pokud nedojde ke spontánní mutaci v zatím nemutované kopii genu, nemůže ze spojení dominantního homozygota a heterozygota vzejít v potomstvu recesivní homozygot (Dawson, 1934) (VonHoldt et al., 2013).

Snižování heterozygotnosti a tím i variability by nebylo tak prudké jako při výsadním křížení dominantních homozygotů.

Zajímavou myšlenkou je opačný postup, kdy by byli vzájemně kříženi pouze recesivní homozygoti. Někteří chovatelé uvádí, že dlouhosrstí českoslovenští vlčáci vykazují mírnější povahu. Při pozitivní selekci recesivních homozygotů by mohlo po čase dojít k fenotypovému odlišení od dominantních homozygotů a heterozygotů do takové míry, že by byli uznáni jako samostatné společenské plemeno. O podobné problematice se diskutovalo u plemene Akita-Inu a z něj odvozené plemeno americká Akita (Kaluzniacki, 2016). Je však otázkou, zda by si dlouhosrstí českoslovenští ovčáci našli přízeň mezi chovateli.

7 Závěr

Na začátku diplomové práce byly stanoveny vědecké hypotézy, které byly v průběhu práce potvrzeny.

Výsledky práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- Stanovením genotypu sledovaného znaku modelové populace 383 jedinců plemene československý vlčák molekulárně genetickými analýzami, a následné porovnání se známým fenotypem konkrétních jedinců, byla prokázána kauzalita mutací FGF5:c.284G>T a FGF5:c.145_150dupACCAGC v exonu 1 genu *Fgf5*, která má za následek fenotypový projev dlouhé srsti u tohoto plemene.
- Navržení konkrétních primerů pro molekulární detekci kauzálních mutací, metodami restrikčního štěpení (FGF5-284-F a FGF5-284-R), fragmentační analýzy (FGF5-INDEL-F a FGF5-INDEL-R) a sekvenační analýzy (FGF5-EXON1-F a FGF5-EXON1-R), umožnilo využití polymorfismů jako genetických markerů pro identifikaci alelických kombinací.
- Statistickým vyhodnocením molekulárních dat, a jejich zhodnocením z pohledu populační genetiky, byly zjištěny frekvence alel sledovaného znaku.
- Genealogickou studií jedinců, nesoucí alespoň jednu kopii mutované alely, byly v chovu nalezeny linie vedoucí ke společnému předkovi, Kazanovi z Pohraniční stráže, v F1 generaci původního křížení karpatského vlka a německého ovčáka.

V diplomové práci byl vypracován metodický postup pro odhalení nositelů mutované alely v populaci plemene československý vlčák. Práce byla poskytnuta jako doporučení pro chovatele a poradce chovu plemene československý vlčák, na relativně snadné snížení frekvence mutované alely v populaci plemene. Navržený postup není problematický a neovlivní genetickou variabilitu plemene.

8 Použitá literatura

Ahmadian, A., Ehn, M., Hober, S. 2006. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*. 363 (1-2). 83-94. DOI: 10.1016/j.cccn.2005.04.038. ISSN: 00098981.

Alberts , B., Johnson, A., Julian, L., Morgan, D., Martin, W. 2015. Analyzing an Manipulating DNA. Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff a Peter Walter. *Molecular biology of the cell* [online]. Sixth edition. Garland Science. New York, NY. s. 463 - 484. [cit. 2018-04-07]. ISBN: 978-0-8153-4432-2.

Alonso, L., Okada, H., Pasolli, H., Wakeham, A., You-Ten, A., Mak, T., Fuchs, E. 2005. Sgk3 links growth factor signaling to maintenance of progenitor cells in the hair follicle. *The Journal of Cell Biology* [online]. 170 (4). 559-570. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1083/jcb.200504131. ISSN: 0021-9525.

Ansorge, W. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*. 25 (4). 195-203. DOI: 10.1016/j.nbt.2008.12.009. ISSN: 18716784.

Bao, W., Yao, R., He, Q., Guo, Z., Bao, C., Wang, Y., Wang, Z. 2015. Cloning, molecular characterization, and expression pattern of FGF5 in Cashmere goat (*Capra hircus*). *Genetics and Molecular Research* [online]. 14 (3). 11154-11161. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.4238/2015.September.22.9. ISSN: 16765680.

Beyer, A., Bandyopadhyay, S., Ideker, T. 2007. Integrating physical and genetic maps: from genomes to interaction networks. *Nature Reviews Genetics*. 8 (9). 699-710. DOI: 10.1038/nrg2144. ISSN: 1471-0056.

Brody, J., Kern, S. 2004. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 333 (1). 1-13. DOI: 10.1016/j.ab.2004.05.054. ISSN: 00032697.

Burg, D., Yamamoto, M., Namekata, M., Haklani, J., Koike, K., Halasz, M. 2017. Promotion of anagen, increased hair density and reduction of hair fall in a clinical setting following identification of FGF5-inhibiting compounds via a novel 2-stage process. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. 10. 71-85. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.2147/CCID.S123401. ISSN: 1178-7015.

Cadiou, E., Neff, M., Quignon, P., Walsh, K., Chase, K., Parker, H., VonHoldt, B., Rhue, A., Boyko, A., Byers, A., Wong, A., Mosher, D., Elkahoul, A., Spady, T., Andre, C., Lark, K., Cargill, M., Bustamante, C., Wayne, R., Ostrander, E. 2009. Coat Variation in the Domestic Dog Is Governed by Variants in Three Genes. *Science* [online]. 326 (5949). 150-153. [cit. 2018-03-11]. DOI: 10.1126/science.1177808. ISSN: 0036-8075.

Callahan, C. 2004. MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. *Genes & Development* [online]. 18 (22). 2724-2729. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1101/gad.1221804. ISSN: 0890-9369.

Camatta, A. 2017. The Czekoslovakian Wolfdog with Long Hair. Italy.

Carlson, R. 2010. A Short History of Sequencing Technologies. Carlson, Robert H. *Biology is technology the promise, peril, and new business of engineering life* [online]. 1. Harvard University Press. Cambridge, Mass. s. 73-76. [cit. 2018-04-07]. ISBN: 9780674053625.

Clark, D., Pazdernik, N. 2012. Polymerase Chain Reaction. Clark, David P. a Nanette J. Pazdernik. *Molecular Biology* [online]. 2. Elsevier. Amsterdam. s. 164 - 190. [cit. 2018-04-07]. ISBN: 9780123785954.

Clegg, C. 1987. Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor. *The Journal of Cell Biology* [online]. 105 (2). 949-956. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1083/jcb.105.2.949. ISSN: 0021-9525.

Datta, S., Brunet, A., Greenberg, M. 1999. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes and Development*. 13. 2905-2927.

Dawson, W. 1934. Heredity in the dog. *Department of Agriculture Yearbook*. U.S. . 1315-1349.

Dierks, C., Mömke, S., Philipp, U., Distl, O. 2013. Allelic heterogeneity of FGF5 mutations causes the long-hair phenotype in dogs. *Animal Genetics* [online]. 44 (4). 425-431. [cit. 2018-03-11]. DOI: 10.1111/age.12010. ISSN: 02689146.

Drögemüller, C., Rüfenacht, S., Wichert, B., Leeb, T. 2007. Mutations within the FGF5 gene are associated with hair length in cats. *Animal Genetics* [online]. 38 (3). 218-221. [cit. 2018-03-11]. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2007.01590.x. ISSN: 0268-9146.

FCI-Standard N° 166/30.08.91/D: GERMAN SHEPHERD. 2001. 1. FCI Mandatory Commissions. Thuin.

FCI-Standard N° 332: CZECHOSLOVAKIAN WOLFDOG. 1999. 1. vydání. FCI mandatory Commissions. Thuin.

Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L., Fuchs, E. 1998. De Novo Hair Follicle Morphogenesis and Hair Tumors in Mice Expressing a Truncated β -Catenin in Skin. *Cell* [online]. 95 (5). 605-614. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81631-1. ISSN: 00928674.

Gillet, E., Gömöry, D., Paule, L. 2005. Measuring genetic variation within and among population. Geburek, Thomas a Jozef Turok. *Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe*. 1st edition. Arbora Publishers. Zvolen. s. 693. ISBN: 80-967088-1-3.

Glenn, T. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*. 11 (5). 759-769. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x. ISSN: 1755098x.

Goldfarb, M., Bates, B., Drucker, B., Hardin, J., Haub, O. 1991. Expression and Possible Functions of the FGF-5 Gene. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 638 (1). 38-52. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb49016.x. ISSN: 0077-8923.

Green, M., Couchman, J. 1984. Distribution of Epidermal Growth Factor Receptors in Rat Tissues During Embryonic Skin Development, Hair Formation, and the Adult Hair Growth Cycle. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 83 (2). 118-123. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12263298. ISSN: 0022202X.

Hamilton, M. 2009. *Population genetics*. Wiley-Blackwell. Hoboken, NJ. ISBN: 978-1-4051-3277-0.

Hansen, L., Alexander, N., Hogan, M., Sundberg, J., Dlugosz, A., Threadgill, D., Manguson, T., Yuspa, S. 1997. Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development. *American Journal of Pathology*. © American Society for Investigative Pathology. Rockville. 150 (6). 1959-1975.

Hartl, D., Clark, A. 2007. *Principles of population genetics*. 4th ed. Sinauer Associates. Sunderland, Mass. ISBN: 978-0878933082.

Hartl, K., Jedlička, J. 1996. *Československý vlčák*. 1. vydání. Loba. Praha. ISBN: 80-239-1107-4.

Hattori, Y., Yamasaki, M., Itoh, N. 1996. The rat FGF-5 mRNA variant generated by alternative splicing encodes a novel truncated form of FGF-5. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* [online]. 1306 (1). 31-33. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1016/0167-4781(19)60001-1. ISSN: 01674781.

Haub, O., Drucker, B., Goldfarb, M. 1990. Expression of the murine fibroblast growth factor 5 gene in the adult central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 87 (20). 8022-8026. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1073/pnas.87.20.8022. ISSN: 0027-8424.

Hébert, J., Rosenquist, T., Götz, J., Martin, G. 1994. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: Evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* [online]. 78 (6). 1017-1025. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90276-3. ISSN: 00928674.

Hébert, J., Basilico, C., Goldfarb, M., Haub, O., Martin, G. 1990. Isolation of cDNAs encoding four mouse FGF family members and characterization of their expression patterns during embryogenesis. *Developmental Biology* [online]. 138 (2). 454-463. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1016/0012-1606(90)90211-Z. ISSN: 00121606.

He, X., Yuan, C., Chen, Y. 2014. Isolation, characterization, and expression analysis of FGF5 isoforms in cashmere goat. *Small Ruminant Research* [online]. 116 (2-3). 111-117. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2013.10.020. ISSN: 09214488.

- Higgins, C., Petukhova, L., Harel, S., Ho, Y., Drill, E., Shapiro, L., Wajid, M., Christiano, A. 2014. FGF5 is a crucial regulator of hair length in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 111 (29). 10648-10653. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1073/pnas.1402862111. ISSN: 0027-8424.
- Housley, D., Venta, P. 2006. The long and the short of it: evidence that FGF5 is a major determinant of canine 'hair'-itability. *Animal Genetics* [online]. 37 (4). 309-315. [cit. 2018-03-11]. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2006.01448.x. ISSN: 0268-9146.
- Chen, Z., Wang, Z., Xu, S., Zhou, K., Yang, G. 2013. Characterization of hairless (Hr) and FGF5 genes provides insights into the molecular basis of hair loss in cetaceans. *BMC Evolutionary Biology* [online]. 13 (1). 34-. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1186/1471-2148-13-34. ISSN: 1471-2148.
- Choi, H., Choi, G., Kim, E., Choi, Y., Sohn, K., Lee, Y., Kim, C., Yoon, T., Sohn, H., Han, S., Kim, S., Lee, J., Lee, Y. 2011. Hair greying is associated with active hair growth. *British Journal of Dermatology* [online]. 165 (6). 1183-1189. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10625.x. ISSN: 00070963.
- Itoh, N., Ornitz, D. 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics* [online]. 20 (11). 563-569. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1016/j.tig.2004.08.007. ISSN: 01689525.
- Jahoda, C., Horne, K., Oliver, R. 1984. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature* [online]. 311 (5986). 560-562. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1038/311560a0. ISSN: 0028-0836.
- Johnson, G. 2002. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*. 298 (5600). 1911-1912. DOI: 10.1126/science.1072682. ISSN: 00368075.

Kawano, M., Komi-Kuramochi, A., Asada, M., Suzuki, M., Oki, J., Jiang, J., Imamura, T. 2005. Comprehensive Analysis of FGF and FGFR Expression in Skin: FGF18 Is Highly Expressed in Hair Follicles and Capable of Inducing Anagen from Telogen Stage Hair Follicles. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 124 (5). 877-885. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23693.x. ISSN: 0022202X.

Kehler, J., David, V., Schäffer, A., Bajema, K., Eizirik, E., Ryugo, D., Hannah, S., O'Brien, S., Menotti-Raymond, M. 2007. Four Independent Mutations in the Feline Fibroblast Growth Factor 5 Gene Determine the Long-Haired Phenotype in Domestic Cats. *Journal of Heredity* [online]. 98 (6). 555-566. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1093/jhered/esm072. ISSN: 1465-7333.

Kishimoto, J., Burgeson, R., Morgan, B. 2000. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes and Development*. 14 (10). 1181-1185.

Koressaar, T., Remm, M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* [online]. 23 (10). 1289-1291. [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm091. ISSN: 1367-4803.

Kumar, M., Chapman, S. 2012. Cloning and expression analysis of Fgf5, 6 and 7 during early chick development. *Gene Expression Patterns*. 12 (7-8). 245-254. ISSN: 1567-133X.

Lavker, R., Sun, T., Oshima, H., Barrandon, Y., Akiyama, M., Ferraris, C., Chevalier, G., Favier, B., Jahoda, C., Dhouailly, D., Panteleyev, A., Christiano, A. 2003. Hair Follicle Stem Cells. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* [online]. 8 (1). 28-38. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12169.x. ISSN: 10870024.

Legrand, R., Tiret, L., Abitbol, M. 2014. Two recessive mutations in FGF5 are associated with the long-hair phenotype in donkeys. *Genetics Selection Evolution* [online]. 46 (1). -. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1186/s12711-014-0065-5. ISSN: 1297-9686.

Leroy, G. 2011. Genetic diversity, inbreeding and breeding practices in dogs: Results from pedigree analyses. *The Veterinary Journal* [online]. 189 (2). 177-182. [cit. 2018-04-13]. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.06.016. ISSN: 10900233.

Lewis, M. 2015. Agarose gel electrophoresis: Basic metod. *Methodbook* [online]. Department of Pathology. Liverpool. [cit. 2018-04-07].

- Li, C., Horvitz, D. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*. 5 (2). 107-117.
- Little, C. 1934. Inheritance in Toy Griffon. *Journal of Heredity* [online]. 25 (5). 198-200. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a103919. ISSN: 1465-7333.
- Lynch, M., Walsh, B. 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits*. 13. Sinauer. Sunderland, Mass. ISBN: 978-0878934812.
- Mellersh, C., Hitte, C., Richman, M., Vignaux, F., Priat, C., Jouquand, S., Werner, P., André, C., DeRose, S., Patterson, D., Ostrander, E., Galibert, F. 2000. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammalian Genome*. 11 (2). 120-130. DOI: 10.1007/s003350010024. ISSN: 0938-8990.
- Miyamoto, M., Naruo, K., Seko, C., Matsumoto, S., Kondo, T., Kurokawa, T. 1993. Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 13 (7). 4251-4259. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1128/MCB.13.7.4251. ISSN: 0270-7306.
- Müller-Röver, S., Foitzik, K., Paus, R., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmüller, S., McKay, I., Stenn, K. 2001. A Comprehensive Guide for the Accurate Classification of Murine Hair Follicles in Distinct Hair Cycle Stages. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 117 (1). 3-15. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.01377.x. ISSN: 0022202X.
- Nucleics, . 2016. DNA Sequencing Protocol Tips. *Nucleics* [online]. Nucleics. Sydney. [cit. 2018-04-08].
- Orr - Urtreger, A., Givol, D., Yayon, A., Yarden, Y., Lonai, P. 1991. Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. *Development*. 113 (4). 1419-1434.
- Oulion, S., Bertrand, S., Escriva, H. 2012. Evolution of the FGF Gene Family. *International Journal of Evolutionary Biology* [online]. 2012. 1-12. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1155/2012/298147. ISSN: 2090-8032.

Pallotti, S., Pediconi, D., Subramanian, D., Molina, M., Antonini, M., Morelli, M., Renieri, C., La Terza, A. 2018. Evidence of post-transcriptional readthrough regulation in FGF5 gene of alpaca. *Gene* [online]. 647. 121-128. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1016/j.gene.2018.01.006. ISSN: 03781119.

Pennycuik, P., Raphael, K. 1984. The angora locus (*go*) in the mouse: hair morphology, duration of growth cycle and site of action. *Genetical Research* [online]. 44 (03). 283-. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1017/S0016672300026525. ISSN: 0016-6723.

Philpott, M., Sanders, D., Kealey, T. 1994. Effects of Insulin and Insulin-Like Growth Factors on Cultured Human Hair Follicles: IGF-I at Physiologic Concentrations Is an Important Regulator of Hair Follicle Growth In Vitro. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 102 (6). 857-861. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12382494. ISSN: 0022202X.

Roberts, M., Mickelson, J., Patterson, E., Nelson, T., Armstrong, J., Brunson, D., Hogan, K. 2001. Autosomal Dominant Canine Malignant Hyperthermia Is Caused by a Mutation in the Gene Encoding the Skeletal Muscle Calcium Release Channel (RYR1). *American Journal of Human Genetics*. Univ Chicago Press. Chicago. 69 (4). 716-725. ISSN: 0002-9297.

Roca, A., Ishida, Y., Nikolaidis, N., Kolokotronis, S., Fratpietro, S., Stewardson, K., Hensley, S., Tisdale, M., Boeskorov, G., Greenwood, A. 2009. Genetic variation at hair length candidate genes in elephants and the extinct woolly mammoth. *BMC Evolutionary Biology* [online]. 9 (1). 232-. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1186/1471-2148-9-232. ISSN: 1471-2148.

Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239 (4839). 487-491. DOI: 10.1126/science.2448875.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230 (4732). 1350-1354. DOI: 10.1126/science.2999980. ISSN: 0036-8075.

Scott, J. 1964. Genetics and the Social Behavior of the Dog. *American Zoologist* [online]. 4 (2). 161-168. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1093/icb/4.2.161. ISSN: 0003-1569.

- Schmidt-Ullrich, R., Paus, R. 2005. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays*. 27 (3). 247-61. DOI: 10.1002/bies.20184.
- Smetanová, M., Černá Bolfíková, B., Randi, E., Caniglia, R., Fabbri, E., Galaverni, M., Kutal, M., Hulva, P., Mishmar, D. 2015. From Wolves to Dogs, and Back: Genetic Composition of the Czechoslovakian Wolfdog. *PLOS ONE* [online]. 10 (12). 0143807-. [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1371/journal.pone.0143807. ISSN: 1932-6203.
- Stellwagen, N. 2009. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *ELECTROPHORESIS*. 30 (1). 188-195. DOI: 10.1002/elps.200900052. ISSN: 01730835.
- Suzuki, S., Ota, Y., Ozawa, K., Imamura, T. 2000. Dual-Mode Regulation of Hair Growth Cycle by Two Fgf-5 Gene Products. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 114 (3). 456-463. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00912.x. ISSN: 0022202X.
- Thompson, J., Steinmann, K. 2001. Single Molecule Sequencing with a HeliScope Genetic Analysis System. Ausubel, Frederick M. (ed.), Roger Brent (ed.), Robert E. Kingston (ed.), David D. Moore (ed.), J.G. Seidman (ed.), John A. Smith (ed.) a Kevin Struhl (ed.). *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ, USA. [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1002/0471142727.mb0710s92. ISBN: 0471142727.
- vonHoldt, B., Pollinger, J., Earl, D., Parker, H., Ostrander, E., Wayne, R. 2013. Identification of recent hybridization between gray wolves and domesticated dogs by SNP genotyping. *Mammalian Genome* [online]. 24 (1-2). 80-88. [cit. 2018-04-13]. DOI: 10.1007/s00335-012-9432-0. ISSN: 0938-8990.
- Zhang, L., He, S., Liu, M., Liu, G., Yuan, Z., Liu, C., Zhang, X., Zhang, N., Li, W. 2015. Molecular cloning, characterization, and expression of sheep FGF5 gene. *Gene* [online]. 555 (2). 95-100. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1016/j.gene.2014.10.036. ISSN: 03781119.

9 Internetové zdroje

BLAST®. 2018. National Center for Biotechnology Information [online]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Bethesda. [cit. 2018-04-12]. Dostupné z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BLASTSearch&LINK_LOC=blasthome>

German Shepherd Dog Pedigree Database [online]. 2013. ©pedigreedatabase.com. Reykjavik. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <http://www.pedigreedatabase.com/german_shepherd_dog/>

Hall, T. ©1999-2005. BioEdit. Biological sequence alignment editor [online]. Ibis Therapeutics. Carlsbad. [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>

Kaluzniacki, S. 2016. The Akita Dilemma – One Breed or Two?: : a historical perspective. Dostupné také z: <http://www.tamarlane.com/dillema.htm>

Primer Search. 2018. BOLDSystem [online]. S. Herbert. Canada. [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: <http://www.boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch>

Ratnasingham, S., Hebert, P. 2007. Barcoding: bold. Molecular Ecology Notes. 7 (3). 355-364. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x. ISSN: 14718278.

REBASE: The Restriction Enzyme Database [online]. 2009. New England Biolabs. Ipswich. [cit. 2016-04-07]. Dostupné z: <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

Roberts, R., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. 2009. REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. Nucleic Acids Research. 38 (). 234-236. DOI: 10.1093/nar/gkp874. ISSN: 0305-1048. Dostupné také z: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkp874>>

StatSoft, I. 2013. Electronic Statistic Textbook. In: StatSoft Statistica version 12 [online]. StatSoft. Tulsa. [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: <<http://www.statsoft.com/textbook/>>

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B., Remm, M., Rozen, S. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* [online]. 40 (15). 115-115. [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1093/nar/gks596. ISSN: 1362-4962. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gks596>>
Wolfdog database [online]. 2013. [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: <<http://www.wolfdog-database.com>>

Zerbino, D., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M., Barrell, D., Bhai, J., Billis, K., Cummins, C., Gall, A., Girón, C., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O., Janacek, S., Juettemann, T., To, J., Laird, M., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D., Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Ong, C., Parker, A., Patricio, M., Riat, H., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D., Trevanion, S., Aken, B., Cunningham, F., Yates, A., Flicek, P. 2018. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research* [online]. 46 (1). 754-761. [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1093/nar/gkx1098. ISSN: 0305-1048. Dostupné z: <<http://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D754/4634002>>

10 Přílohy

Tabulka 20: Výsledky zjišťování genotypu u 383 jedinců československého vlčáka restrikcí štěpením, fragmentační analýzou a sekvenací. Genealogickou studií bylo z databáze československých vlčáků Wolfdog database (2013) zjištěno datum narození, pohlaví a země původu. Věk v měsících byl vypočten k datu 31.12.2017

Číslo vzorku	Genotyp	Datum narození	Věk v měsících	Pohlaví	Země
4	W/W	40511	85	F	CZE
8	m/m	42036	34	M	CZE
9	m/m	43068	1	F	CZE
16	W/W	42702	13	M	CZE
20	W/W	39725	110	F	LTU
21	W/W	37278	191	F	CZE
24	W/W	40282	92	F	LTU
27	W/W	40531	84	M	SVK
35	W/W	39440	120	M	CZE
37	W/W	40360	89	M	CZE
39	W/W	40084	99	F	ITA
55	W/W	39368	122	F	CZE
67	W/W	39056	132	M	SVK
78	W/W	39059	132	M	CZE
93	W/m	39034	133	M	POL
97	W/m	37904	170	F	CZE
98	W/W	39087	131	F	HUN
100	W/W	36773	207	F	CZE
101	W/W	39639	113	F	CZE
102	W/W	35459	251	F	CZE
104	W/m	38705	144	M	CZE
105	W/W	39748	110	F	CZE
106	W/W	37548	182	M	ITA
107	W/W	37935	169	F	HUN
108	W/W	37407	187	F	CZE
110	W/W	40164	96	F	CZE
111	W/W	39458	119	F	POL
112	W/W	39783	108	F	CZE
113	W/m	40197	95	M	SVK
117	W/W	37586	181	F	POL
123	W/W	39987	102	F	POL
126	W/m	36661	211	F	CZE
127	W/W	39759	109	F	CZE
128	W/W	40481	86	F	CZE
129	W/W	40481	86	f	CZE

130	W/W	40481	86	f	CZE
131	W/W	40481	86	F	CZE
132	W/m	40481	86	F	CZE
133	W/W	40481	86	F	CZE
134	W/W	40481	86	F	CZE
135	W/W	40481	86	F	CZE
136	W/W	40481	86	F	CZE
137	W/W	40481	86	M	CZE
138	W/W	40481	86	M	CZE
149	W/W	40543	84	M	POL
157	W/m	39767	109	M	CZE
158	W/W	39988	102	M	CZE
159	W/m	40172	96	M	CZE
160	W/W	40554	83	M	POL
161	W/W	39144	129	M	POL
164	W/W	40404	88	F	POL
165	W/W	39786	108	F	POL
166	W/W	39485	118	F	SVK
167	W/W	40157	96	F	POL
168	W/W	40282	92	M	LTU
169	W/W	38813	140	F	LTU
170	W/W	40282	92	M	LTU
173	W/W	39548	116	M	LTU
174	W/W	40504	85	F	CZE
176	W/W	38710	144	F	SVK
177	W/W	39002	134	M	SVK
178	W/W	40360	89	M	POL
183	W/W	40215	94	F	CZE
184	W/W	39741	110	M	SVK
185	W/W	39401	121	M	ITA
187	W/W	37948	169	F	POL
188	W/W	40525	84	F	ITA
190	W/W	37168	194	M	ITA
196	W/m	40203	95	M	ITA
200	W/W	38361	155	M	CZE
204	W/W	39565	116	F	CZE
207	W/m	40466	86	M	ITA
208	W/W	40186	95	M	CZE
209	W/W	40551	83	F	SVK
211	W/W	39368	122	M	CZE
215	W/W	40195	95	F	CZE
216	W/W	40326	91	M	CZE
223	W/W	39777	109	M	CZE

225	W/W	40435	87	M	CZE
229	W/W	39440	120	F	CZE
232	W/W	40241	93	M	CZE
235	W/W	40296	92	F	CZE
236	W/W	40493	85	M	CZE
239	W/W	40435	87	M	CZE
240	W/W	39928	104	F	CZE
242	W/W	39928	104	F	CZE
249	W/W	40024	101	F	CZE
253	W/m	39767	109	M	CZE
255	W/W	38699	144	M	CZE
256	W/W	39742	110	F	CZE
260	W/W	40203	95	M	CZE
263	W/W	39920	104	F	DEU
268	W/W	39408	121	F	CZE
272	W/W	39846	106	M	CZE
276	W/W	39358	122	F	DEU
277	W/W	39766	109	M	POL
285	W/W	38555	149	M	HUN
297	W/W	40486	85	F	SVK
298	W/W	36894	203	F	CZE
299	W/W	35894	236	F	CZE
318	W/m	40122	97	F	CZE
321	W/W	39977	102	M	CZE
326	W/m	37934	169	M	CZE
338	W/m	40360	89	F	CZE
347	W/W	38278	158	F	SVK
353	W/m	39368	122	M	CZE
355	W/m	39753	109	M	CZE
359	W/W	40163	96	F	CZE
363	W/m	39767	109	F	SVK
366	W/W	38679	145	F	SVK
371	W/W	39075	132	M	FRA
379	W/W	41800	42	M	HUN
386	W/W	39788	108	M	HUN
397	W/W	40126	97	F	HUN
404	W/W	39367	122	M	HUN
408	W/W	39805	108	M	ESP
411	W/W	39207	127	M	LTU
445	W/m	40360	89	M	CZE
464	W/W	38225	160	F	ITA
465	W/W	39379	122	M	CZE
501	W/W	37054	198	M	CZE

502	W/W	39565	116	F	CZE
503	W/W	41203	62	M	RUS
504	W/W	41203	62	M	RUS
505	W/W	41203	62	M	RUS
506	W/W	41203	62	F	RUS
507	W/W	41203	62	F	RUS
508	W/W	41203	62	F	RUS
518	W/m	40101	98	M	CZE
594	W/m	39748	110	M	CZE
600	W/m	39891	105	F	CZE
602	W/W	40535	84	F	SVK
603	W/W	40535	84	M	SVK
606	W/W	37969	168	F	ITA
607	W/m	38302	157	M	DEU
608	W/W	39386	122	M	CZE
609	W/W	39345	123	M	SVK
611	W/m	37278	191	M	CZE
612	W/W	38332	156	M	CZE
613	W/W	40706	78	M	CZE
614	W/W	39018	134	F	HUN
615	W/W	40535	84	M	SVK
616	W/W	39783	108	M	UK
617	W/W	39921	104	F	ITA
618	W/W	40197	95	F	BEL
619	W/W	40197	95	F	BEL
620	W/W	40649	80	F	UK
621	W/W	39786	108	F	POL
622	W/W	38352	156	F	POL
623	W/W	37955	169	M	CZE
624	W/W	39061	132	F	CZE
625	W/W	39441	120	F	SVK
626	W/W	39855	106	M	LTU
627	W/W	37917	170	M	CZE
628	W/W	40568	83	M	POL
629	W/W	40550	83	M	CZE
632	W/W	40479	86	F	CZE
633	W/W	40211	94	F	CZE
634	W/W	40512	85	M	CZE
635	W/W	40715	78	F	CZE
636	W/W	40535	84	M	SVK
637	W/W	40673	79	F	CZE
638	W/W	38677	145	F	CZE
639	W/m	37934	169	M	CZE

640	W/m	38743	143	F	POR
641	W/W	40551	83	M	SVK
642	W/W	37769	175	F	CZE
643	W/W	40158	96	F	POR
644	W/W	38460	152	M	ITA
645	W/W	39806	108	M	DEU
646	W/W	39476	119	M	POL
647	W/W	39753	109	F	SVK
648	W/W	40230	94	F	POL
649	W/W	40541	84	M	POL
650	W/W	40378	89	M	CZE
651	W/W	39408	121	F	CZE
652	W/W	40807	75	M	CZE
653	W/W	40378	89	F	CZE
654	W/W	40673	79	M	CZE
655	W/W	40673	79	M	CZE
656	W/W	38614	147	F	POL
657	W/W	38779	141	F	CZE
659	W/W	40100	98	M	CZE
660	W/W	38364	155	M	CZE
661	W/W	39783	108	F	CZE
662	W/W	40544	83	F	CZE
663	W/W	40139	97	F	CZE
664	W/W	40673	79	M	CZE
665	W/W	40459	86	F	CZE
666	W/W	40360	89	F	CZE
667	W/W	38871	138	M	CZE
668	W/W	40730	77	M	CZE
669	W/W	39783	108	F	CZE
670	W/m	39753	109	M	CZE
671	W/W	36813	206	F	CZE
672	W/W	39429	120	M	CZE
673	W/W	39935	103	F	CZE
674	W/W	40099	98	M	CZE
675	W/W	40730	77	F	CZE
676	W/W	40326	91	F	CZE
678	W/W	38635	146	M	CZE
679	W/W	39628	114	M	POL
680	W/W	40677	79	F	DEU
681	W/m	40724	78	M	ESP
683	W/W	40461	86	F	ESP
684	W/W	40356	90	F	SVK
685	W/m	40551	83	M	SVK

687	W/W	40325	91	F	CZE
688	W/W	40718	78	M	POL
689	W/W	39885	105	F	POL
690	W/W	40446	87	M	POL
691	W/W	38653	146	F	CZE
692	W/W	39885	105	F	POL
693	W/W	38282	158	F	SVK
694	W/W	38321	157	F	CZE
695	W/W	40855	73	F	ESP
698	W/W	40844	74	M	POL
699	W/W	40844	74	F	POL
700	W/W	40844	74	F	POL
701	W/W	40844	74	M	POL
702	W/W	40844	74	M	POL
703	W/W	40844	74	M	POL
704	W/W	40844	74	M	POL
705	W/W	39858	106	F	SVK
706	W/W	39441	120	M	SVK
707	W/W	39144	129	F	POL
708	W/W	40031	100	M	BRA
709	W/W	36143	228	M	SVK
710	W/m	40836	74	M	CZE
712	W/m	40836	74	F	CZE
713	W/W	40836	74	F	CZE
714	W/W	37558	182	M	FRA
715	W/W	40850	73	M	SVK
716	W/W	40850	73	F	SVK
717	W/W	40850	73	M	SVK
718	W/W	40850	73	F	SVK
719	W/W	40850	73	M	SVK
720	W/W	39034	133	F	POL
726	W/m	40836	74	M	CZE
727	W/W	40838	74	M	CZE
728	W/W	40838	74	M	CZE
729	W/W	40853	73	M	CZE
730	W/W	40853	73	F	CZE
731	W/m	40853	73	F	CZE
732	W/m	40853	73	F	CZE
733	W/W	40838	74	M	CZE
734	W/W	40838	74	F	CZE
735	W/W	40838	74	M	CZE
736	W/W	40838	74	F	CZE
737	W/W	40838	74	F	CZE

738	W/W	40838	74	F	CZE
739	W/W	40838	74	M	CZE
741	W/W	37605	180	F	SVK
742	W/W	36199	226	M	SVK
743	W/W	40863	73	F	CZE
744	W/W	40383	89	M	BRA
745	W/W	39168	129	F	POL
746	W/W	38614	147	M	POL
747	W/W	40586	82	M	HUN
748	W/W	40845	74	M	FRA
749	W/W	40845	74	M	FRA
750	W/W	40845	74	M	FRA
751	W/W	40845	74	F	FRA
752	W/W	40845	74	F	FRA
753	W/W	40845	74	F	FRA
754	W/W	40845	74	F	FRA
755	W/W	40845	74	F	FRA
756	W/W	40845	74	F	FRA
757	W/W	39870	106	M	SVK
758	W/W	40863	73	F	CZE
759	W/W	39825	107	M	SVK
760	W/W	40891	72	F	CZE
761	W/W	40891	72	F	CZE
762	W/W	40891	72	M	CZE
763	W/W	40891	72	M	CZE
764	W/W	40891	72	M	CZE
765	W/W	40885	72	M	HUN
766	W/W	40885	72	M	HUN
767	W/W	40885	72	F	HUN
768	W/W	43019	2	M	HUN
769	W/W	40885	72	M	HUN
770	W/W	40858	73	M	HUN
771	W/W	40858	73	M	HUN
772	W/m	40858	73	F	HUN
773	W/W	38518	150	M	CZE
774	W/m	39759	109	F	CZE
775	W/W	40912	71	M	CZE
776	W/W	40912	71	M	CZE
777	W/W	40912	71	M	CZE
778	W/W	40912	71	F	CZE
779	W/W	40912	71	M	CZE
780	W/W	40383	89	F	BRA
781	W/W	40031	100	M	BRA

782	W/W	40031	100	F	BRA
783	W/W	40481	86	F	CZE
784	W/W	40841	74	F	POL
785	W/W	39790	108	M	HUN
786	W/W	40730	77	M	CZE
787	W/W	40864	73	F	FIN
788	W/W	40864	73	M	FIN
789	W/W	40864	73	M	FIN
791	W/W	40844	74	M	SVK
792	W/W	40551	83	F	SVK
793	W/W	40673	79	F	CZE
794	W/W	39392	121	M	CZE
795	W/W	38710	144	F	SVK
798	W/W	40915	71	M	RUS
799	W/W	40918	71	M	SVK
800	W/W	40918	71	M	SVK
801	W/W	40918	71	M	SVK
802	W/W	40918	71	F	SVK
803	W/W	40918	71	F	SVK
804	W/W	40882	72	M	POL
806	W/W	40882	72	F	POL
807	W/W	40889	72	F	POL
808	W/W	40889	72	F	POL
809	W/W	40882	72	F	POL
810	W/W	40882	72	M	POL
812	W/W	37619	180	M	HUN
813	W/W	39837	107	F	CZE
815	W/W	40164	96	F	CZE
816	W/m	40863	73	F	CZE
817	W/m	40863	73	M	CZE
818	W/m	40863	73	M	CZE
819	W/W	39549	116	M	CZE
822	W/W	40591	82	M	FIN
823	W/W	40864	73	F	FIN
825	W/W	37909	170	M	CZE
827	W/W	40934	71	M	ROU
828	W/W	40934	71	M	ROU
829	W/W	40934	71	M	ROU
830	W/W	40934	71	M	ROU
831	W/W	40934	71	M	ROU
832	W/W	40934	71	M	ROU
834	W/W	40934	71	F	ROU
835	W/W	40855	73	M	CZE

836	W/W	40855	73	M	CZE
837	W/W	40551	83	M	SVK
838	W/W	37255	192	F	CZE
839	W/W	38710	144	F	SVK
840	W/W	39441	120	F	SVK
841	W/W	39056	132	M	SVK
843	W/W	40828	74	M	ESP
844	W/W	40122	97	M	CZE
845	W/W	38677	145	M	CZE
846	W/W	38767	142	M	ITA
850	W/W	39014	134	F	CZE
851	W/W	40904	72	F	CZE
852	W/W	40904	72	F	CZE
853	W/W	40904	72	F	CZE
854	W/W	40904	72	M	CZE
855	W/W	40100	98	M	CZE
856	W/W	36189	227	M	CZE
857	W/W	39852	106	M	CZE
858	W/W	40730	77	F	CZE
859	W/W	40163	96	M	SVK
860	W/W	40511	85	M	CZE
861	W/W	41251	60	M	HUN
862	W/W	41251	60	M	HUN
863	W/W	41251	60	M	HUN
864	W/W	41251	60	M	HUN
865	W/W	40888	72	F	HUN
866	W/W	40888	72	M	HUN
867	W/W	40888	72	F	HUN
868	W/W	40905	72	F	HUN
869	W/W	40905	72	M	HUN
870	W/W	40138	97	F	CZE
871	W/W	40138	97	M	CZE
872	W/W	39676	112	F	ROU
873	W/W	39003	134	F	ROU
874	W/W	39441	120	M	SVK
875	W/W	40015	101	F	CZE
876	W/W	41001	68	M	ITA
877	W/W	41020	68	M	ITA
878	W/W	41020	68	F	ITA
886	W/W	40147	97	M	SVK
950	W/W	41226	61	F	CZE
974	W/m	41347	57	M	CZE
1001	W/W	40901	72	F	CZE

1035	W/W	39549	116	M	CZE
1037	W/W	40928	71	M	CZE
1060	W/m	42335	25	F	CZE
1076	W/m	42190	29	F	CZE