

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra genetiky a šlechtění



Mutace genu *FGF5* řídící délku srsti u kočky domácí

Bakalářská práce

Autor práce: Kristýna Forejt

Obor studia: Speciální chovy ABPSKS

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Mutace genu *FGF5* řídící délku srsti u kočky domácí“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17. 4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za vedení a pomoc při vypracování této práce, poskytnuté odborné rady i ochotu, a paní Ing. Daniele Čílové za rady a pomoc s experimentální částí práce.

Mutace genu *FGF5* řídící délku srsti u kočky domácí

Souhrn

Tato bakalářská práce na téma „Mutace genu *FGF5* řídící délku srsti u kočky domácí“ se zabývá problematikou délky a struktury srsti kočky domácí (*Felis catus*). V rámci literární rešerše pojednává o plemenech koček a jejich dělení na základě délky srsti, o struktuře chlupu a zastoupení jednotlivých typů chlupů v srsti, shrnuje předchozí poznatky o genetickém podmínění popsaných jevů, zejména genu *FGF5*. Část literární rešerše byla věnována také komparativní genetice – srovnání genomu člověka a kočky, srovnání poznatků o genu *FGF5* u různých druhů savců.

V experimentální části práce byly vzorky získané bukalním stěrem od 13 příslušníků sedmi vybraných plemen koček podrobeny genetické analýze za účelem zjištění sestavy genu *FGF5*. Sledovány byly mutace M1 (*FGF5* c.356insT), M2 (*FGF5* c.406C>T), M3 (*FGF5* c.474delT) a M4 (*FGF5* c.475A>C), které dle předpokladu vyplývajícího z předchozích studií zodpovídají za dlouhosrstý fenotyp. Součástí experimentální části práce je také srovnání genu *FGF5* u kočky a psa (*Canis lupus*) na základě výsledků sekvenování. Pro detekci mutací bylo využito restrikční štěpení a kapilární elektroforéza.

Výsledky potvrzují, že sestava genu *FGF5* podmiňuje fenotypovou délku srsti. Dále z nich vyplývá, že jedinci postrádající divokou alelu, tedy heterozygoti či homozygoti jedné z výše jmenovaných mutací se fenotypově projevují jako dlouhosrstí, což odpovídá úvodní hypotéze – tyto mutace jsou recesivní a podmiňují dlouhosrstost. Bylo potvrzeno, že nejčastější příčinou dlouhosrstosti je mutace M4 (*FGF5* c.475A>C).

Klíčová slova: kočka domácí, *Felis catus*, délka srsti, *FGF5*, fibroblastový růstový faktor 5

Genetic determination of hair length in domestic cats

Summary

This bachelor's thesis "Mutation of the *FGF5* gene controlling hair length in a domestic cat" focuses on the subject of coat length and structure in the domestic cat (*Felis catus*). The theoretical part describes various cat breeds and their classification based on hair length, as well as the structure and development of cat hair in general. Several genes that have been known to influence hair quality in cats are mentioned, with particular focus on the function and mutations of the gene *FGF5* (coding Fibroblast Growth Factor 5), which is also compared to its known equivalents in other species of mammals.

In the experimental part of this thesis, 13 samples of buccal tissue have been collected from test subjects pertaining to 7 represented cat breeds. The samples have been analyzed through the method of PCR to determine gene *FGF5* allelic pair in each sample. The mutations analyzed have previously been identified as *FGF5* c.356insT, *FGF5* c.406C>T, *FGF5* c.474delT and *FGF5* c.475A>C, the hypothesis stating that these mutations are recessive to the wild allele and responsible for long-haired phenotype. The cat *FGF5* was further studied by sequence comparison to the corresponding gene in dogs (*Canis lupus*).

Results suggest that the aforementioned mutations of the *FGF5* gene are indeed causal for long-haired phenotype, with the subjects lacking the wild allele (homozygotes of one mutation or heterozygotes of two different mutations) manifesting as long-haired, suggesting that all mutations are passed down as autosomally recessive.

Keywords: domestic cat, *Felis catus*, *FGF5*, fibroblast growth factor 5

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce	2
3. Literární rešerše.....	3
3.1. Rozdělení koček podle délky srsti	3
3.1.1. Dlouhosrsté a polodlouhosrsté kočky	3
3.1.2. Krátkosrsté kočky	3
3.1.3. Bezsrsté kočky	3
3.2. Plemena koček s dlouhosrstými variantami.....	3
3.3. Ostatní plemena koček použita v této práci.....	12
3.4. Ontogenetický vývoj srsti	13
3.4.1. Prenatální vývoj	13
3.4.2. Postnatální vývoj.....	14
3.5. Stavba chlupu	15
3.6. Fáze růstu chlupu	15
3.7. Genetické podmínění délky srsti	15
3.8. Funkce genu <i>FGF5</i>	16
3.9. Mechanismus působení genu <i>FGF5</i> na délku srsti	17
3.10. Mutace genu <i>FGF5</i> u koček	17
3.11. Gen <i>FGF5</i> u jiných druhů savců.....	18
3.12. Patologické vlivy mutací genu <i>FGF5</i>	19
3.13. Aplikace poznatků v chovatelské praxi.....	19
3.13.1. Rodokmenové databáze.....	19
3.14. Genom kočky	20
3.15. Geny ovlivňující strukturu srsti kočky domácí.....	20
3.15.1. Genetické podmínění bezsrstosti (hr).....	21
3.15.2. Genetické podmínění rexovitosti (re).....	21
3.16. Vhodné metody genetické analýzy	21
3.16.1. PCR – polymerázová řetězová reakce.....	21
3.16.2. Desková gelová elektroforéza.....	23
3.16.3. Kapilární elektroforéza.....	24
3.16.4. Sangerova metoda sekvenace	25
4. Metodika	27
4.1. Plemena koček využitá v této práci.....	27
4.2. Izolace DNA z buklálních stěrů.....	28
4.3. Hodnocení kvality a kvantity izolované DNA	29
4.4. Navržení primerů	29
4.5. Amplifikace částí genu <i>FGF5</i>	30
4.6. Kontrola úspěšnosti PCR	31

4.7.	Přečišťování	31
4.8.	Příprava vzorků pro sekvenaci	31
4.9.	Sekvenace částí genu <i>FGF5</i>	32
5.	Výsledky	34
5.1.	Kvalita a kvantita izolované genomické DNA	34
5.2.	Bioinformatické vyhodnocení genu <i>FGF5</i> u kočky domácí.....	34
5.3.	Navrhování specifických primerů a jejich charakteristika	38
5.4.	Výsledky amplifikace vybraných fragmentů genu <i>FGF5</i>	40
5.5.	Sekvenční analýza a detekce SNP v amplikonech genu <i>FGF5</i>	41
5.6.	Detekce publikovaných mutací genu <i>FGF5</i> zodpovědných za dlouhou srst	45
6.	Diskuze	47
6.1.	Výběr modelových plemen	47
6.2.	Izolace DNA	47
6.3.	Detekce kauzální mutace genu <i>FGF5</i>	47
7.	Závěr	49
8.	Literatura	50

1. Úvod

Odhaduje se, že druh kočka domácí vznikl procesem domestikace z kočky divoké zhruba před 10 000 let, první důkazy ochočených koček žijících u lidských obydlí jsou staré přes 8 000 let (Šlapalová 2010). Poddruhy kočky divoké *Felis silvestris libica* a *Felis silvestris ornata*, ze kterých se dnešní kočky domácí vyvinuly, žijí v teplých klimatech Afriky a jihozápadní Asie, kde zřejmě také probíhala jejich domestikace. Ačkoliv jejich populace se nadále zmenšuje, zmíněné poddruhy dnes přežívají na částech původního areálu, zatímco kočka domácí se rozšířila do celého světa. Jakožto zvířata uzpůsobená pro život v pouštních, polopouštních a stepních podmínkách jsou oba poddruhy kočky divoké krátkosrsté.

První zmínky o dlouhosrstých kočkách pochází z Itálie ze 17. století, kam byly zřejmě dovezeny z Turecka (Clutton-Brock 1999), jednalo se zároveň o první kočky označované jako ušlechtilé – plemeno je dodnes nazýváno turecká angora. Původ recesivních alel genu *FGF5*, jež dlouhosrstý fenotyp podmiňují, není v současnosti dostatečně prozkoumán – byly vysloveny hypotézy o křížení kočky domácí a jiných druhů kočkovitých šelem, konkrétně *Felis manul* a *Felis margarita*, moderní genetické rozborů však tuto možnost vyloučily (Driscoll et al., 2007). Pravděpodobnějším vysvětlením vznik náhodné mutace v rámci druhu.

Dnes se dlouhosrsté kočky domácí hojně vyskytují jak v populaci volně žijící, tak mezi ušlechtilými plemeny. Délka a struktura srsti jsou klíčovými faktory při výběru chovných jedinců, stále více chovatelů ušlechtilých koček nechává svá chovná zvířata na sestavu genu pro dlouhosrstost testovat, zejména příslušníky krátkosrstých plemen, o nichž je známo, že recesivní alely tohoto genu často přenášejí (například britská krátkosrstá kočka či exotická kočka). Tato práce pojednává o problematice a metodice testování, obsahuje také experimentální část, pro niž byli vybráni zástupci různých plemen ušlechtilých koček.

2. Cíl práce

2.1 Vědecká hypotéza

- 2.1.1 U genu *FGF5* existují kauzální mutace zodpovědné za délku srsti, které jsou rozšířeny napříč různými plemeny i mutace specifické pro jednotlivá plemena. Dosud byly u koček domácích popsány čtyři rasově specifické mutace genu *FGF5*: M1 (c.356insT), M2 (c.406C>T), M3 (c.474delT) a M4 (c.475A>C), které zapříčiňují fenotypovou dlouhosrstost či polodlouhosrstost.
- 2.1.2 Jednotlivé mutace je možno v laboratorních podmínkách identifikovat metodou izolace DNA z živočišných buněk, následné amplifikace fragmentů genu *FGF5* a detekce na základě délkového polymorfismu amplifikovaných fragmentů.
- 2.1.3 Dostatečně kvalitní biologický materiál pro úspěšnou izolaci DNA, amplifikaci fragmentu genu *FGF5* a následnou detekci mutace na základě délkového polymorfismu fragmentů je možno získat z bukálního stěru.

2.2 Konkrétní cíle práce

- Vypracovat ucelenou literární rešerši zaměřenou na genetickou determinaci délky srsti u kočky domácí.
- S využitím mezinárodních nukleotidových databází identifikovat pozice kauzálních mutací a navrhnout primerové páry pro amplifikaci těchto oblastí.
- Sekvence PCR amplikonů.
- Porovnání výsledků molekulární analýzy s fenotypovým projevem.

3. Literární řešerše

3.1. Rozdělení koček podle délky srsti

3.1.1. Dlouhosrsté a polodlouhosrsté kočky

Ačkoliv jsou chovatelskými organizacemi plemena dělena na dlouhosrstá a polodlouhosrstá, není pro toto rozdělení stanovena jasná definice. Pro obě varianty platí, že jsou pesíky na pohled dlouhé a splývavé, v okolí krku obvykle tvoří typický límec. Výrazné je také prodloužení chlupů vyčnívajících mezi polštářky prstů. Mezi dlouhosrstá plemena řadí Český svaz chovatelů koček pouze kočky perské a ragdoll. Příklady polodlouhosrstých plemen koček jsou mainské, norské lesní a sibiřské kočky.

3.1.2. Krátkosrsté kočky

Krátkosrsté kočky mají srst s kratšími pesíky a zpravidla méně výraznými rozdíly v délce na různých částech těla. Chlupy mezi polštářky nevyčnívají vůbec nebo jen minimálně. Většina plemen koček spadá do kategorie krátkosrstých, například britská krátkosrstá, egyptská mau, siamská či ruská modrá.

3.1.3. Bezsrsté kočky

Speciální skupinou koček jsou kočky bezsrsté, které postrádají srst na většině těla (výjimkou jsou uši a centrální část obličeje), spadají sem plemena kanadský a donský sphynx.

3.2. Plemena koček s dlouhosrstými variantami

Exotická kočka

Povahově vyrovnané a spíše klidné kočky, jejich typickým znakem je kulatá hlava, velké oči a výrazně zploštělý nos. Tělo by mělo být zavalité, ocas krátký, srst krátká, hustá a jemná (plyšové struktury) (FIFé 2019). Exotická kočka je sesterským plemenem perské kočky, z níž byla v sedmdesátých letech minulého století vyšlechtěna pomocí křížení s americkou krátkosrstou a barmskou kočkou. Ačkoliv se v současné době projevují snahy o čistotu chovu, vzhledem k postupné ztrátě kvality srsti se k exotickým příležitostně perské kočky nadále přikřížují (Říhová 2007).



Obrázek 1: Exotický kocour, dostupné z: <https://www.prettyprincess.cz/kocouri/>

Perská kočka

Standard perských koček je v současnosti shodný se standardem exotické kočky (FIFé 2019), liší se pouze délkou srsti. Jedná se o jedno z nejstarších plemen koček, nejprve byly chovány v oblastech dnešního Turecka a Íránu, na začátku 17. století pak byly rozšířeny také do Evropy. Po mnoho let byla středobodem jejich chovu Anglie (Verhoef-Verhallen 2004). Nutno podotknout, že nyní preferovaný „extrémní typ“ nosu je záležitostí teprve posledních desetiletí, do té doby se perské kočky podobaly spíše dnešním britským dlouhosrstým (Říhová 2007).



Obrázek 2: Perský kocour, dostupné z:
<http://www.monarcha.cz/galerie.php?galerie=voo&foto=7>p=1>

Britská krátkosrstá kočka

Britské kočky vznikly na počátku 20. století křížením perských koček s místními krátkosrstými kočkami (Verhoef-Verhallen 2004). Nejprve byly uznávány pouze v modrém zbarvení (odtud populární spojení britská modrá), nyní se však chovají ve všech barevných varietách. Standardní je velká kulatá hlava, středně dlouhý profil obličeje, malé oblé uši, velké

kulaté oči, krátké zavalité tělo, krátké nohy, krátký ocas. Srst by měla být velmi krátká, hustá a hrubší struktury (FIFé, 2019).



*Obrázek 3: Britská krátkosrstá kočka, dostupné z:
<https://www.pinkberry.cz/kocky/opal/>*

Britská dlouhosrstá kočka

Teprve nedávno uznané sesterské plemeno britských krátkosrstých se ve standardu opět liší pouze v délce a struktuře srsti (FIFé 2019). Vzniklo spojováním dlouhosrstých koťat, která se v chovu britských krátkosrstých rodila díky perskému dědictví recesivní alely pro dlouhou srst.



*Obrázek 4: Britská dlouhosrstá kočka, dostupné z:
<http://www.elandrea.cz/nase%20kocky.html>*

Selkirk Rex krátkosrstý

Plemeno typické svou kadeřavou srstí vzniklo díky náhodné dominantní mutaci v Americe na konci 60. let (Verhoef-Verhallen 2004). Mají kulatou hlavu, kulaté oči, středně dlouhé tělo i nohy. Srst je krátká, zvlněná, zvlněné jsou i vousky. Koťata se rodí kadeřavá, brzy však svou kadeřavost ztrácí a znova ji získávají až v období pohlavního dospívání (Gandolfi 2013).



*Obrázek 5: Kočka plemene Selkirk Rex krátkosrstý, dostupné z:
<https://nitewindcattery.homestead.com/pictures.html>*

Selkirk Rex dlouhosrstý

Plemeno vznikalo téměř současně s krátkosrstou variantou, kdy se kadeřavé kočky křížily s perskými, a dlouhosrstá koťata zařazovala do odděleného chovu. Oproti ostatním dlouhosrstým plemenům je jejich kadeřavá srst náročnější na péči, což je možnou příčinou malého rozšíření jejich chovu (Verhoef-Verhallen 2004).



*Obrázek 6: Kočka plemene Selkirk Rex dlouhosrstý, dostupné z:
<http://www.highlandkatz.biz/cats.html>*

Habešská kočka

Plemeno vzniklo, když byly původně polodivoké kočky z oblasti Etiopie dovezeny britskými vojáky do Anglie, kde je začali šlechtit do dnešní podoby (Verhoef-Verhallen 2004). Jedná se o štíhlé, drobné kočky s mandlovým tvarem očí, typickým divokým zbarvením a temperamentní povahou (FIFé 2019).



Obrázek 7: Habešská kočka, dostupné z <https://almaparens.webnode.cz/cleopatra-of-queen-bestet/>

Somálská kočka

Toto relativně mladé sesterské plemeno bylo vyšlechtěno v polovině 20. století v Kanadě z habešských koček (Verhoef-Verhallen 2004).



Obrázek 8: Somálská kočka, dostupné z: <https://www.moje-kocka.cz/plemena/somalska-kocka-954.html>

Kurilský bobtail krátkosrstý

Jak název napovídá, toto plemeno má svůj původ na Kurilských ostrovech, severně od Japonska. Zřejmě má původ v japonských bobtailech, které Japonci na ostrovy v minulosti dovezli, jejich řízeným chovem se však začali zabývat až Rusové (Verhoef-Verhallen 2004). Typickým znakem tohoto plemene je výrazně zkrácený ocas, který se zřejmě rozšířil kvůli praktičnosti při lovu ryb. Srst je krátká a obvykle zbarvena černě nebo červeně s případným mourováním a bílými odznaky (FIFé 2019).



*Obrázek 9: Kočka plemene kurilský bobtail krátkosrstý, dostupné z:
<https://www.jeatri-korzihik.dk/kattene>*

Kurilský bobtail dlouhosrstý

Dlouhosrstá varianta plemene kurilský bobtail, která se přirozeně vyskytovala již v původní populaci na Kurilských ostrovech (Verhoef-Verhallen 2004).



*Obrázek 10: Kočka plemene kurilský bobtail dlouhosrstý, dostupné z:
<https://www.jeatri-korzihik.dk/kattene>*

Americký curl krátkosrstý

Plemeno se zvláště stočenýma ušima se odvíjí od jedné zakládající kočky, která žila v 80. letech 20. století v USA (Verhoef-Verhallen 2004). Stavba těla je stále podobná běžným domácím kočkám, samozřejmě až na specifické uši. Povoleny jsou všechny barevné variety (FIFé 2019).



Obrázek 11: Americký curl krátkosrstý, dostupné z: http://scottish-straight-sh-kucing-g4.kucing.biz/_kucing.php?_i=1&jenis=American-Curl-SH

Americký curl dlouhosrstý

Původní vzhled plemene, od něž se později oddělila krátkosrstá varianta – liší se pouze délkou srsti. Jedná se o jediné dlouhosrsté plemeno, které je výrazně chovanější než jeho krátkosrstá varianta (Říhová 2007).



Obrázek 12: Americký curl dlouhosrstý, dostupné z: <http://www.curlsence.com/champion-hall.html>

Siamská kočka

Plemeno štíhlých, elegantních koček s bohatou historií – pocházejí z oblasti dnešního Thajska, první zmínky o jejich chovu pocházejí již ze 14. století (Verhoef-Verhallen, 2004). Jedná se o štíhlé kočky s dlouhým tělem, nohama i ocasem, mandlovým tvarem očí a velkýma, nízko posazenýma ušima. Srst je velmi krátká a hladká. Povolena jsou všechna zbarvení se siamskými odznaky (FIFé 2019).



Obrázek 13: Siamská kočka, dostupné z: <http://www.basbousa.cz/album/fotogalerie-amira-laila-basbousa/#img-5490-jpg>

Balinéská kočka

Navzdory názvu nemá dlouhosrstá varianta siamských koček s ostrovem Bali nic společného – začaly být chovány americkými chovateli v 50. letech 20. století křížením (do té doby nežádoucích) dlouhosrstých koťat siamských koček (Verhoef-Verhallen 2004). Od sesterského plemene se liší pouze délkou srsti (FIFé 2019).



Obrázek 14: Baliněští kocouři, dostupné z: <http://www.vetstreet.com/cats/balinese>

Orientální krátkosrstá

Orientální krátkosrsté se oddělily od siamských koček v polovině 20. století v rámci rozšíření chovu na barevné variety bez siamských odznaků (Verhoef-Verhallen 2004). Vyskytují se ve všech barevných varietách s výjimkou siamských odznaků (takové kotě je registrováno jako siamské) (FIFé 2004).



Obrázek 15: Orientální krátkosrstá kočka, dostupné z: <https://www.snape-cattery.cz/fahrenheitie-gallery/#&gid=1&pid=7>

Orientální dlouhosrstá

Dlouhosrstá varianta orientálních koček, která vznikla v 80. letech křížením krátkosrstých orientálek s kočkami baliněskými (Verhoef-Verhallen 2004).



Obrázek 16: Orientální dlouhosrstá kočka, dostupné z: <http://www.kirazamber.com/mayday.html>

3.3. Ostatní plemena koček použitá v této práci

Devon Rex

Plemeno původem z Anglie typické svou krátkou a zvlněnou srstí (Verhoef-Verhallen 2004). Stavbou těla se jedná o spíše drobné kočky s dlouhým ocasem, širokou hrudí a trojúhelníkovitou hlavou. Standardní je mandlový tvar očí a velké, vysoko postavené uši (FIFé 2019).



Obrázek 17: Kočka plemene Devon Rex, dostupné z: <http://www.devon-rex-rexbello.cz/galerie5.html>

Kanadský sphynx

Plemeno původem ze Severní Ameriky (Verhoef-Verhallen 2004) je nepřehlédnutelné díky absenci srsti na většině těla. Na rozdíl od příslušníků plemene donský sphynx jsou ti kanadští zavalitější, stavbou založení americké krátkosrsté kočky (FIFé 2019).

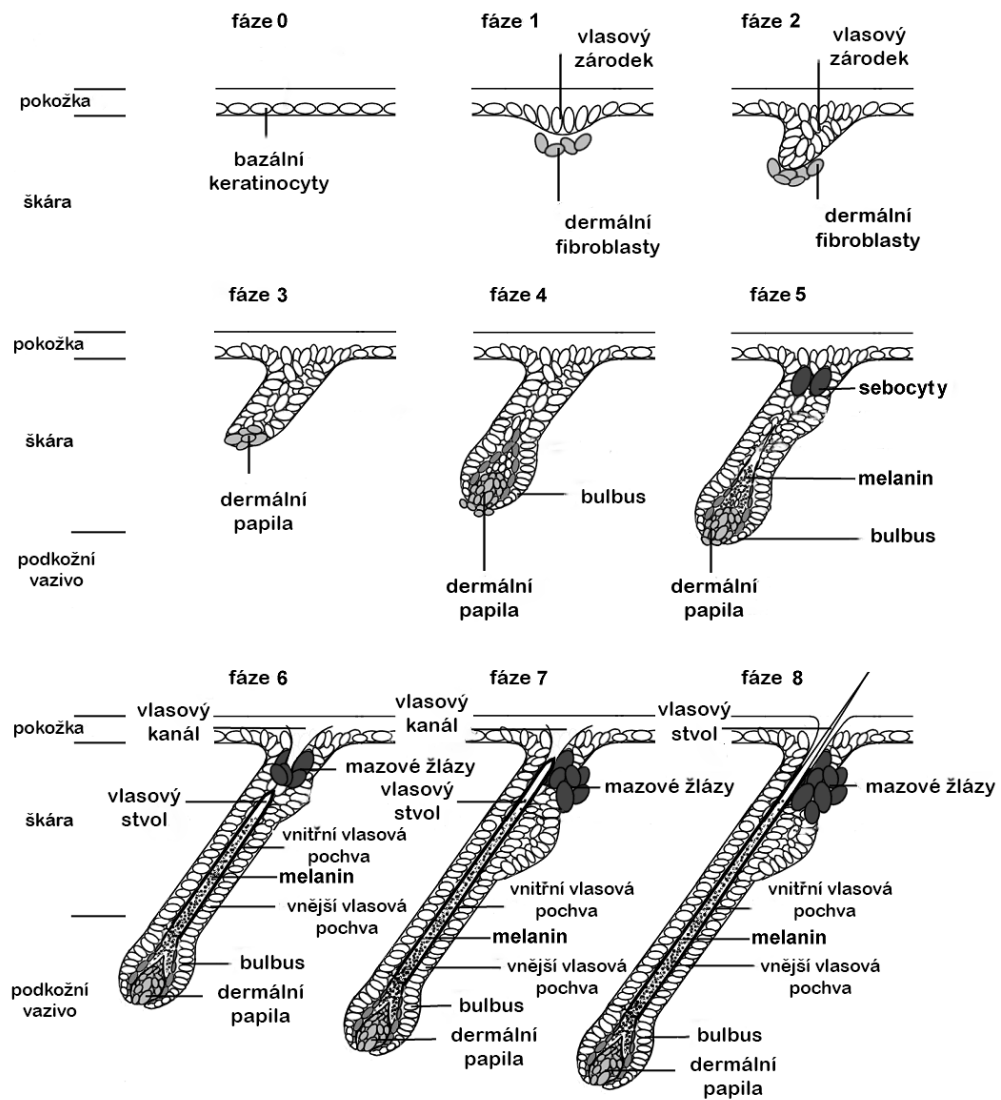


Obrázek 18: Kočka plemene Sphynx, dostupné z: <https://www.kajigo.cz/kocky/>

3.4. Ontogenetický vývoj srsti

3.4.1. Prenatální vývoj

Jako počátek vývoje srsti by se dala označit prvotní diferenciaci chlupových folikulů z epidermální tkáně, která začíná mezi 22. a 25. dnem březosti folikuly hmatových vousků (Knosp 2002) a kolem 28. dne začíná tvorba folikulů i na zbytku těla zárodka. Vznikají z dermálních fibroblastů, ty se za intenzivního buněčného dělení zanořují hlouběji do škály, kde se další diferenciací vytváří folikul (Millar 2002) (viz Obrázek 19).



mi

Obrázek 19: Tvorba vlasového folikulu (McElwee at al. 2000)

Kolem 40. dne březosti jsou patrné první hmatové vousky, ve 48. dni březosti je již celé tělo pokryto velmi jemným (primárním) ochlupením. Sekundární ochlupení ve formě husté, v barevných částech výrazně pigmentované srsti se vyvíjí do 60. dne (Knospe 2002), jeho přítomnost je jedním z nejdůležitějších znaků donošenosti u koťat.

3.4.2. Postnatální vývoj

Donošená koťata (s výjimkou bezsrstých plemen) se rodí s jemným, hustým ochlupením po celém povrchu. Do zhruba osmi týdnů věku mají nedokonalou termoregulaci a vyžadují externí zdroj tepla, přirozeně ve formě matky a sourozenců, při umělém odchovu možno substituovat zahřívací lahví nebo speciální topnou fólií. Srst se v tomto období především prodlužuje, zachovává si však typickou hustotu (Říhová 2007).

Významná změna ve struktuře nastává při první sezónní výměně srsti, tedy mezi šestým a dvanáctým měsícem věku. Nová srst je hladší a řidší, obzvláště silné pesíky se vyvíjejí podél páteře. Srst dospělé kočky se po celý život průběžně obměňuje, nejvýrazněji na podzim a na jaře, kdy se v rámci sezónní aklimatizace mění její délka a hustota podsady (Ryder 1975) (viz Obrázek 20).



Obrázek 20: Kontrast mezi letní (vlevo) a zimní (vpravo) srstí, dostupné z:
<http://i.imgur.com/q6s2yCN.jpg>

3.5. Stavba chlupu

Kořínky chlupů (folikuly) jsou uloženy ve škáře, ke každému je přidružena mazová žláza a sval zvaný vzpřimovač. Na rozdíl od lidí vyrůstá u některých zvířat včetně koček z jednoho folikulu více chlupů, jeden dlouhý a silný chlup zvaný pesík a několik kratších, jemnějších chlupů zvaných vlníky (Ryder 1975). Vlníky tvoří podsadu, zajišťují termoregulaci, ale u některých plemen koček může být jejich výskyt regulovaný či mohou úplně chybět (Gandolfi 2010).

Z hlediska chemického složení jsou chlupy z převážné části tvořeny bílkovinami, konkrétně kondenzovanými polymery různých aminokyselin (Robbins 1994). Druhy a rozložení aminokyselin v chlupu kočky je přitom podle specializované studie (Hendriks 1998) srovnatelné s chlupy psa, koně či člověka, pouze s nižším obsahem prolinu. Barva má na chemickou strukturu chlupu minimální vliv.

3.6. Fáze růstu chlupu

Růst chlupů a vlasů probíhá v průběhu celého života a uskutečňuje se cyklicky. U lidí jsou cykly jednotlivých folikulů vzájemně nezávislé – obměna vlasů je tedy asynchronní a mozaikovitá. U zvířat je výměna chlupů synchronizovaná, charakterizovaná hromadným vypadáváním a růstem (Kučerová a Bienová 2012). Fáze růstového cyklu chlupu jsou následující:

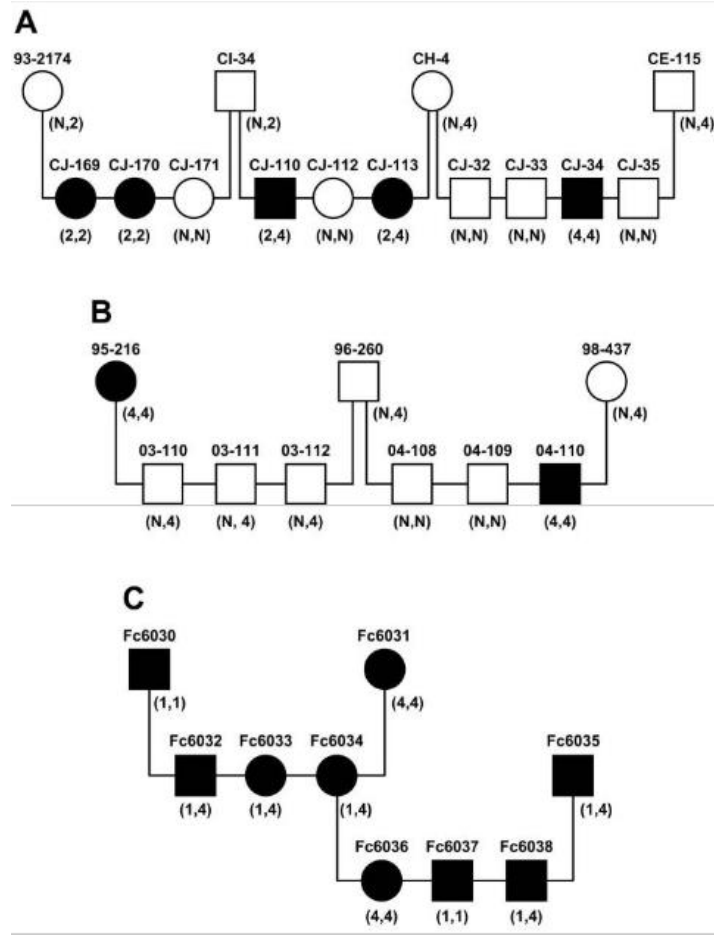
Anagen neboli růstová fáze je charakterizován intenzivním buněčným dělením v oblasti kořene chlupu. Buňky se diferencují, keratinocyty produkují keratin, rohovatí a stávají se součástí nového chlupu. Délka této fáze podmiňuje konečnou přirozenou délku chlupu (Kučerová a Bienová 2012).

Katagen neboli přechodná fáze je období mezi anagenem a telogenem, chlup přestává růst, je přerušeno zásobování kořínku krví a keratinocyty vstupují do apoptózy. Vnější obal folikulu se smršťuje a vytlačuje chlup směrem k povrchu (Kučerová a Bienová 2012).

Telogen neboli konečná fáze cyklus uzavírá, chlup spolu s obaly postupuje nadále k povrchu, papila se od něj kompletně oddělí a začíná pod ním tvořit nové vlákno, které nakonec to původní vytlačí (chlup vypadne) a s přechodem do anagení fáze odstartuje nový cyklus (Kučerová a Bienová 2012).

3.7. Genetické podmínění délky srsti

Dědičnost délky srsti byla poprvé zkoumána sledováním rodokmenů u myší v roce 1963. Z výsledků pozorování vyplynulo, že se dědí na základě mendelistické dědičnosti jako autozomálně recesivní. V pozdějších letech byl tento typ dědičnosti pozorován také u králíků, psů a koček (Kehler et al. 2007).



Obrázek 21: Sledování tří nepříbuzných rodokmenů, černá značí dlouhosrsté jedince, bílá krátkosrsté (Kehler et al. 2007).

Gen *FGF5* byl poprvé identifikován jako lidský onkogen spolu s dalšími geny ze skupiny FGF. Své jméno získal podle bílkoviny Fibroblast Growth Factor 5 (fibroblastový růstový faktor 5), kterou kóduje. Následně byl ale blíže zkoumán u myši (Suzuki et al. 2000) a spojen s dlouhosrstým fenotypem. U koček tento gen leží na chromozomu B1 (Kehler et al. 2007).

3.8. Funkce genu *FGF5*

V roce 2000 byl zaznamenán proces působení bílkoviny *FGF5* a jejího inhibitoru *FGF5S* u myši (Suzuki et al 2000). Hraje významnou roli v regulaci buněčného dělení a diferenciaci, působí jako inhibitor růstu chlupů.

Normální exprese genu *FGF5* byla pozorována v neuronech, myocytech, β -buňkách slinivky břišní a chlupových folikulech. Patologická overexprese pak byla pozorována v rakovinných buňkách mléčné žlázy a prostaty (Kehler et al. 2007).

3.9. Mechanismus působení genu *FGF5* na délku srsti

Fibroblastový růstový faktor, který gen *FGF5* kóduje, se při normální expresi váže na FGF receptory na folikulárních buňkách a způsobuje přechod folikulu z anagenní fáze do fáze katagenní a telogenní, čímž zapříčiňuje, že výsledný chlup roste kratší dobu a zůstává tedy v kratší délce (Suzuki et al. 2000). Mutace genu *FGF5* způsobující dlouhosrstost způsobují chybu ve struktuře výsledného proteinu, jehož inhibiční schopnost je tím oslabena a chlup proto roste delší dobu (Drögemüller et al. 2007).

Receptory pro molekulu *FGF5* byly zjištěny u papilárních buněk, které v anagenu stimulují buňky vnějšího obalu kořínku k dělení. Pro spuštění a udržování procesu stimulace vyžadují papilární buňky aktivaci v podobě růstového faktoru FGF1. *FGF5* tuto aktivaci blokuje a tím přerušuje tvorbu vláknů (Ota et al. 2002).

3.10. Mutace genu *FGF5* u koček

Sekvence všech aktuálně objevených alel genu *FGF5* bylo zjištěna ve studii Kehler et al. (2007), pro jejíž účely bylo genotypováno 377 koček, byla potvrzena závislost sledovaného znaku na kandidátním genu *FGF5* ležícím na chromozomu B1 a byly zaznamenány následující alely:

Divoká alela, jejíž přítomnost se projevuje fenotypovou krátkosrstostí, tedy autozomálně dominantní. Výsledný bílkovinný řetězec je dlouhý 270 aminokyselin.

Jako mutace 1 (M1) byla označena inserce thyminové báze na pozici 356 (c.ins356T), která byla zjištěna u několika nepříbuzných jedinců plemene ragdoll. V důsledku se dále v pořadí vytvoří terminační kodon a výsledný protein je zkrácen na 160 aminokyselin.

Jako mutace 2 (M2) byla označena substituce cytosinu za thymin na pozici 406 (c.C>T406), která byla zjištěna u několika jedinců plemene norská lesní. Touto mutací vzniká terminační kodon a výsledný protein je zkrácen na 135 aminokyselin.

Jako mutace 3 (M3) byla označena delece thyminu na pozici 474 (c.del474T), která byla zjištěna u několika příslušníků plemen mainská mývalí a ragdoll. Výsledný protein je v důsledku této mutace prodloužen na 380 aminokyselin.

Jako mutace 4 (M4) byla označena substituce adeninu za cytosin na pozici 475 (c.A>C475), což způsobí missense substituci threoninu za prolin při zachování délky výsledného proteinu, ale ztrátě jeho správné funkce. Tato mutace je nejčastější příčinou dlouhosrstosti a je pozorována napříč všemi plemeny.

3.11. Gen *FGF5* u jiných druhů savců

Gen *FGF5* nebyl identifikován pouze u koček, ale také u mnoha jiných druhů savců, kde zastává obdobnou funkci. Prvním druhem, u kterého byl gen *FGF5* identifikován a izolován, byla myš domácí (*Mus musculus*) – zasloužili se o to Hébert et al. 1994. Dlouhosrstý fenotyp u nich způsobuje pouze jedna kauzální mutace. Obdobně je tomu u psů (*Canis lupus familiaris*) (Cadieu 2009; Krausová 2018) a králíků (*Oryctolagus cuniculus*) (Mulsant 2010). U osla domácího (*Equus asinus*) byly identifikovány dvě kauzální mutace (Legrand et al. 2014).

Člověk je pro studium genu *FGF5* zajímavějším, avšak náročnějším subjektem. Recesivně homozygotní sestava zatím jediné známé kauzální mutace umožňuje delší maximální délku vlasů, ale vzhledem k povaze lidského života není jednoduše pozorovatelná. Studie Higgins et al. (2014) se proto zaměřila ne na vlasy, ale na řasy – zkoumala jedince s trichomegalií neboli abnormálně dlouhými řasami. Prokázala spojitost tohoto jevu s mutací v genu *FGF5* a od recesivních homozygotů následně získali vzorky ochlupení předloktí a porovnali je s kontrolním vzorkem, průměrná délka jejich chlupů významně převyšovala průměr běžné populace, což nadále podpořilo hypotézu studie.



Obrázek 22: Trichomegalie u lidí,

dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4115575/>

Obzvláště zajímavé jsou nedávné studie genu *FGF5* u kašmírských koz, jejichž produktem je vlna a výzkum genu *FGF5* skýtá potenciální ekonomický přínos. Nemělo by proto být překvapením, že se na tento aspekt zaměřil tým genových inženýrů Wang et al. (2016) a s využitím systému CRISPR/Cas9 vytvořili kašmírské kozy s delší srstí a vyšší hustotou sekundárních folikulů.

3.12. Patologické vlivy mutací genu *FGF5*

Dle lékařských studií není vliv genu *FGF5* omezen pouze na délku chlupu. Například Allerstorfer et al. (2008) identifikovali jako onkogen pro vznik vysoce maligního gliomu mozku (glioblastoma multiforme – dle Bruce et al. (2011) umírají neléčení pacienti do 3 měsíců a méně než 25 % léčených přežívá déle než 2 roky). U subjektů s těmito nádory bylo v zasažené oblasti mozku pozorováno nadměrné uvolňování proteinu *FGF5* zabraňovalo apoptóze nádorových buněk a podporovalo jejich proliferaci. Obdobně Huang et al. (2018) pozorovali zvýšené uvolňování *FGF5* u subjektů s rakovinou prsu.

3.13. Aplikace poznatků v chovatelské praxi

Ačkoliv molekulární podstata dědičnosti délky srsti byla prozkoumána teprve nedávno, chovatelé na základě vlastních pozorování odvodili funkční systém dědičnosti zanedlouho po popularizaci mendelovské genetiky.

Většina chovatelských příruček (Verhoef-Verhallen 2004; Robinson 1977) týkajících se dědičnosti označuje gen *FGF5* písmenem L (odvozeno od anglického *longhair* = dlouhosrstý) a rozlišuje alely L (autozomálně dominantní, fenotypová krátkosrstost) a l (autozomálně recesivní, fenotypová dlouhosrstost). Označení alela l tedy zahrnuje všechny čtyři výše popsané mutace způsobující dlouhosrstost.

Největšího praktického významu nabývá sledování genu L u plemen s dlouhosrstými variantami a při metizaci (meziplemenném křížení). Nejčastěji praktikovanou metodou je sledování rodokmenů, avšak v současné době se stále více chovatelů obrací na specializované laboratoře pro detekci recesivní alely u fenotypově krátkosrstých koček, ať už za účely vhodněji zvoleného spojení nebo eliminace přenašečů z chovu krátkosrstých plemen (Říhová 2007).

3.13.1. Rodokmenové databáze

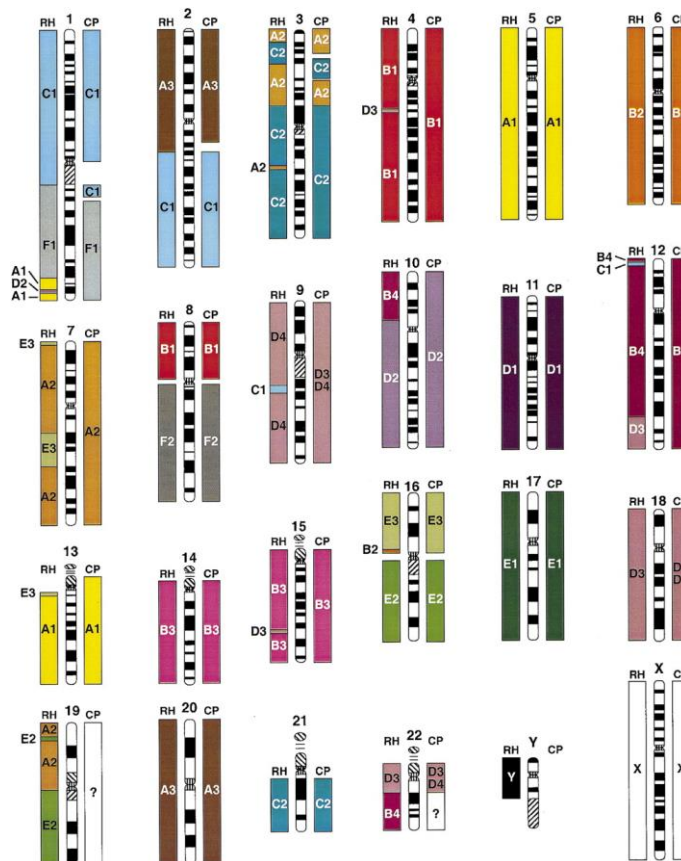
Rodokmeny ušlechtilých koček jsou schraňovány v registrech chovatelských organizací, nicméně tyto registry nejsou dosud digitalizovány a veřejně zpřístupněny, což značně ztěžuje sledování rodokmenů v praxi (SCHK 2019).

Chovatelé se proto snaží zavádět nezávislé internetové databáze, do kterých posílají kopie rodokmenů napříč plemeny a chovatelskými organizacemi. Toto je obzvláště přínosné pro sledování recesivních alel, kde je ideální znát také fenotypy sourozenců předků z minulých generací. Bohužel se na tvorbě těchto nezávislých registrů nepodílí dostatečné množství chovatelů, aby je bylo možno považovat za spolehlivé chovatelské nástroje.

Největší z těchto databází jsou k přístupné na adresách www.pawpeds.com a www.catpedigrees.com.

3.14. Genom kočky

Genom kočky domácí (*Felis catus*) je tvořen 18 páry autozomů a gonozomy XY, jeho celková délka je 3300 cM (O'Brien 1999), obdobně jako délka lidského genomu. Genom kočky byl zmapován v roce 2000 pomocí RH mapování (Murphy 2000).



Obrázek 23: Srovnání genomu kočky s odpovídajícími částmi lidského genomu (Murphy 2000)

Právě díky podobnosti v lidském genomem jsou kočky velmi vhodnými subjekty komparativní genetiky, mnohá jejich onemocnění odpovídají povahou i průběhem onemocněním lidským, například FIV (felinní obdoba viru HIV), FIP (felinní obdoba SARS) či polycystické onemocnění ledvin (PKD).

3.15. Geny ovlivňující strukturu srsti kočky domácí

Většina známých mutací ovlivňujících se silným účinkem kvalitu srsti souvisí s tvorbou molekuly keratinu, podle studií Gandolfi et al. (2010, 2013) se jedná konkrétně o mutace genu

KRT71 ležícím na chromozomu E1, patrně ve vztahu $KRT71^{SADRE} > KRT71+ > KRT71^{hr} > KRT71^{re}$.

3.15.1. Genetické podmínění bezsrstosti (hr)

Při sledování fenotypové bezsrstosti je třeba rozlišovat dvě větve – eurasijskou a americkou. Nejvýznamnějšími zástupci eurasijské větve jsou plemena donský sphynx a peterbald, nejvýznamnějším zástupcem americké větve je plemeno kanadský sphynx. Rozdíl mezi těmito větvemi je především v povaze mutace, která jejich typickou bezsrstost způsobuje.

Mutace *KRT71*^{hr} americké větve se předává na základě mendelistické dědičnosti jako autozomálně recesivní. Gandolfi et al. (2010) ji identifikovali jako c.1315G>A (substituce guaninu za adenin na pozici 1315) – způsobuje předčasnou tvorbu terminačního kodonu a nefunkčnost vzniklé bílkoviny při tvorbě chlupu (zdravá forma se podílí na tvorbě keratinových intermediárních filament v epitelu kořínků).

Podmínění bezsrstosti eurasijské větve je v porovnání složitější a dosud není prozkoumáno na molekulární úrovni. Jeho základem je autozomálně neúplně dominantní gen – při křížení heterozygotů se narodí 25 % koťat úplně bezsrstých, tuto vlastnost si zachovávají po celý život, 25 % koťat normálně osrstěných a 50 % koťat se slabším osrstěním, které se v průběhu života může ztratit nebo zachovat (příčina, proč osrstění ztratí pouze některá koťata, není zatím známa, pravděpodobně má polygenní povahu) (Zhigachev et al. 2000).

3.15.2. Genetické podmínění rexovitosti (re)

V genu *KRT71* má původ také rexovitost (kadeřavost) typická pro některá plemena koček (devon rex, cornish rex, selkirk rex). U amerických plemen (devon rex, selkirk rex) je za tento znak zřejmě zodpovědná poměrně komplexní mutace (delece 81 bází c.1108-4_1184del s insercemi c.1184_1185insAGTTGGAG a c.1196insT), která se projevuje jako autozomálně recesivní.

V pozdější studii se Gandolfi et al. (2013) zabývali také příčinou rexovitosti u selkirk rexů, kteří mají původ v evropské větvi plemen (perské a britské kočky). Mají vlastní jedinečnou mutaci *KRT71* c.445-1G > C označovanou jako Selkirk Autosomal Dominant Rex (*KRT71*^{SADRE}) – jak již název napovídá, na rozdíl od mutace *KRT71*^{re} je *KRT71*^{SADRE} dominantní nad divokým typem.

3.16. Vhodné metody genetické analýzy

3.16.1. PCR – polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (zkráceně PCR z anglického Polymerase Chain Reaction) je metodou rychlé amplifikace určitého úseku DNA, která se od svého objevení týmem Mullis et al. (1986) stala přelomovou pro studium genetiky.

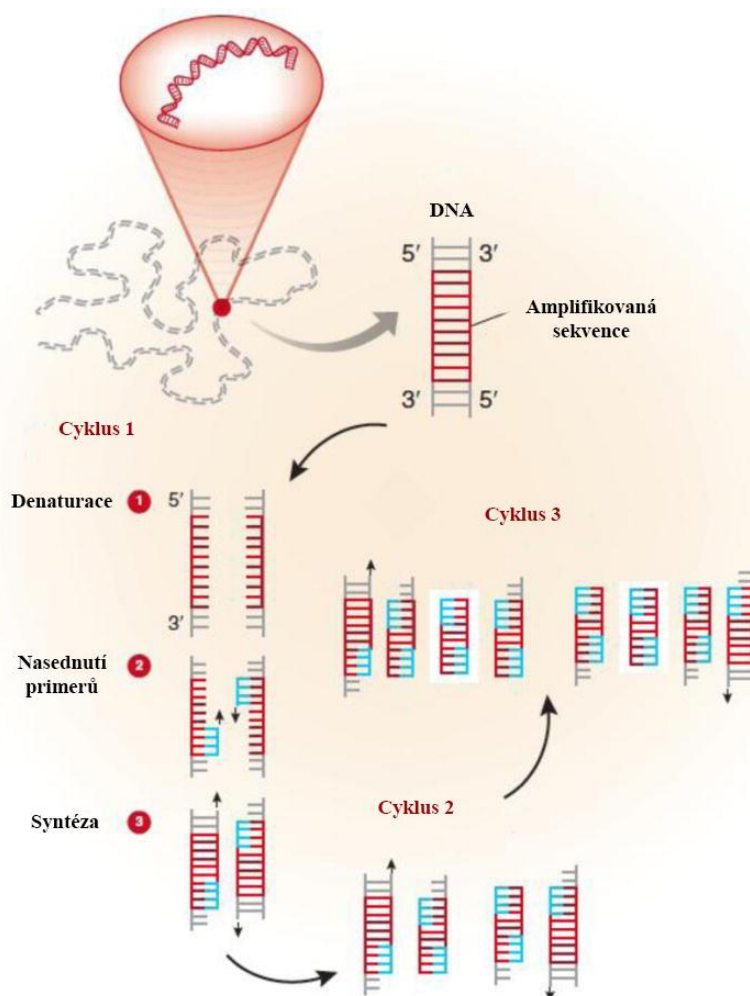
Pro správný průběh PCR je nezbytné připravit roztok, který se v současnosti obvykle skládá z templátové DNA, primerů (navržených pro úsek, který chceme amplifikovat), směs dNTP (deoxyribonukleosidtrifosfátů všech čtyř bází) a $MgCl_2$ v poměru odpovídajícím koncentraci, DNA polymeráza (Mullis ve svých původních pokusech používal DNA polymerázu I získanou z *Escherichi coli*, dnes je častější Taq polymeráza z horkovodní bakterie *Thermus aquaticus*, které lépe odolává denaturaci), purifikovaná H_2O a reakční pufr (nejčastěji kombinace KCl a Tris HCl, upravuje pH a koncentraci solí v reakci) (Lorenz 2012).

Pro každou reakci je třeba dvou typů primerů – přední „forward“ primery komplementární k sekvenci nacházející se ve směru 5' od zvoleného úseku a zadní „reverse“ primery ve směru 3'. Primery se volí tak, aby nasedaly co nejlíže z obou stran zvoleného úseku. Mívají délku 15-30 bází a nesmí být komplementární jeden k druhému ani v rámci svého vlákna (Lorenz 2012). Pro jejich navrhování se v současnosti využívá specializovaných programů, například Primer3Plus, Primer-BLAST nebo Primer Quest. Na vlastní syntézu navržených primerů se specializuje řada laboratoří.

Připravená směs je vystavena procesu o třech fázích, které se opakují až do dosažení požadovaného počtu kopií (obvykle třicetkrát) (Lorenz 2012):

- 1) Denaturace – směs je po dobu 30 až 60 sekund (příliš dlouhé zahřívání by mohlo znehodnotit DNA polymerázu) vystavena teplotě 95 °C, při níž se dvoušroubovice DNA přirozeně rozplétá (denaturuje) na volné polynukleotidové řetězce díky uvolnění vodíkových můstků.
- 2) Nasednutí primerů neboli annealing – teplota se na 30 sekund sníží na hodnotu odpovídající parametrům primerů, obvykle mezi 50 a 60 °C. Dochází k nasedání primerů na komplementární úseky templátové DNA.
- 3) Extenze – při teplotě 70-72 °C se po 30-60 sekund za působení DNA polymerázy od primerů syntetizují vlákna vybraného úseku. Po posledním cyklu se nechává proběhnout závěrečná prodloužená extenze o trvání 5 minut.

Přístroj, který se pro tuto reakci používá, se nazývá termální cykler.



Obrázek 24: Schéma PCR (Garibyan & Avashia 2013)

3.16.2. Desková gelová elektroforéza

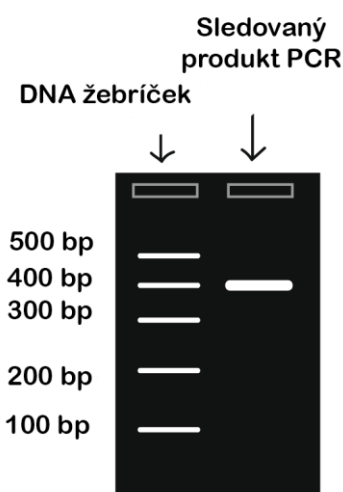
Desková gelová elektroforéza je jednou z nejčastějších metod využívaných v molekulární genetice. Má široké využití od separace a kontroly výsledků PCR, detekce mutací, sekvenace krátkých úseků (do 50 000 bp) po genetické profilování. Metoda je založena na rozdílné rychlosti, kterou se různě velké fragmenty DNA pohybují gelem v elektrickém poli směrem ke katodě. Kratší fragmenty urazí za stejnou dobu delší časový úsek (Lee et al. 2012).

Pro správný průběh elektroforézy je nutné zvolit vhodný typ gelu – pro větší očekávanou velikost fragmentů se volí gel agarózový, pro menší polyakrylamidový (menší částice by agarózovým gelem prostupovaly příliš rychle a výsledky by byly těžko rozlišitelné). Stejně tak existují také různé typy barviv – v minulosti se často využíval (a do určité míry se stále využívá) ethidium bromid, který se odráží pod ultrafialovým zářením, je však karcinogenní, proto se od něj v současnosti upouští ve prospěch bezpečnějších barviv, jako jsou GelRed™, SYBR® Green nebo SYBR® Safe (které se navíc odráží pod modrým světlem, tedy odpadá riziko poškození DNA UV zářením) (Huang & Fu 2011).

Prvním krokem při gelové elektroforéze je příprava gelu. Jeho koncentrace se obvykle pohybuje mezi 0,5 – 2 %, je nutné jej doplnit o pufr, nejčastěji TAE (40 mM Tris acetát + 1 mM EDTA) nebo TBE (45 mM Tris borát + 1 mM EDTA), a zvolené barvivo (Lee et al. 2012).

Takto připravená směs se nalije do nádrže elektroforézniho aparátu a nechá se ztuhnout s vloženým hřebínkem, který v gelu vytvoří aplikační jamky. K DNA je přimícháno nanášecí barvivo (kvůli orientaci) a vzorky jsou vpraveny do gelu. Do krajní jamky je vpraven takzvaný genetický žebříček, směs DNA se známými délkami, které slouží jako reference pro určování délky zkoumaných úseků. Gel je následně vystaven elektrickému napětí po dobu úměrnou hustotě gelu a velikosti fragmentů (Voytas 2001).

Po skončení elektroforézy je na gelu možno pozorovat pásy odpovídající délkou a šířkou aplikačním jamkám. Tyto pásy představují skupiny stejně dlouhých fragmentů (Lee et al. 2012).



Obrázek 25: Výsledek deskové gelové elektroforézy, dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

3.16.3. Kapilární elektroforéza

Další významnou metodou molekulární genetiky je kapilární elektroforéza. Může zastoupit deskovou elektroforézu při detekci mutací i sekvenování, pro které je díky ní efektivnější, a navíc jej lze snadněji zautomatizovat (Le et al. 1997).

Princip je podobný jako u deskové elektroforézy, místo roviny se však částice pohybují tenkou trubicí (kapilárou, průměr do 100 μm , délka 30-80 cm, obvykle z křemene) v polymeru.

Při vystavení aparátu elektrickému proudu vzniká v kapiláře elektroosmotický tok – na rozhraní pevné a kapalné fáze vzniká elektrická dvojvrstva, která uvádí celý roztok do pohybu. Na konci kapiláry je umístěn detektor, který v reálném čase zaznamenává částice na základě

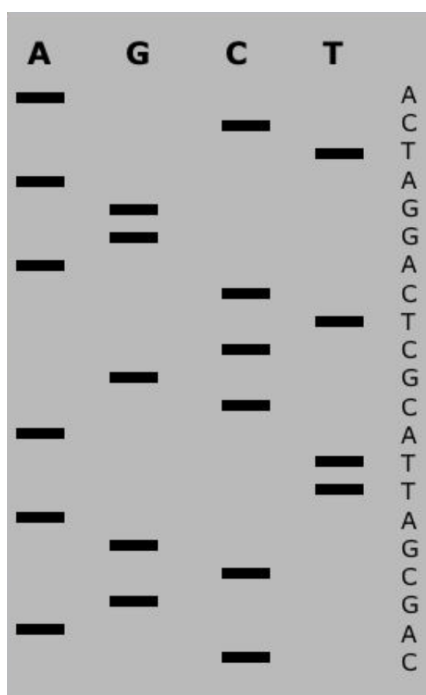
toho, jak odráží ultrafialové záření. Je proto třeba připravit pro kapilární elektroforézu vzorek s fluorescenčně označenými fragmenty (Kašička, 1997).

3.16.4. Sangerova metoda sekvenace

Sangerova metoda jednou z raných metod sekvenování, byla objevena koncem 70. let a je dodnes využívána pro sekvenaci krátkých úseků DNA. Je založená na délkovém polymorfismu, který pozoruje pomocí elektroforézy (Heather & Chain 2016).

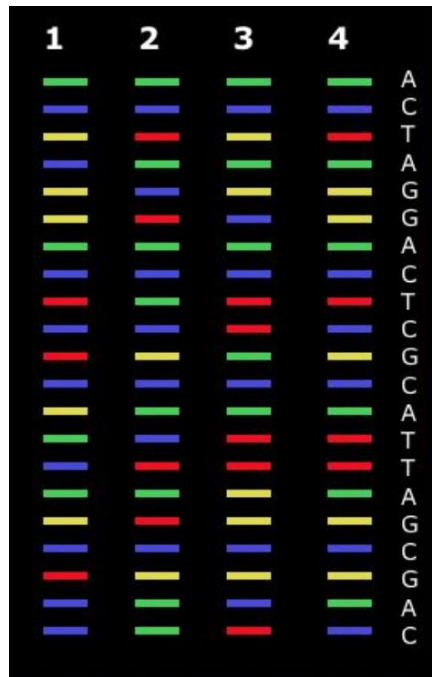
V původních Sangerových pokusech (Sanger et al. 1977) byl produkt PCR rozdělen do čtyř reakcí, každá se skládala ze standardních komponentů pro syntézu, a navíc malého množství jednoho typu dideoxynukleotidu (ddATP, ddTTP, ddGTP nebo ddCTP). Dideoxynukleotidy postrádají OH skupinu, tudíž se při jejich navázání syntéza úseku zastavuje a při PCR v roztoku vznikají různě dlouhé fragmenty končící vždy danou bází (Rédei 2008).

Takto zpracované vzorky byly následně umístěny do sousedících jamek v gelu a podrobeny elektroforéze. Z výsledného elektroforeogramu bylo možno přečíst sekvenci sledovaného úseku (viz Obrázek 25) (Heather & Chain 2016).



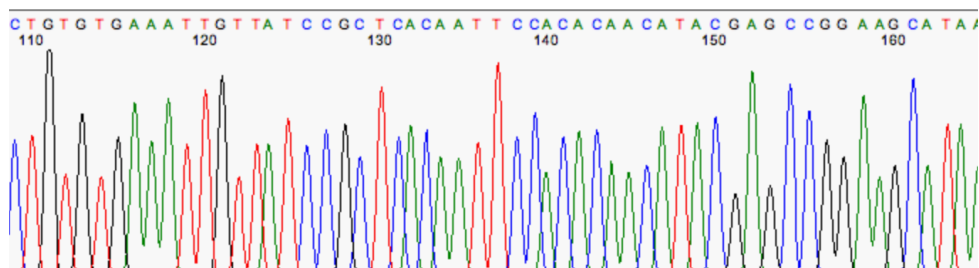
Obrázek 26: Ilustrace klasické Sangerovy sekvenace, dostupné z: <https://agctsequencing.wordpress.com/tag/sanger-sequencing/>

Zanedlouho po prvním objevu byla prozkoumána možnost fluorescenčního označení dideoxynukleotidů, každého jinou barvou. Tento objev výrazně zjednodušil celý proces, místo čtyř oddělených díky tomu mohla reakce probíhat v jedné nádobě a zvýšila se maximální délka sekvenovaného fragmentu (Heather & Chain 2016).



Obrázek 27: Ilustrace Sangerovy fluorescenční sekvenace s využitím deskové gelové elektroforézy, dostupné z: <https://agctsequencing.wordpress.com/tag/sanger-sequencing/>

Další vylepšení přišlo v podobě výměny deskové gelové elektroforézy za kapilární. Detektor ozařuje kapiláru UV paprskem a v reálném čase zaznamenává odrazy procházejících fragmentů. Tato metoda je rychlá a lze díky ní s vysokou přesností sekvenovat úseky do rozsahu 700 bází (Karger & Guttman 2009).



Obrázek 28: Výsledek Sangerovy sekvenace s využitím kapilární elektroforézy, dostupné z: <https://brcf.medicine.umich.edu/cores/dna-sequencing/faqs/sanger-sequencing-faqs/interpretation-of-sequencing-chromatograms/>

4. Metodika

4.1. Plemena koček využitá v této práci

Pro účely této práce byly získány vzorky od jedinců se známou délkou srsti, příslušníků plemen s dlouhosrstými/krátkosrstými variantami, tak čistě krátkosrstých. Vzorky byly získány stěrem z bukálních sliznic pomocí sterilních cytologických kartáčků (cytobrush). Celkem bylo analyzováno 13 vzorků od koček náležících k plemenům britská krátkosrstá kočka, britská dlouhosrstá kočka, devon rex, mainská mývalí kočka, perská, exotická a kanadský sphynx (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Přehled testovaných jedinců

Číslo vzorku	EMS zkratka plemene	Pohlaví	Délka srsti
KO1	BLH	kocour	dlouhá
KO2	BLH	kočka	polodlouhá
KO3	BSH	kocour	krátká
KO4	BSH	kočka	krátká
KO6	SPH	kočka	bezsrstá
KO7	EXO	kocour	krátká
KO8	EXO	kočka	krátká
KO9	PER	kočka	dlouhá
KO10	PER	kocour	dlouhá
KO14	MCO	kocour	polodlouhá
KO15	MCO	kocour	polodlouhá
KO22	DRX	kočka	krátká
KO23	DRX	kočka	krátká

4.2. Izolace DNA z bukálních stěrů

Pro izolaci genetické informace z buněk bylo využito sady NucleoSpin® Tissue od výrobce Machery-Nagel, který obsahuje:

- Lysis Buffer T1 a B3 (lyzační pufry T1 a B3)
- Wash Buffer BW a Wash Buffer B5 (promývací pufry)
- Elution Buffer BE (ředící pufr)
- Proteinase K (purifikační proteináza)
- Proteinase Buffer (proteinázový pufr)
- NucleoSpin® Tissue Columns (filtrační kolonky)
- Collection Tubes (2 ml) (sběrné zkumavky)

Kromě výše jmenovaného bylo využito následující:

- RNáza A
- mikrocentrifugační zkumavky (2 ml)
- latexové rukavice
- čisté laboratorní nástroje (pinzeta, kleštičky, pipety a pipetovací špičky), v případě potřeby průběžně dezinfikovány roztokem ethanolu

Postup izolace:

- 1) Koncové části odběrových kartáčků byly odštířeny do sterilních 5ml mikrocentrifugačních zkumavek, následně k nim bylo přidáno 180 μ l lyzačního pufru T1 (a účelem narušení buněčných membrán) a proteinázy K (za účelem purifikace). Obsah zkumavek byl následně promíchán pomocí vortexu a hodinu inkubován při 56 °C za občasného opětovného promíchávání.
- 2) Pro odstranění RNA a v důsledku dosažení vyšší čistoty izolované DNA byly do zkumavek přidány 4 μ l RNázy A, výsledný roztok byl následně promíchán a ponechán po dobu 5 minut při laboratorní teplotě.
- 3) Do zkumavek bylo přidáno 200 μ l lyzačního pufru B3, obsah byl vortexován a vystaven teplotě 70 °C po dobu 10 minut. V této fázi je dokončena lýza buněčných struktur.
- 4) Pomocí sterilní pinzety byly ze zkumavek odstraněny koncové části kartáčků.
- 5) Do zkumavek bylo přidáno 210 μ l koncentrovaného etanolu (96-100 %) za účelem vytvoření vhodných podmínek pro navázání DNA na membrány filtru, obsah zkumavek byl promíchán pomocí vortexu.
- 6) Obsah zkumavek byl přemístěn do sběrných zkumavek s filtračními kolonkami a centrifugován po dobu 1 minuty při přetížení 11 000 x g. Molekuly DNA po tomto kroku zůstávají navázány na membránu filtru.
- 7) Ze sběrných zkumavek byl odstraněn filtrát, po opatrném osušení do nich byla navracena příslušná filtrační kolonka.

- 8) Do filtračních kolonek bylo přidání 500 µl omývacího pufru BW, zkumavky s kolonkami byly opět 1 minutu centrifugovány při přetížení 11 000 x g. Výsledný filtrát byl odstraněn a postup zopakován za aplikace 600 µl omývacího pufru B5. Promývání zajišťuje odstranění reziduálních bílkovin na membráně.
- 9) Filtrát byl odstraněn ze sběrných zkumavek, filtrační kolonky navráceny a centrifugovány při přetížení 11 000 x g za účelem usušení membrány (odstranění reziduálního ethanolu z druhého promývacího pufru).
- 10) Filtrační kolonky byly opatrnou manipulací přemístěny do mikrocentrifugačních zkumavek, následně na ně bylo přidáno 100 µl ředícího pufru BE (předem nahřáto na 70 °C), zkumavky s kolonkami byly centrifugovány při přetížení 11 000 x g. V této fázi byla DNA uvolněna z membrány a vyplavena do výsledného roztoku.
- 11) Filtrační kolonky byly vyjmuty, načež zbyly zkumavky s izolátem DNA vysoké čistoty připraveným pro další zpracování. Izoláty byly pro pozdější zpracování skladovány při teplotě -20 °C.

4.3. Hodnocení kvality a kvantity izolované DNA

Koncentrace izolované DNA byla posouzena za ultrafialovo-viditelnou spektroskopií. K tomuto bylo využito přístroje NanoPhotometer od společnosti Implen, koncentrace vzorků byla posouzena na základě parametrů A260/A280 a A260/A230 (číselné údaje odpovídají vlnové délka světla, přístroj měří, jaké množství bylo pohlceno).

Kvalita DNA byla zhodnocena s využitím gelové elektroforézy SubCell (Bio-Rad). Malé množství izolátu bylo aplikováno do jamek 1% agaróзовého gelu s ethidium bromidem v prostředí TBE pufru. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu 30 minut. Výsledné elektroforeogramy byly uchovány v programu QuantityOne (GelDoc).

4.4. Navržení primerů

Pro každý ze tří cílových ampliconů byla navržena dvojice primerů na základě sekvence uvedené v mezinárodní genomové databázi Ensembl (viz Příloha 1). Za použití programu Primer3 0.4.0 (viz Výsledky) byly navrženy následující primery:

FGF5-CZU-A-F: CCCTACAAGATGCACTTAGAACC
FGF5-CZU-A-R: ATGTAGATGCACCTTCACCCAAC
FGF5-CZU-B-F: TGAACACTTGACTGCTAGGCTTTT
FGF5-CZU-B-R: CTGAGCAAATTGTCCCTCTACCA
FGF5-CZU-C-F: GGAAGTTTTCCGTCAGTGGAAT
FGF5-CZU-C-R: CGCTGAAACAAGTGACTGGACTT

Výsledná velikost ampliconu A byla stanovena na 568 bp, ampliconu B na 396 bp, ampliconu C na 600 bp.

4.5. Amplifikace částí genu *FGF5*

Amplifikace byla provedena metodou PCR a probíhala pro každý vzorek ve třech reakcích, jedna na každý ampikon. Reakce probíhaly v přístroji C1000 Touch™ Thermal Cycler od firmy Bio-Rad. Specifikace složení a průběhu jsou uvedeny v Tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2: Složení PCR

Složka	Množství
Izolovaná DNA	30 ng / 12,5 μ l
MgCl ₂	1,5 mM
Tris KCl	50 mM
dNTP	200 μ M
Příslušný forward primer	0,4 μ M
Příslušný reverse primer	0,4 μ M
TOP-BIO Enhancer	2 mM
BSA (hovězí sérový albumin)	0,5 μ g / 12,5 μ l
<i>Taq</i> polymeráza	0,7 U / 12,5 μ l

Tabulka 3: Teplotní a časový profil PCR

Fáze	Teplota	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	95 °C	180 s	1
Denaturace	95 °C	30 s	30
Annealing	61 °C	30 s	
Enlongace	72 °C	40 s	
Závěrečná enlongace	72 °C	420 s	1
Konzervace	12 °C	∞	

4.6. Kontrola úspěšnosti PCR

Po skončení reakce byla provedena kontrola kvality amplikonů deskovou gelovou elektroforézou na aparátu SubCell (Bio-Rad). K PCR produktům bylo přidáno 2 μ l nanášejícího pufru doplněným o barvivo a do krajní jamky byl nanesen vzorek s GenRulerem 100 bp Plus (1 μ l DNA žebříček, 2 μ l nanášecí pufr, 8 μ l H₂O).

4.7. Přečišťování

DNA fragmenty požadované délky je po elektroforéze třeba očistit od gelu a PCR artefaktů (reziduální nukleotidy a fragmenty). Pro tento účel byl použit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermoscientific).

Postup přečišťování:

- 1) Části obsahující DNA byly vyříznuty z gelu sterilním skalpelem, přeneseny do zkumavek a zváženy.
- 2) Ke vzorkům byl přidán ve hmotnostním poměru 1:1 binding pufr.
- 3) Vzorky byly po dobu 10 minut vystaveny teplotě 50 °C za občasného vortexování, dokud nebyl gel zcela rozpuštěn.
- 4) Byla provedena vizuální kontrola pH na základě barvy vzorku. Při optimálním pH měly vzorky žlutou barvu, v případě oranžové nebo fialové barvy bylo ke vzorkům přidáno 10 μ l octanu sodného. Ke vzorkům byl přidán 100% isopropanol ve hmotnostním poměru 1:1.
- 5) 800 μ l vzorku bylo nanášeno do zkumavek s filtračními kolonkami.
- 6) Vzorky byly 60 sekund centrifugovány při přetížení 14 000 x g.
- 7) Obsah sběrných zkumavek byl odstraněn, ke vzorkům byl přidáno 100 μ l binding pufru.
- 8) Vzorky byly 60 sekund centrifugovány při přetížení 14 000 x g.
- 9) Obsah sběrných zkumavek byl odstraněn a ke vzorkům bylo přidáno 700 μ l omývacího pufru (WB).
- 10) Vzorky byly 60 sekund centrifugovány při přetížení 14 000 x g.
- 11) Filtrační kolonky byly přeneseny do nových zkumavek a naplněny 25 μ l H₂O.
- 12) Vzorky byly 60 sekund centrifugovány při přetížení 14 000 x g za vzniku finálního roztoku čisté DNA.

Úspěšnost purifikace byla ověřena kvantifikací na přístroji NanoPhotometer od firmy Implen (viz bod 4.3).

4.8. Příprava vzorků pro sekvenaci

K přípravě amplikonů pro sekvenaci byl využit kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermoscientific). Složení je uvedeno v tabulce 4, profil reakce odpovídá tabulce 3.

Tabulka 4: Složení přípravné reakce pro sekvenaci

Složka	Objem	Koncentrace
PCR produkt	7,5 μ l	6,5 ng / μ l
Příslušný F primer	3,2 μ l	3,2 pmol / 20 μ l
BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	4 μ l	1x
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2 μ l	3 μ l / 20 μ l

Výslednou směs fragmentů různé délky bylo před vlastní sekvenací ještě třeba očistit od PCR artefaktů následujícím postupem:

- 1) Ke vzorkům byly přidáno 2 μ l roztoku glykogenu a pre-mix o složení 2 μ l 3M octanu sodného s 50 μ l 96 % etanolu. Směs byla promíchána a ponechána stát 15 minut při laboratorní teplotě.
- 2) Vzorky byly centrifugovány po dobu 15 minut a při přetížení 13 200 x g. Na dně zkumavky se vysrážely žádoucí látky, přebytečná tekutina byla odstraněna pipetou.
- 3) Ke zbylému produktu bylo přidáno 250 μ l 70% etanolu.
- 4) Zopakování kroku 2.
- 5) Zopakování kroku 3.
- 6) Zopakování kroku 2.
- 7) Vzorky byly vystaveny po 30 minut teplotě 50 °C.
- 8) Ke vzorkům bylo přidáno 15 μ l Hi-Di formamidu.

4.9. Sekvence částí genu *FGF5*

Vzorky byly přeneseny do polypropylenových zkumavek a po dobu 5 minut vystaveny teplotě 95 °C, při níž fragmenty DNA denaturovaly. Následně byly ochlazeny na teplotu 4 °C a umístěny do automatizovaného aparátu kapilární elektroforézy ABI PRISM 310 Genetic Analyser od firmy Applied Biosystems. Specifika sekvenace jsou uvedena v tabulce 4.

Tabulka 4: Specifika sekvenace kapilární elektroforézou

Parametr	Hodnota
Délka kapiláry	50 cm
Modul	SeqPOP6 (1mL) E
Polymer	POP6
Virtuální filtr	E
Doba nástřiku	30 s
Napětí nástřiku	2,5 kV
Teplota při separaci	50 °C
Napětí při separaci	11,3 kV
Doba separace	300 s

5. Výsledky

5.1. Kvalita a kvantita izolované genomické DNA

Kvalita izolované DNA vyhodnocená na základě poměru absorbancí A260/A280 dosahovala průměrné hodnoty 1,91 (Vk = 6%). Výtěžnost DNA získané z jednoho bukálního stěru vykazovala průměrné hodnoty 2,4 µg (Vk = 10,2%). Vzhledem k tomu, že cílem bakalářské práce nebyla optimalizace izolace genomické DNA, nebylo provedeno podrobnější statistické vyhodnocení výsledků.

5.2. Bioinformatické vyhodnocení genu FGF5 u kočky domácí

Kompletní sekvence genu FGF5 podle databáze Ensembl je uvedena v Příloze 1. Z Obrázku 29 je patrné, že u genu FGF5 existují 3 transkripční varianty. Na základě porovnání starších výsledků Kehler et al (2007) bylo zjištěno, že růst chlupů ovlivňuje transkripční varianta 1. Pro identifikaci SNP nalezených Kehler et al. (2007) bylo použito detailní schéma exonů a intronů první transkripční varianty (viz Obrázek 30).

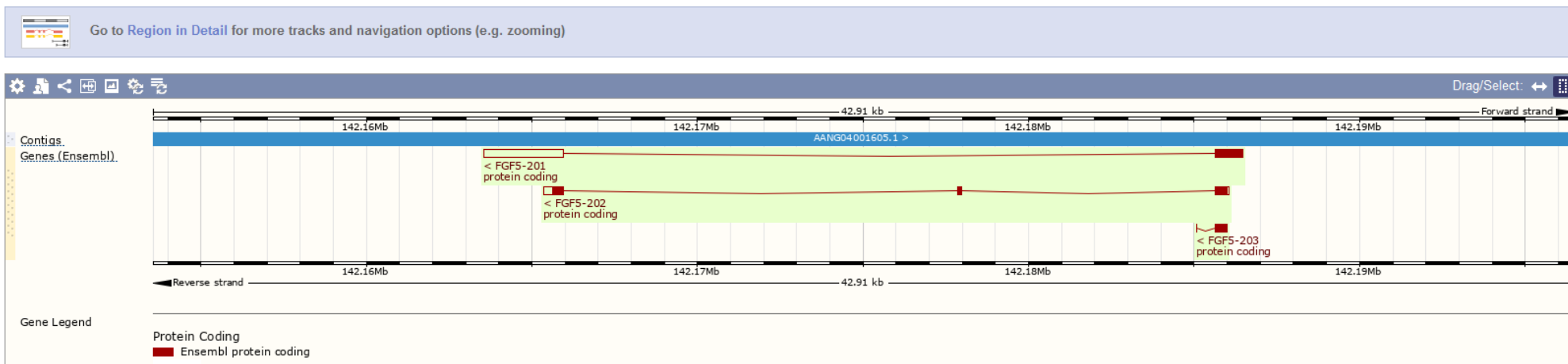
Gene: FGF5 ENSFCAG00000029635Description fibroblast growth factor 5 [Source:NCBI gene;Acc:[100136904](#)]Location [Chromosome B1: 142,163,553-142,186,463](#) reverse strand.
Felis_catus_9.0:CM001381.3About this gene This gene has 3 transcripts ([splice variants](#)), [188 orthologues](#), [21 paralogues](#), is a member of [1 Ensembl protein family](#) and is associated with [1 phenotype](#).Transcripts [Hide transcript table](#)

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	UniProt	Flags
FGF5-201	ENSFCAT00000057064.1	3232	279aa	Protein coding	A0A337SAC4	-
FGF5-202	ENSFCAT00000030948.3	1116	270aa	Protein coding	M3X9S6	-
FGF5-203	ENSFCAT00000044244.2	372	123aa	Protein coding	A0A2I2UL09	-

SummaryName [FGF5](#) (NCBI gene)

Ensembl version ENSFCAG00000029635.3

Gene type Protein coding

Annotation method Annotation produced by the Ensembl [genebuild](#).

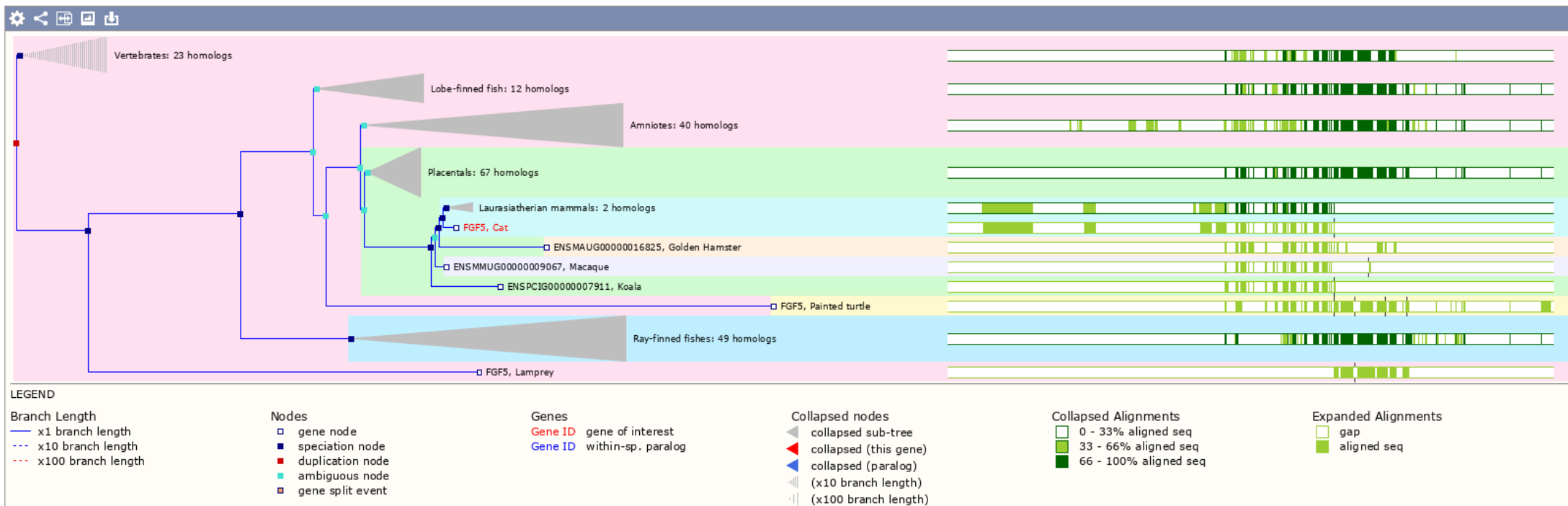
Obrázek 29: Transkripční varianty genu FGF5 u kočky domácí

Exons/ Introns Translated sequence Flanking sequence Intron sequence UTR
 Markup loaded

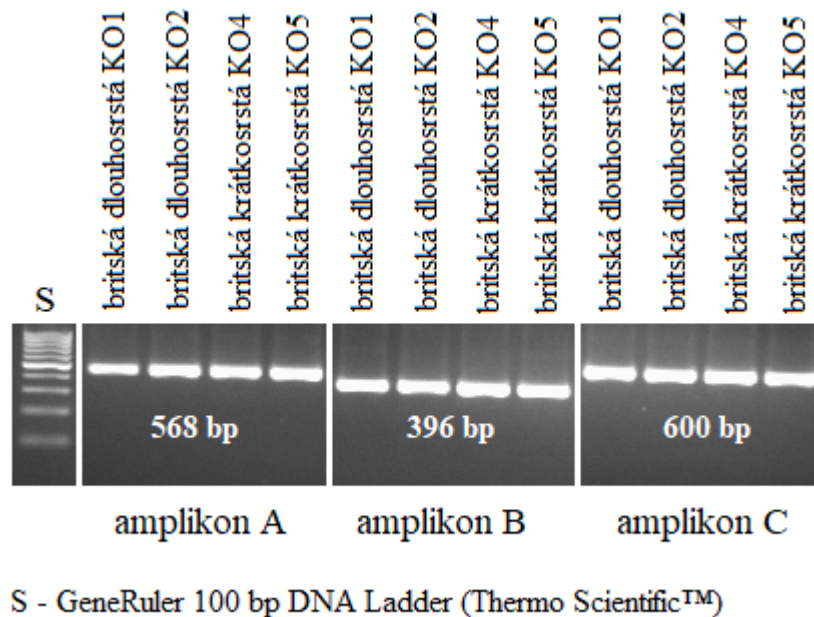
No.	Exon / Intron	Start	End	Length	Sequence
	5' upstream sequence			cggcgagggggcagcgccagaggcagcagccgcgcgggggctacggag
1	ENSFCAE00000358906	142,186,050	142,185,641	410	CCCAGAACCAACCTACAAGATGCACTTAGAACCCCGCGGCTGGAAGAATGAGCTTGTC CTTCTTCTCCTCCTTCTCCTCAGCCACCTAATCCTCAGCGCCTGGGCTCACGGGGAGAA GCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACCCGACGCCACCGGTCGGAACCCGGCGGGCGC CAGCAGCAGTAGGAGCAGCAGGGGCACGACGTCTTCTCTTCTCCTCCGTCTCTCCTC CCCTCGGCTTCTCTGGGCAACCAAGGAAGCGGCTTGAGCAGAGCAGTTCCAGTGGAG CCCCTCGGGGCGCCGACCGGCAGCCTCTACTGCAGAGTGGGCATCGGTTCCATCTGCA GATCTACCCGGATGGCAAAGTCAATGGCTCCCATGAAGCCAATATGTTAA
	Intron 1-2	142,185,640	142,177,964	7,677	gtaagtgtgctgcacctcctggcaaa.....tattttgggatttctgtcatcctag
2	ENSFCAE00000229292	142,177,963	142,177,860	104	GTATTTTGGAAATATTGCTGTGTCTCAGGGGATGTAGGAATACGAGGAGTTTTAGCA ACAATTTTTAGCGATGTCAAAAAAAGGAAAACCTCCATGCAAGT
	Intron 2-3	142,177,859	142,165,962	11,898	gtaagtagaaccactttatgtttgt.....agtttttctctttccccaccag
3	ENSFCAE00000233733	142,165,961	142,165,360	602	GCCAAATTTACCGATGACTGCAAGTTCAGGGAGCGATTCCAAGAAAACAGCTATAATACC TATGCCTCAGCAATACACAGAAGTGCAGCCAGCAGGCGGGAATGGTATGTGGCCCTCAAC AAGAGAGGGAAGCTAAGCGAGGCTGCAGCCCGCGGTTAAACCCAGCAGCATCTTACC CACTTTCTGCCAAGATTCAAGCAGCTGGAGCAGCCAGAACTTTCTTTACGGTCACGTGT CCTGAGAAGAAAAGCCACCCAGTCTGTCAAGCCAAAGTTCCCTTTCTGCACCTCGG AAAAGTCCCAACCCGTGAAGTACAGACTCAAATTTTCGCTTTGGATAATATTCTTCTGG CCTTGTGAGAAACCATGCCTTCGCCTCAGGAGTTCCACGGGTGCTTTATGGCTGAA GAAAACGTTCCGATACACCTGCAGCTACACTCCACCGTAGTGAAGTCCAGTCACTTGT TCAGCGGACTGAAACAAAAGTGTCTGATAGGAACTGAACTGGAATTCTTTGTCCAA CATAGGGAGCACACTGCTCCAGTCAAGACGACATAAAGCCTTTTGTCTTATGCTTCGTGC AT
	3' downstream sequence				actctgtattttgagaagttaaacagcgtggactatgtattttctgac.....

Obrázek 30: Struktura exonů a intronů první transkripční varianty genu FGF5 u kočky domácí

Z literární rešerše vyplynulo, že gen *FGF5* ovlivňuje délku srsti u řady savců. Pro potvrzení této informace bylo provedeno vyhodnocení známých sekvencí tohoto genu u různých druhů savců. Na následujícím Obrázku je uveden fylogenetický strom získaný na základě kompletní sekvence genu *FGF5* s vyznačenou pozicí sekvence u kočky domácí.



Obrázek 31: Sekvenční podobnosti genu *FGF5* u savců



Obrázek 34: Výsledky elektroforetické separace ampliconů A, B, C genu FGF5

5.5. Sekvenační analýza a detekce SNP v ampliconech genu FGF5

U všech hodnocených vzorků byly spolehlivě získány sekvence všech ampliconů, které jsou uvedeny níže. Oblasti nasedání primerů u ampliconu A jsou označeny žlutou barvou, u ampliconu B zeleně a u ampliconu C červeně. U každého ampliconu jsou rámečkem vyznačeny SNP popsané Kehler et al. (2007). Modře podbarveným rámečkem jsou vyznačeny mutace M1 (amplicon A), M2 (amplicon B), M3 a M4 (amplicon C)

Britská krátkosrstá (KO4, KO5) – amplicon A

CCCTACAAGATGCACTTAGAAC CCCGCGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCTTCTTCTCCTCCTCTTCTCAGCC
 ACCTAATCCTCAGCGCCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACCCGCAGCCACCG
 GTCGGAACCCGGCGGGGCCAGCAGCAGTAGGAGCAGCAGGGCACGACGTCTTCTTCTTCTTCTCCTCCGACTCCT
 CCTCCCCTCGGCTTCTCTGGGCAACCAAGGAAGCGGCTTGGAGCAGAGCAGTTTCCAGTGGAGCCCCTCGGGGC
 GCCGGACCGGCAGCCTCTACTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGGATGGCAAAGTCAATG
 GCTCCCATGAAGCCAATA GTTAAGTAAGTTGCTCGCCCTCCTGGCAAAGCGCGTCTAAGCGGGCGATGGGGGG
 ATTCGGGAGGGACAGAGGCTATTCCTGGCCAGAGGCGCACCTTCCGGAGCCCTGGCTCCTGGGACTCAGCTGT
 CCCTCGGAACCGCGGGGCGG GTTGGGTGAAGGTGCATCTACAT

Britská krátkosrstá (KO4, KO5) – amplicon B

TGAACACTTGACTGCTAGGCTTT CTTTTTAAACATAATGAATGTTATGGAAAATAAGGATGTTAAATACTGTTT
 TTTTTTTTTAAATCAAACCTATAAAGAATGAAAAGAATCTGTGTAGGAATTTAATTCTTCACAATGGTATATAGA
 GGAGTCTGTGTTTTATTTGGGATTTCTGTATCCTAGGTATTTTGGAAATATTTGCTGTGTCTCAGGGGATTGT
 AGGAATA GAGGAGTTTTAGCAACAAATTTTAGCGATGTCAAAAAAGGAAAACCTCCATGCAAGTGTAAAGTAG
 AACCACCTTATGTTTGTTCAGGTGTTACGGAGATTTACATTTGTAGAATGGAATGAAGTGATTTTCTACAT TG
 GTAGAGGGACAATTTGCTCAG

Britská krátkosrstá (KO4, KO5) – ampikon C

GGAAGTTTTCCGTCAGTGGAAATTTTGGTTTTTCCTTTACAGTATAAGACCTCATTTTTATTACATGCTGAAAATAT
TATTACTATTTACAAGTTTTTCTTCTTTCCCCCACCAGGCCAAATT**TA**CCGATGACTGCAAGTTCAGGGAGCGA
TTCCAAGAAAACAGCTATAATACCTATGCCTCAGCAATACACAGAAGT**GAGCCAGCAGG**CCGGGAATGGTATGTG
GCCCTCAA**A**AAGAGAGGGAAAGCTAAGCGAGGCTGCAGCCCCGGGTAAACCCCAGCACATCTCTACCCACTTT
CTGCCAAGATTCAAGCA**A**CTGGAGCAGCCAGAAGCTTTCTTTACGGTCACTGTTCTGAGAAGAAAAAGCCACCC
AGTCTGTCAAGCCAAAGGTTCCCTTTCTGCACCTCGGAAAAGTCCCAACACCGTGAAGTACAGACT**G**AAATTT
CGCTTTGGATAATATTCTTCTTGGCCTTGTGAGAAACCATGCCTTCGCCTCAGGAGTTTCCACGGGTGCTTTAT
GGCTCTGAAGAAAACGTTCCGATACACCTGCAGCTACACTCCACCGTAGT**AAGTCCAGTCACTTGTTTCAGCG**

Britská dlouhosrstá (KO1, KO2) – ampikon A

CCCTACAAGATGCACTTAGAACCCCGCGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCTTCTTCTCCTCTTCTCCTCAGCC
ACCTAATCCTCAGCGCCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACCCGCAGCCACCG
GTCGGAACCCGGCGGGGCCAGCAGCAGTAGGAGCAGCAG**G**GGCAGCAGCTTCTCCTCTTCTTCTCCTCCG**A**CTCCT
CCTCCC**A**CTCGGCTTCTCTGGGCAACCAAGGAAGCGGCTTGGAGCAGAGCAGTTTCCAGTGGAGCCCTCGGGGC
GCCGGACCGGCAGCCTCTACTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGGATGGCAAAGTCAATG
GCTCCCATGAAGCCAATA**C**GTTAAGTAAGTTGCTCGCCCTCCTGGCAAAGCGCGTCTAAGCGGGCGATGGGGGG
ATTCCGGGAGGGACAGAGGCTATTCCTGGCCAGAGGCGCACCTTCCGGAGCCCTGGCTCCTGGGACTCAGCTGT
CCCTCGGAACCGCGGGGCG**GTTGGGTGAAGGTGCATCTACAT**

Britská dlouhosrstá (KO1, KO2) – ampikon B

TGAACACTTGACTGCTAGGCTTTTCTTTTTTAACATAATGAATGTTATGGAAAATAAGGATGTTAAATACTGTTT
TTTTTTTTTAAATCAAACCTATAAAGAATGAAAAGAATCTGTGTAGGAATTTAATTCTTACAATGGTATATAGA
GGAGTCTGTGTTTTATTTTGGGATTTCTGTATCCTAGGTATTTTGGAAATATTTGCTGTGTCTCAGGGGATTGT
AGGAATA**C**GAGGAGTTTTAGCAACAAATTTTAGCGATGTCAAAAAAGGAAAACCTCCATGCAAGTGTAAAGTAG
AACCACCTTATGTTTGTTCAGGTTACGGAGATTTACATTTGTAGAATGGAATGAAGTGAATTTTCTACAT**TG**
GTAGAGGGACAATTTGCTCAG

Britská dlouhosrstá (KO1, KO2) – ampikon c

GGAAGTTTTCCGTCAGTGGAAATTTTGGTTTTTCCTTTACAGTATAAGACCTCATTTTTATTACATGCTGAAAATAT
TATTACTATTTACAAGTTTTTCTTCTTTCCCCCACCAGGCCAAATT**TC**CCGATGACTGCAAGTTCAGGGAGCGA
TTCCAAGAAAACAGCTATAATACCTATGCCTCAGCAATACACAGAAGT**GAGCCAGCAGG**CCGGGAATGGTATGTG
GCCCTCAA**A**AAGAGAGGGAAAGCTAAGCGAGGCTGCAGCCCCGGGTAAACCCCAGCACATCTCTACCCACTTT
CTGCCAAGATTCAAGCA**A**CTGGAGCAGCCAGAAGCTTTCTTTACGGTCACTGTTCTGAGAAGAAAAAGCCACCC
AGTCTGTCAAGCCAAAGGTTCCCTTTCTGCACCTCGGAAAAGTCCCAACACCGTGAAGTACAGACT**G**AAATTT
CGCTTTGGATAATATTCTTCTTGGCCTTGTGAGAAACCATGCCTTCGCCTCAGGAGTTTCCACGGGTGCTTTAT
GGCTCTGAAGAAAACGTTCCGATACACCTGCAGCTACACTCCACCGTAGT**AAGTCCAGTCACTTGTTTCAGCG**

Exotická (KO7, KO8) – ampikon A

CCCTACAAGATGCACTTAGAACCCCGCGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCTTCTTCTCCTCTTCTCCTCAGCC
ACCTAATCCTCAGCGCCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACCCGCAGCCACCG
GTCGGAACCCGGCGGGGCCAGCAGCAGTAGGAGCAGCAG**G**GGCAGCAGCTTCTCCTCTTCTTCTCCTCCG**T**CTCCT
CCTCCC**A**CTCGGCTTCTCTGGGCAACCAAGGAAGCGGCTTGGAGCAGAGCAGTTTCCAGTGGAGCCCTCGGGGC
GCCGGACCGGCAGCCTCTACTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGGATGGCAAAGTCAATG
GCTCCCATGAAGCCAATA**C**GTTAAGTAAGTTGCTCGCCCTCCTGGCAAAGCGCGTCTAAGCGGGCGATGGGGGG
ATTCCGGGAGGGACAGAGGCTATTCCTGGCCAGAGGCGCACCTTCCGGAGCCCTGGCTCCTGGGACTCAGCTGT
CCCTCGGAACCGCGGGGCG**GTTGGGTGAAGGTGCATCTACAT**

Exotická (KO7, KO8) – ampikon B

TGAACACTTGACTGCTAGGCTTTTCTTTTTTAACATAATGAATGTTATGGAAAATAAGGATGTTAAATACTGTTT
TTTTTTTTTAAATCAAACCTATAAAGAATGAAAAGAATCTGTGTAGGAATTTAATTCTTCACAATGGTATATAGA
GGAGTCTGTGTTTTATTTTGGGATTTCTGTCATCCTAGGTATTTTGGAAATATTTGCTGTGTCTCAGGGGATTGT
AGGAATA**G**GAGGAGTTTTTCAGCAACAAATTTTTAGCGATGTCAAAAAAAGGAAAACCTCCATGCAAGTGTAAAGTAG
AACCACCTTATGTTTGTTCAGGTGTTACGGAGATTTACATTTGTAGAATGGAATGAAGTGATTTTCTACAT**TG**
GTAGAGGGACAATTTGCTCAG

Exotická (KO7, KO8) – ampikon C

GGAAGTTTTCCGTCAGTGGAAATTTTGGTTTTCTTTTACAGTATAAGACCTCATTTTATTACATGCTGAAAATAT
TATTACTATTTACAAGTTTTTTCTTTTCCCCCACCAGGCCAAATT**TA**CCGATGACTGCAAGTTCAGGGAGCGA
TTCCAAGAAAACAGCTATAATACCTATGCCTCAGCAATACACAGAAGT**GAGCCAGCAGG**CCGGGAATGGTATGTG
GCCCTCAA**G**AAGAGAGGGAAAGCTAAGCGAGGCTGCAGCCC**GCGGGT**TAAACCCCAGCACATCTCTACCCACTTT
CTGCCAAGATTCAAGCA**G**CTGGAGCAGCCAGA**ACTTTCTTT**CACGGTCACTGTT**CCTGAGA**AGAAAAAGCCACCC
AGTCTGTCAAGCCAAAGGTTCCCTTTCTGCACCTCGGAAAAGTCCCAACACCGTGAAGTACAGACT**C**AAATTT
CGCTTTGGATAATATTCTTCTTGGCCTTGTGAGAAACCATGCCTTCGCCTCAGGAGTTTTCCACGGGTGCTTTAT
GGCTCTGAAGAAAACGTTCCGATACACCTGCAGCTACACTCCACCGTAGT**G****AAGTCCAGTCACTTGTTCAGCG**

Perská (KO9, KO10) – ampikon A

CCCTACAAGATGCACTTAGAACCCCCGCGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCTTCTTCTCCTCCTCCTCCTCAGCC
ACCTAATCCTCAGCGCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCCAAAGGGCAACCCGGACCCGCAGCCACCG
GTCGGAACCCGGCGGGGCCAGCAGCAGTAGGAGCAGCAG**G**GGCACGACGTCTTCTTCTTCTCCTCCG**T**CTCCT
CCTCCC**A**CTCGGCTTCTCTGGGCAACCAAGGAAGCGGCTTGGAGCAGAGCAGTTTTCCAGTGGAGCCCTCGGGGC
GCCGGACCCGGCAGCCTCTACTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGGATGGCAAAGTCAATG
GCTCCCATGAAGCCAATA**G**TTAAGTAAGTTGCTCGCCCTCCTGGCAAAGCGCGTCTAAGCGGGCGATGGGGG
ATTCCGGAGGGACAGAGGCTATCCCTGGCCAGAGGCGCACCTTCCGGAGCCCTGGCTCCTGGGACTCAGCTGT
CCCTCGGAACCCGGGGCGG**G****TTGGGTGAAGGTGCATCTACAT**

Perská (KO9, KO10) – ampikon B

TGAACACTTGACTGCTAGGCTTTTCTTTTTTAACATAATGAATGTTATGGAAAATAAGGATGTTAAATACTGTTT
TTTTTTTTTAAATCAAACCTATAAAGAATGAAAAGAATCTGTGTAGGAATTTAATTCTTCACAATGGTATATAGA
GGAGTCTGTGTTTTATTTTGGGATTTCTGTCATCCTAGGTATTTTGGAAATATTTGCTGTGTCTCAGGGGATTGT
AGGAATA**G**GAGGAGTTTTTCAGCAACAAATTTTTAGCGATGTCAAAAAAAGGAAAACCTCCATGCAAGTGTAAAGTAG
AACCACCTTATGTTTGTTCAGGTGTTACGGAGATTTACATTTGTAGAATGGAATGAAGTGATTTTCTACAT**TG**
GTAGAGGGACAATTTGCTCAG

Perská (KO9, KO10) – ampikon C

GGAAGTTTTCCGTCAGTGGAAATTTTGGTTTTCTTTTACAGTATAAGACCTCATTTTATTACATGCTGAAAATAT
TATTACTATTTACAAGTTTTTTCTTTTCCCCCACCAGGCCAAATT**TC**CCGATGACTGCAAGTTCAGGGAGCGA
TTCCAAGAAAACAGCTATAATACCTATGCCTCAGCAATACACAGAAGT**GAGCCAGCAGG**CCGGGAATGGTATGTG
GCCCTCAA**G**AAGAGAGGGAAAGCTAAGCGAGGCTGCAGCCC**GCGGGT**TAAACCCCAGCACATCTCTACCCACTTT
CTGCCAAGATTCAAGCA**G**CTGGAGCAGCCAGA**ACTTTCTTT**CACGGTCACTGTT**CCTGAGA**AGAAAAAGCCACCC
AGTCTGTCAAGCCAAAGGTTCCCTTTCTGCACCTCGGAAAAGTCCCAACACCGTGAAGTACAGACT**C**AAATTT
CGCTTTGGATAATATTCTTCTTGGCCTTGTGAGAAACCATGCCTTCGCCTCAGGAGTTTTCCACGGGTGCTTTAT
GGCTCTGAAGAAAACGTTCCGATACACCTGCAGCTACACTCCACCGTAGT**G****AAGTCCAGTCACTTGTTCAGCG**

Mainská mývalí (KO14, KO15) – amplikon A

CCCTACAAGATGCACTTAGAACCCCGCGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCTTCCTTCTCCTCCTCTTCCTCAGCC
ACCTAATCCTCAGCGCCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACCCGCAGCCACCG
GTCGGAACCCGGCGGGGCCAGCAGCAGTAGGAGCAGCAG**G**GGCACGACGTCTTCTCCTTCTTCTCCTCCG**T**CTCCT
CCTCCC**A**CTCGGCTTCTCTGGGCAACCAAGGAAGCGGGCTTGGAGCAGAGCAGTTTCCAGTGGAGCCCCTCGGGGC
GCCGGACCCGGCAGCCTCTACTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGGATGGCAAAGTCAATG
GCTCCCATGAAGCCAATA**C**GTTAAGTAAGTTGCTCGCCCTCCTGGCAAAGCGCGTCTAAGCGGGCGATGGGGGG
ATTCGGGAGGGACAGAGGCTATTCCTGGCCAGAGGCGCACCTTCCGGAGCCCTGGCTCCTGGGACTCAGCTGT
CCCTCGGAACCCGGCGGGCGG**GTTGGGTGAAGGTGCATCTACAT**

Mainská mývalí (KO14, KO15) – amplikon B

TGAACACTTGACTGCTAGGCTTTTCTTTTTTAACATAATGAATGTTATGGAAAATAAGGATGTTAAATACTGTTT
TTTTTTTTTAAATCAAACTATAAAGAATGAAAAGAATCTGTGTAGGAATTTAATTCTTCACAATGGTATATAGA
GGAGTCTGTGTTTTATTTTGGGATTTCTGTCATCCTAGGTATTTTGGAAATATTTGCTGTGTCTCAGGGGATTGT
AGGAATA**C**GAGGAGTTTTAGCAACAAATTTTAGCGATGTCAAAAAAGGAAAACCTCCATGCAAGTGTAAAGTAG
AACCACCTTATGTTTGTTCAGGTGTTACGGAGATTTACATTTGTAGAATGGAATGAAGTGATTTTCTACAT**TG**
GTAGAGGGACAATTTGCTCAG

Mainská mývalí (KO14, KO15) – amplikon C

GGAAGTTTTCCGTCAGTGGAAATTTTGGTTTTCTTTTACAGTATAAGACCTCATTATTACATGCTGAAAATAT
TATTACTATTTACAAGTTTTTCTTTTCCCCACCAGGCCAAAT**TC**CCGATGACTGCAAGTTCAGGGAGCGA
TTCCAAGAAAACAGCTATAATACCTATGCCTCAGCAATACACAGAAGT**G**AGCCAGCAGGCCGGGAATGGTATGTG
GCCCTCAA**C**AAGAGAGGGAAAGCTAAGCGAGGCTGCAGCCCGGGTTAAACCCAGCACATCTCTACCCACTTT
CTGCCAAGATTCAAGCA**G**CTGGAGCAGCCAGAACTTTCTTTACGGTCACTGTTCTGAGAAGAAAAAGCCACCC
AGTCTGTCAAGCCAAAGGTTCCCTTTCTGCACCTCGGAAAAGTCCCAACACCGTGAAGTACAGACT**C**AAATTT
CGTTTTGGATAATATTCTTCTTGGCCTTGTGAGAAACCATGCCTTCGCCTCAGGAGTTTTCCACGGGTGCTTTTAT
GGCTCTGAAGAAAACGTTCCGATACACCTGCAGCTACACTCCACCGTAGT**AAGTCCAGTCACTTGTTCAGCG**

Devon rex (KO22, KO23) – amplikon A

CCCTACAAGATGCACTTAGAACCCCGCGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCTTCCTTCTCCTCCTCTTCCTCAGCC
ACCTAATCCTCAGCGCCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACCCGCAGCCACCG
GTCGGAACCCGGCGGGGCCAGCAGCAGTAGGAGCAGCAG**G**GGCACGACGTCTTCTCCTTCTTCTCCTCCG**T**CTCCT
CCTCCC**A**CTCGGCTTCTCTGGGCAACCAAGGAAGCGGGCTTGGAGCAGAGCAGTTTCCAGTGGAGCCCCTCGGGGC
GCCGGACCCGGCAGCCTCTACTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGGATGGCAAAGTCAATG
GCTCCCATGAAGCCAATA**C**GTTAAGTAAGTTGCTCGCCCTCCTGGCAAAGCGCGTCTAAGCGGGCGATGGGGGG
ATTCGGGAGGGACAGAGGCTATTCCTGGCCAGAGGCGCACCTTCCGGAGCCCTGGCTCCTGGGACTCAGCTGT
CCCTCGGAACCCGGCGGGCGG**GTTGGGTGAAGGTGCATCTACAT**

Devon rex (KO22, KO23) – amplikon B

TGAACACTTGACTGCTAGGCTTTTCTTTTTTAACATAATGAATGTTATGGAAAATAAGGATGTTAAATACTGTTT
TTTTTTTTTAAATCAAACTATAAAGAATGAAAAGAATCTGTGTAGGAATTTAATTCTTCACAATGGTATATAGA
GGAGTCTGTGTTTTATTTTGGGATTTCTGTCATCCTAGGTATTTTGGAAATATTTGCTGTGTCTCAGGGGATTGT
AGGAATA**C**GAGGAGTTTTAGCAACAAATTTTAGCGATGTCAAAAAAGGAAAACCTCCATGCAAGTGTAAAGTAG
AACCACCTTATGTTTGTTCAGGTGTTACGGAGATTTACATTTGTAGAATGGAATGAAGTGATTTTCTACAT**TG**
GTAGAGGGACAATTTGCTCAG

Devon rex (KO22, KO23) – ampikon C

GGAAGTTTTCCGTCAGTGGAAATTTTGGTTTTTCCTTTACAGTATAAGACCTCATTTTTATTACATGCTGAAAATAT
TATTACTATTTACAAGTTTTTCTTCTTTCCCCCACCAGGCCAAATT**TA**CCGATGACTGCAAGTTCAGGGAGCGA
TTCCAAGAAAACAGCTATAATACCTATGCCTCAGCAATACACAGAAGTGAAGCCAGCAGGCCGGGAATGGTATGTG
GCCCTCAA**C**AAGAGAGGGGAAAGCTAAGCGAGGCTGCAGCCCCGGGTTAAACCCCAGCACATCTCTACCCACTTT
CTGCCAAGATTCAAGCA**C**CTGGAGCAGCCAGAAGCTTTCTTTACGGTCACTGTTTCTGAGAAGAAAAAGCCACCC
AGTCTGTCAAGCCAAAGGTTCCCTTTCTGCACCTCGGAAAAGTCCCAACACCGTGAAGTACAGACT**C**AAATTT
CGCTTTGGATAATATTCTTCTTGGCCTTGTGAGAAACCATGCCTTCGCCTCAGGAGTTTCCACGGGTGTCTTTAT
GGCTCTGAAGAAAACGTTCCGATACACCTGCAGCTACACTCCACCGTAGT**G****AAGTCCAGTCACTTGTTCAGCG**

Sphynx (KO6) – ampikon A

CCCTACAAGATGCACTTAGAACCCCCGCGCTGGAAGAATGAGCTTGTCTTCTTCTCCTCCTCTTCTCAGCC
ACCTAATCCTCAGCGCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACCCGCAGCCACCG
GTCGGAACCCGGCGGGCGCCAGCAGCAGTAGGAGCAGCAG**G**GGCACGACGTCTTCTTCTTCTCCTCCG**T**CTCCT
CCTCCC**C**CTCGGCTTCTCTGGGCAACCAAGGAAGCGGCTTGGAGCAGAGCAGTTTTCCAGTGGAGCCCTCGGGG
GCCGGACCGGCAGCCTCTACTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGGATGGCAAAGTCAATG
GCTCCCATGAAGCCAATA**C**GTTAAGTAAGTTGTCTCGCCCTCCTGGCAAAGCGCGTCTAAGCGGGCGATGGGGG
ATTCCGGAGGGACAGAGGCTATCCCTGGCCAGAGGCGCACCTTCCGGAGCCCTGGCTCCTGGGACTCAGCTGT
CCCTCGGAACCGCGGGGCG**G****TTGGGTGAAGGTGCATCTACAT**

Sphynx (KO6) – ampikon B

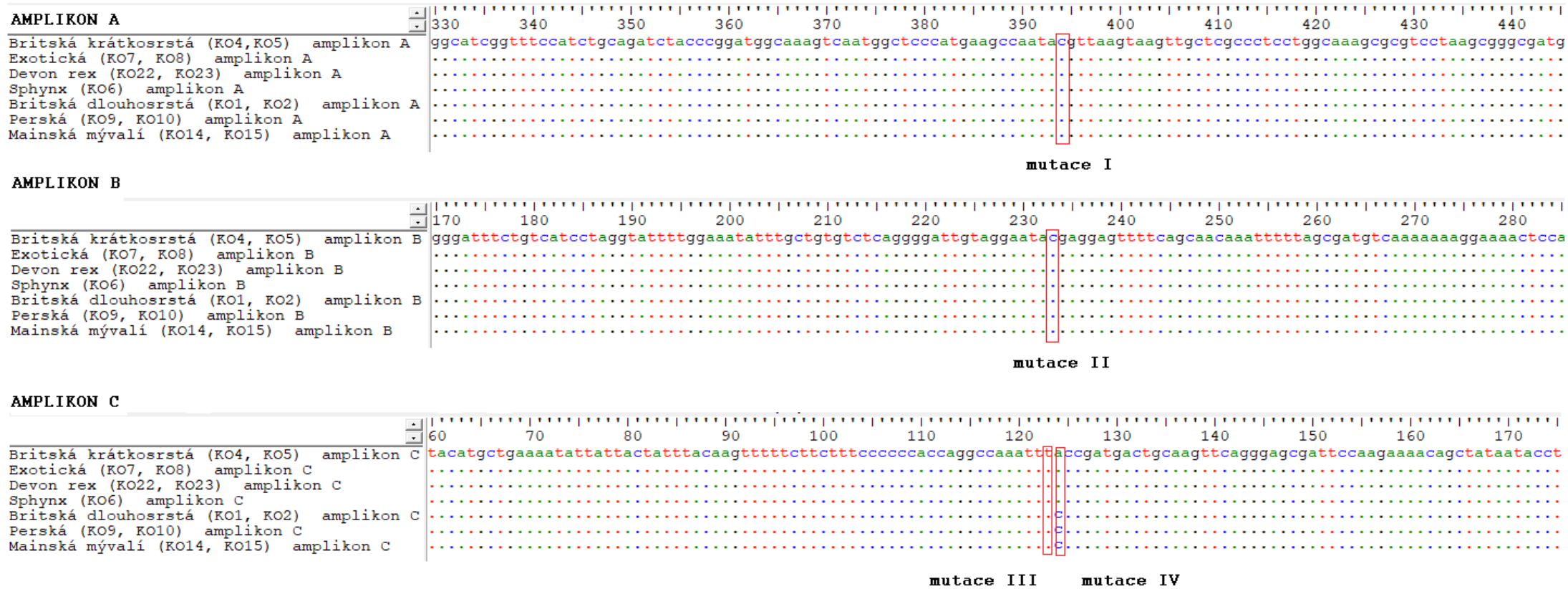
TGAACACTTGACTGCTAGGCTTTTCTTTTTTAACATAATGAATGTTATGGAAAATAAGGATGTTAAATACTGTTT
TTTTTTTTTAAATCAAACCTATAAAGAATGAAAAGAATCTGTGTAGGAATTTAATTCTTCAATGGTATATAGA
GGAGTCTGTGTTTTATTTGGGATTTCTGTATCCTAGGTATTTTGGAAATATTTGCTGTGTCTCAGGGGATTGT
AGGAATA**C**GAGGAGTTTTCAGCAACAAATTTTAGCGATGTCAAAAAAGGAAAACCTCCATGCAAGTGTAAGTAG
AACCACCTTATGTTTGTTCAGGTGTTACGGAGATTTACATTTGTAGAATGGAATGAAGTGATTTTCTACAT**TG**
GTAGAGGGACAATTTGCTCAG

Sphynx (KO6) – ampikon C

GGAAGTTTTCCGTCAGTGGAAATTTTGGTTTTTCCTTTACAGTATAAGACCTCATTTTTATTACATGCTGAAAATAT
TATTACTATTTACAAGTTTTTCTTCTTTCCCCCACCAGGCCAAATT**TA**CCGATGACTGCAAGTTCAGGGAGCGA
TTCCAAGAAAACAGCTATAATACCTATGCCTCAGCAATACACAGAAGTGAAGCCAGCAGGCCGGGAATGGTATGTG
GCCCTCAA**C**AAGAGAGGGGAAAGCTAAGCGAGGCTGCAGCCCCGGGTTAAACCCCAGCACATCTCTACCCACTTT
CTGCCAAGATTCAAGCA**C**CTGGAGCAGCCAGAAGCTTTCTTTACGGTCACTGTTTCTGAGAAGAAAAAGCCACCC
AGTCTGTCAAGCCAAAGGTTCCCTTTCTGCACCTCGGAAAAGTCCCAACACCGTGAAGTACAGACT**C**AAATTT
CGCTTTGGATAATATTCTTCTTGGCCTTGTGAGAAACCATGCCTTCGCCTCAGGAGTTTCCACGGGTGTCTTTAT
GGCTCTGAAGAAAACGTTCCGATACACCTGCAGCTACACTCCACCGTAGT**G****AAGTCCAGTCACTTGTTCAGCG**

5.6. Detekce publikovaných mutací genu FGF5 zodpovědných za dlouhou srst

Pomocí programu BioEdit 7.0.5.2. (Hall, 1999) byly porovnány oblasti ampikonů A, B a C, ve kterých se nacházejí kauzální mutace pro délku srsti (M1-4) detekované Kehler et al. (2007). Výsledky porovnání jsou prezentovány na Obrázku 35. Mutační místa jsou vyznačena červeným rámečkem. Z Obrázku je patrné, že v hodnoceném vzorku sedmi plemen s délkou srsti korelovala pouze poslední mutace M4.



Obrázek 35: Porovnání mutačních míst (M1-4) pomocí programu Bioedit

6. Diskuze

6.1. Výběr modelových plemen

Kehler et al. (2007) použili pro svou studii vzorky získané od příslušníků 24 čistokrevných plemen, konkrétně habešské, americké krátkosrsté, britské krátkosrsté, burmily, kartouzské, cornish rex, devon rex, egyptská mau, havanské, ocicat, ruské modré, siamské, turecké angory, balinéské, himalájské, birmy, mainské mývalí, norské lesní, perské, ragdoll, sibiřské, somálské, skotské klapouché, manx a turecké van. Drogemüller et al. (2007) použili somálské, perské, mainské mývalí, ragdoll, norské lesní, habešské, siamské, britské krátkosrsté a dlouhosrsté i krátkosrsté neušlechtilé kočky.

Subjekty pro tuto práci byly vybrány tak, aby byly zastoupeny kočky plemen dlouhosrstých (mainská mývalí, perská, britská dlouhosrstá), krátkosrstých bez sesterského dlouhosrstého plemene (devon rex), krátkosrstých s dlouhosrstým sesterským plemenem (exotická, britská dlouhosrstá) a bezsrstých (kanadský sphynx).

6.2. Izolace DNA

Pro účely této práce byla DNA z buklálních stěrů izolována pomocí kitu NucleoSpin® Tissue od výrobce Machery-Nagel určeným pro izolaci genomické DNA. Aberdein et al. (2016) pro tento účel používali Roche High-pure FFPE Kit (výrobce Roche Diagnostics). Gandolfi et al. (2013) používali DNAeasy Kit (výrobce Qiagen).

Dle výsledků této práce a srovnání komerčních kitů (Tomaso et al. 2010) jsou všechny jmenované kity velmi vhodné pro izolaci vysoce čisté genomické DNA kočky domácí.

6.3. Detekce kauzální mutace genu *FGF5*

Tato bakalářská práce vycházela především z výsledků studií Kehler et al. (2007) a Drögemüller et al. (2007), které se zaměřovaly na problematiku genu *FGF5* u koček. Kandidátní mutace *FGF5* M1 (inzerce c.356insT), M2 (substituce c.406C>T), M3 (delece c.474delT), M4 (substituce c.475A>C) byly zvoleny na základě práce Kehler et al. (2007). Tito autoři detekovali mutace na základě restrikčního štěpení PCR produktů.

Vzhledem k tomu, že tato práce byla řešena v letech 2018 -2019, byla pro detekci mutací genu použita spolehlivá a jednoznačná metoda sekvenace získaných ampliconů. Pro aplikaci této metody bylo využito aktuálních poznatků o celogenomickém sekvenování kočky domácí (Warren & Murphy 2017). Sekvence publikované v databázi Ensembl tak umožnila navržení originálních specifických primerů ohraničující kauzální mutace navržené Kehler et al. Tito autoři svou detekční techniku vyvinuli v roce 2007, kdy pouze odhadovali, jak by mohla

vypadat exon-intronová struktura genu *FGF5* na základě srovnání s druhy se známou kompletní sekvencí.

Bioinformatická analýza, která byla provedena na začátku experimentální práce, potvrdila, že Kehler et al. správně odhadli pozice SNP včetně typů kauzálních mutací M1-M4. Tento výsledek potvrdil hypotézu o vlivu mutací na délku srsti, a současně umožnil navržení specifických primerů, které odpovídaly genomu kočky domácí.

Z chovatelské praxe vyplývá, že se dlouhosrstost dědí mendelisticky jako recesivní znak, jak tvrdí také chovatelské publikace Šiler et al. (2012), Říhová (2007) a Verhoef-Verhallen (2004). Výsledky této práce tento předpoklad potvrzují, ačkoliv se jedná o více než jednu verzi recesivní alely (v chovatelské praxi nemá smysl tyto alely rozlišovat).

7. Závěr

Literární rešerše byla zaměřena na problematiku délky srsti u kočky domácí (*Felis catus*), zejména jejího genetického podmínění genem *FGF5*. Pojednává o plemenech koček s dlouhosrstými variantami a jejich historii, dále o struktuře srsti a jejich anomáliích. Shrnuje dosavadní poznatky o genu *FGF5* a jeho mutacích u koček a dalších savců, u nichž byl pozorován.

Pro experimentální část bylo vybráno 13 příslušníků 7 vybraných plemen koček – britská krátkosrstá kočka, britská dlouhosrstá kočka, devon rex, mainská mývalí kočka, perská, exotická a kanadský sphynx. 6 testovaných subjektů byly příslušníky dlouhosrstých plemen, 4 krátkosrstých plemen s dlouhosrstými variantami a 3 čistě krátkosrstých plemen či bezsrstých kontrastních plemen.

Výsledky sjednocující poznatky z experimentální části práce a literární rešerše jsou shrnuty v následujících bodech, které současně odpovídají na vyslovené vědecké hypotézy:

DNA izolovaná z bukálních stěrů vykazovala výborné parametry pro následující PCR analýzy. Byla tak potvrzena hypotéza, že vhodný výchozí biologický materiál je nezbytným předpokladem pro další genetické analýzy

- Příčinnou vzniku dlouhosrstého fenotypu je jedna ze čtyř bodových mutací: M1 (*FGF5* c.356insT), M2 (*FGF5* c.406C>T), M3 (*FGF5* c.474delT) a M4 (*FGF5* c.475A>C).
- U všech dlouhosrstých jedinců byla zjištěna homozygotní sestava alely *FGF5*:c.A>C475, která byla v dřívějších studiích popsána jako nejběžnější z výše jmenovaných a vyskytující se napříč plemeny. Závěr této práce se s touto hypotézou shoduje. Krátkosrstí jedinci měli homozygotní sestavu pro divoké alely.
- Primery byly vhodně navrženy pro amplifikaci vybraných oblastí genu *FGF5*.
- Sekvence ampliconů s využitím popsaného metodického postupu se ukázala jako vhodný nástroj pro jednoznačnou detekci kauzálních mutací genu *FGF5*.

V chovu krátkosrstých plemen se objevují dlouhosrstá koťata. Tato koťata jsou obvykle nežádoucí, příležitostně však dávají vzniku dlouhosrstým plemenným variantám. Genetické testování je výhodné zejména pro chovatele krátkosrstých plemen, ke kterým byly přikříženy dlouhosrsté kočky (nejčastěji perské) za účelem vymýcení recesivních alel z chovu a omezení výskytu nestandardních jedinců. K dubnu 2019 je detekce mutací genu *FGF5* na českém trhu komerčně nabízeno dvěma laboratořemi.

8. Literatura

Aberdein D, Munday JS, Gandolfi B, Dittmer KE, Malik R, Garrick DJ, Lyons LA. 2016. A FAS-ligand variant associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome in cats. *Mammalian Genome*. 28(1):47-55.

Allerstorfer S, Sonvilla G, Fischer H, Spiegl-Kreinecker S, Gauglhofer C, Setinek U, Czech T, Marosi C, Buchroithner J, Pichler J, Silye R, Mohr T, Holzmann K, Grasl-Kraupp B, Marian B, Grusch M, Fischer J, Micksche M, Berger W. 2008. FGF5 as an oncogenic factor in human glioblastoma multiforme: autocrine and paracrine activities. *Oncogenetics*. 27(30):4180-4190

Bruce JN. 2011. Medscape: Glioblastoma Multiforme. Medscape, New York. Available from <https://emedicine.medscape.com/article/283252-overview> (accessed March 2019)

Cadiou E, Neff MW, Quignon P, Walsh K, Chase K, Parker HG, Vonholdt BM, Rhue A, Boyko A, Byers A, Wong A, Mosher DS, Elkahoulou AG, Spady TC, André C, Lark KG, Cargill M, Bustamante CD, Wayne RK, Ostrander EA. 2009. Coat Variation in the Domestic Dog Is Governed by Variants in Three Genes. *Science*. 326: 150–153.

Clutton-Brock J. 1999. A natural history of domesticated mammals. Cambridge: Cambridge University Press.

Driscoll CA, Menotti-Raymond M, Roca A, Hupe K, Johnson W, Geffen E, Harley E, Delibes M, Pontier D, Kitchener A, Yamaguchi N, O'Brien SJ, Macdonald D. 2007. The Near Eastern Origin of Cat Domestication. *Science* 317: 519-523.

Drögemüller C, Rüfenacht S, Wichert B, Leeb T. 2007. Mutations within the *FGF5* gene are associated with hair length in cats. *Animal genetics*. 38(3): 218-221.

FIFé. 2019. Fédération Internationale Féline: Breed standards. FIFé. Available from http://fifeweb.org/wp/breeds/breeds_prf_stn.php (accessed February 2019).

Gandolfi B, Alhaddad H, Affolter VK, Brockman J, Haggstrom J, Joslin SE, Koehne AL, Mullikin JC, Outerbridge CA, Warren WC, Lyons LA. 2013. To the Root of the Curl: A Signature of a Recent Selective Sweep Identifies a Mutation That Defines the Cornish Rex Cat Breed. *PLoS One*. Jun 27;8(6):e67105.

Gandolfi B, Alhaddad H, Joslin SE, Khan R, Filler S, Brem G, Lyons LA. 2013. A splice variant in KRT71 is associated with curly coat phenotype of Selkirk Rex cats. *Scientific reports*. 3: 2000.

Gandolfi B, Outerbridge CA, Beresford LG, Myers JA, Pimentel M, Alhaddad H, Grahn JC, Grahn RA, Lyons LA. 2010. The naked truth: Sphynx and Devon Rex cat breed mutations in KRT71. *Mammalian Genome* 21: 9-10

- Heather JM, Chain Ba. 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, **107**(1):1–8.
- Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. 1994. *FGF5* as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *CellPress*. **78**(6): 1017-1025.
- Hendriks W, Tarttelin M, Moughan, P. 1998. The amino acid composition of cat (*Felis catus*) hair. *Animal Science*. **67**(1): 165-170.
- Higgins CA, Petukhova L, Harel S, Ho YY, Drill E, Shapiro L, Wajid M, Christiano AM. 2014. *FGF5* is a crucial regulator of hair length in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111**(29): 10648–10653.
- Huang Q, Fu W. 2011. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **43**(8): 841-842.
- Huang Y, Wang H, Yang Y. 2018. Expression of Fibroblast Growth Factor 5 (*FGF5*) and Its Influence on Survival of Breast Cancer Patients. *Medical Science*. **24**:3524-3530
- Karger BL, Guttman A. 2009. National Center for Biotechnology Information. DNA sequencing by Capillary Electrophoresis. NCBI, Bethesda. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2782523/> (accessed March 2019).
- Kašička V. 1997. Teoretické základy kapilárních a elektromigračních metod. *Chemické listy*. **91**(5): 320-329.
- Kehler JS, David VA, Schäffer AA, Bajema K, Eizirik E, Ryugo DK, Hannah SS, O'Brien SJ, 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*. **98**(6): 555-566.
- Knospe C. 2002. Periods and Stages of the Prenatal Development of the Domestic Cat. *Anatomia Histologia Embryologia*. **31**(1): 37-51.
- Krausová K. 2018. Molekulární markery mutací genu *FGF5* zodpovědných za dlouhou srst u plemene československý vlčák a možnosti jejich aplikace v plemenitbě [MS Thesis]. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Kučerová MR, Bienová MM. 2012. Úvod do klinické trichologie. *Pediatric pro praxi*, **6**(3): 118-122.
- Le H, Fung D, Trent RJ. 1997. Applications of capillary electrophoresis in DNA mutation analysis of genetic disorders. *Molecular pathology*. **50**(5): 261–265.

- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : Journal of Visualized Experiments*, **62**: 3923.
- Legrand R, Tiret L, Abitbol M. 2014. Two recessive mutations in *FGF5* are associated with the long-hair phenotype in donkeys. *Genetics Selection Evolution*. **46**(1):65.
- Lorenz TC. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. **63**:3998.
- McElwee K, Hoffmann R. 2000. Growth factors in early hair follicle morphogenesis. *European Journal of Dermatology*. **10**: 341-350.
- Millar SE. 2002. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *Journal of Investigative Dermatology*. **118**(2): 216-225.
- Mulsant P, de Rochambeau H, Thébault RG. 2010. A note on the linkage between the angora and *FGF5* genes in rabbits. *World Rabbit Science*. **12**: 1-6.
- Murphy WJ, Sun S, Chen _9Z, Naoya Y, Hirschmann D, Menotti-Raymond M, O'Brien SJ. 2000. A Radiation Hybrid Map of the Cat Genome: Implications for Comparative Mapping, *Genome Research*. **10**: 691-702
- O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Nash WG, Wienberg J, Stanyon R, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, Marshall Graves JA. 1999. The promise of comparative genomics in mammals. *Science*. **286**: 458-481.
- Ota Y, Saitoh Y, Suzuki S, Ozawa K, Kawano M, Imamura T. 2002. Fibroblast growth factor 5 inhibits hair growth by blocking dermal papilla cell activation. *Biochemical and biophysical research communications*. **290**(1): 169-176.
- Rédei GP. 2008. *Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics, and informatics*. Springer, Berlin.
- Robbins CR. 2012. *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*. Springer, New York.
- Ryder ML. 1975. *Seasonal changes in the coat of the cat*. Elsevier, Amsterdam.
- Říhová M. 2007. *Chov koček*. Grada, Praha,
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **74**(12): 5463–5467.
- 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*. **114**(3): 456-463.

- Šiler R, Fiedler J, Suchánek P. 2012. Genetika drobných zvířat. Tigris, Zlín.
- Šlapalová T. 2010. Forezní molekulárně genetická analýza živočichů [BS Thesis]. Univerzita Karlova, Praha.
- Tomaso H, Kattar M, Eickhoff M, Wernery U, Al Dahouk S, Straube E, Neubauer H, Scholz HC. 2010. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of Brucellae in tissue using quantitative real-time PCR. BMC Infectious Diseases. **10**:100.
- Verhoef-Verhallen E. 2004. Velká encyklopedie koček. Rebo Productions, Čestlice.
- Voytas D. 2001. Agarose gel electrophoresis. Current Protocols in Immunology. **10**: 10.4.1-10.4.8
- Wang X, Cai B, Zhou J, Zhu H, Niu Y, Ma B, Yu H, Lei A, Yan H, Shen Q, Shi L, Zhao X, Hua J, Huang X, Qu L, Chen Y. 2016. Disruption of *FGF5* in Cashmere Goats Using CRISPR/Cas9 Results in More Secondary Hair Follicles and Longer Fibers. PLoS One. **11**(10): e0164640.
- Warren W, Murphy B. 2017. National Center for Biotechnology Information: Felis_catus_9.0. NCBI, Bethesda. Available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000181335.3#/st, accessed March 2019.
- Zhigachev AI, Vladimirova MV, Katser I. 2000. Phenotypic and genotypic characteristics of russian hairless cats. Genetika **36**: 538-544.

Samostatné přílohy

Příloha 1: Kompletní sekvence genu *FGF5* (Warren & Murphy 2017)

>chromosome:Felis_catus_9.0:B1:142162953:142187063:-1

GTGAGAGAGGACAACACTGGACAGTCAGCCACAAGTGCTGGTGGCCAGACCTGCCCTCTTGCCCTGCTGTGAGC
GCGGGTGTGCATGTGCGTTCACCCTCTCGGACACAGACCGAAAACCTCCCATACGGAAAAACAAATTCGGCAT
CATGTTTAGCGTGACCCAGAGTTTCCAATAGAAAAGCAACTCGAATTGTGGCCTAATGGCTCAGGGCGGCTCT
CTAAGTACCAAATAAGCCCGTTAAATACATTAGAGGCAACAACAGCCTTCTCCTCCAGCCGCGCCACACCAAAG
GCTTCCCAAGTTGGACTGCGAATCTTGGTTTGGTTCCCCACCGCAAGCACTCCGAAGCGCTGGGATTCTCACGG
CCGGACTTTGTTCCGGAGGGATTCCCGGGGCCAGGATTGTGCTAGCGGGGTCTGCGGGGCAACTGGAAGGG
AACCTGGAATCGGGTCTTGGGTAGGCGAGAGTGCCTCCGGGGACGCAGGCATGCAGCAGAGGTGGGAGA
GTCCAGGAACTCACTTCCACGTTTAAACCACCTCCCCCCCCATTTGCGCTGCTGCCCCCTGGAAGACTCCCAT
GCTCGCGCGGAGGTGAATTCCGCGCCGTTGGCTCCGGTGGGAGGGTGGCGGTGCGGCGGTGAGAAGTCTGCT
GGGGTGCCTGGCCCCGGTCTGCGCGTGCACAGCGTCCGGGTACAGCTCCTCTCCGCCCCGCTTCTCCTCCAC
TCACTCGCTCCCATCTCCTCCTCCTCCACACCCCCCGCCCCGGGACCAGCAAGCTCCTCCTCCCGCACCGGCCA
GAGAGTACACAAAGCGGCGGGTGGAGGGAAAGCTTCGCAGGCGTGACCAAGCAGTGAGATCACTGGCGTTA
TAAATATCCAGTTCTGCGCCGAGATCCATTGAGTGGCCTCTCTCTCTCCTCCTCCTCTCTCCCCGAGGCTA
TGTCACCCCGGTGCGGCGAGGGGGGCGAGCGCCAGAGGCACGCAGCCGCGGGGGGCTACGGAGCCAGAA
CCAA**CCCTACAAGATGCACTTAGAAC**CCCGCGGCTGGAAGAATGAGCTTGTCTTCTCCTCCTCCTCCTCCT
AGCCACCTAATCCTCAGCGCTGGGCTCACGGGGAGAAGCACCTCGCCCCAAAGGGCAACCCGGACCCGCA
GCCACCGGTGGAACCCGGCGGGGCGCCAGCAGCAGTAGGAGCAGCAG**G**GGCAGCAGCTTCTCCTCCTCCTCC
TCCG**T**CTCCTCCTCC**A**CTCGGCTTCTCTGGGCAACCAAGGAAGCGGCTTGGAGCAGAGCAGTTTCCAGTGGA
GCCCTCGGGGCGCCGGACCCGGCAGCCTCTACTGCAGAGTGGGCATCGGTTTCCATCTGCAGATCTACCCGGA
TGGCAAAGTCAATGGCTCCATGAAGCCAATA**T**GTAAAGTAAGTTGCTCGCCTCCTGGCAAAGCGCGTCTA
AGCGGGCGATGGGGGATTGCGGAGGGACAGAGGCTATTCCCTGGCCAGAGGCGCACCTTCCGGAGCCCT
GGCTCCTGGGACTCAGCTGTCCCTCGGAACCGCGGGGCG**GTTGGGTGAAGGTGCATCTACA**TGGCGGCAC
ACGCGCACCCCTCTTGTGGGTATGAGGAATGGCGATTCTGAGGTGTAGGCTACCAGAGGCTGGCGACAAG
ACAGGTACCTTGTTCAGTTTGGCCGGTCCCAAAGAGAAGCCTCCAGCCGGTGCCTGGAGAAGAAGACAAA
AATCTTTTGTCCCTTAGTTTCTGTTACCTTCTGCTTCTGTTCACTAGGCTAACATTTTTTATGAGGCATCAAAG
TGCATCCCTTTCTTGCCTATAACTGAACAGTTATTTTTCAAAGAAGAATCAGATCTCACATGCCGGTCCCC
CAACTGCCACCATAAACCCCAAAGTAAGGTACATGATACATCCATGTATCCGTCTATGTCTCTTGTATATGCATA
TTTGTACATTATATACATATAGAATATAGGAGAGATCAGACATCCCCTGGTTGGAAGAAGACAGCGATCTGGA
AACTGGACACGTTTAGAGTGGGATACGTGATAGACATTGCAATTATTAATTCCAGAGTTGGGTTTAGCAACG
TTAAGTATGTTGAGACCATGACAACACCTTGTAGGAAGCGGCCAGCCTTGGTCCCCAAGGACGATTAAGG
AAAAGTCTTTATTTTGAAGAAGGTCAGAGGTGGTTCAATTCCGTACAGGTGTACATCGTGTAAAGCTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTAAAGCTAAGTTTACATTCTTTCTGAGTTTTCTTTAGCTGTCTTTCCCCCTCTCCTATTG
CCTCTTTCCTTCCACGCCATCTGTGTTTCCAGACCTTCGCTGGCTGCCCGCCTCTGATTCTCTCACCGCCTCTA
GGTAGCCAAGGGGAGAGATGATTTGGGGGTGTGTGCGAGACCGGGGGCGATCTTTGAGGCTTTTCTCGGT
AGGGCCAGATCGCTCATCCAGCAGGGGTTAATCCAACAGATAGACACAGCAGGGGCCTGCGAGATAATCAGG
AAGAGCGGGAACGGGGCCAGGAGATCGCGCTGCGTACGGTACCTGGCTCCGTGTGGCCGCTGGTAGCTCC
CAGGTGACTTAGCTTGTCTTCTTCAAACCCACAGCCCTACGGGCCATTCAAGTGGGCTTTTACTACCCGAGCT
GCAGAGGAGCGCGGGAGCCCCAGCAGGGCAGGCAATCTGGGAGCCGCTTGCCAAGCAGGGCTGGGGGTGT
CGCGTCCATGGGGTACCCCGCTGGCAAGCCTCCTCCGGAGGGGACCGGAGGGGATGTGGAAGACCTGCC

GGTTCGCGCCCGCCCTGCCACACCCGCTTTTTGAGCTATGCTGCTCCAGCTGGCGGTGTTACACGTGGTAG
GTGTTACACGTGGTAGCCCCCTGAACCAGAGAGGGGGCTCTCCAAGTGTGCCAGCGTCCCGGGCCTC
CCACACGCCCCGTGGAGGAGGCTGTTTCTACGTTTCAAGGTTCAATTTCACTTTTATGAAACAACCTCAACCGTCTT
TGGAGATAAAGGGCAAGGTCTGTTAGGGTGAAGGGGAATTTTCCAAGATTTTCAGGGGCAGGGAGAGTCACG
TTAATTTCAAGTATTTCCCTTTGTCTCTCTCATTTCACACCCAACTCTTGAGTCCATCAGACACCAGAGCTCAT
TCCCCGCTTCTAGTAATCTTTCCACCTCTCTTTTTCAGGGAACCTTTTCTGTTCTGCTCTTGAGTTTACCCAGGA
AATTAGCATCAGCAGTAGATAACTTCTGTGTTCCCAAGGGAAGACACAAAGTTAGCATGCACCAAGCTGCAAG
TTGGGACTCAGGGGAATAAAAAGAATGTGTCTTTGGTGGGTTTTGGTGTAGTAGGGATCTCTGAAAACCAGGTT
CATTCCCAAGATATTTCTCTCTCTTGGAAAAGACAAAGATTCTGCACCTTAGGCCTTGCCAGAGGGGAAGT
TCTAGAAAAGTAGAGAAAAGGAAATTGAGAACAACCCAGCAAAGAATACATTCAGCTAAAGAAGGCATTGACC
AATATCTTTTCTTTCCAAGGTACAATTTATTTTAAAATCCACTTTGAAAGATACTTAAAAAGAACAGGGATGTTT
ACAAAACAGTGCCTAAATAAACTTCTTAATTTAATACTTTTCTAATTCATTCCAGGTTAAAATAGGCTTTCA
GGGTTTAGTCTGTATCTTTCATATGGTTTGCCATCATTCTTCACTCATTCTTCATTCAATTCATGCACCTATAA
TAGGCTACTTAATTCATCAAGCTTGATATTTGATTGCTTTTGGGAGTTGGAGGATTTTTTAAATTTGTTTTGC
CTCCATAGCTGTTTCATGCAGAGAAAACCATAACTTAAGTGTAAATCACAACGATTTTCTGCTTTGTGATGT
CTGGAGTGTCCAACATTACTAATACTATGATTTTTCTACCACTGGTGGATGAGGAATTTATGAAATATGTCATGTG
TAGTGGGGGAGCATGTAATTTGGAAATTTCAAATGAGTCTCTGCCCTCAATATCTGTGAAAGAGAATCAGAAG
CCTGCTAATTGTTGGCTGGTCATCTACTTCTTTGAAAGCAGCACTTGACAGTTTCTGACACATACATAAACTAA
AGCATTGGTCATGGACTGTTGGTTAGAGTACACAAGGAAACAATTGTGTAAGCCTCGCAAGAGACTGAGA
GCTGGACCAAAAAGGACCATAGAGGTACCTCATCTCATTTTACTGTCTGTGAGTTGGCAATGATAGAGAA
CTTACAGTTTTTTTTTTCTTTCTTTTTTGGTACAGCATGCTACTTCAGAAAGAGTCAAACCTTTGCCACCAA
ACTGCAGTCTAAATGGTTCTTTTAACTCAGTAATTTTCTGTAATGTTTGTGAGGACAGATACATATATCTGTAC
ATATACATATGTTTTACAACATATCATTGATGTTAAAATTTGGCAAACCTGTGAATGTTTTCTAGTTTCACCATCA
GAAGTACACTCAGGCCATAAAGTTTGAACACAGTTTATTTGGTTAAGGCATACCACTTAATATGCCTTACCTT
CTCTTATACAGTAGTTAGCCCAAGTTTTGGACACAGAAAAAATAATCAAGCTCATAACATTCTTATTATGAAG
AAATACTAGGGAAGAATGAAGAAAGATGGACAAGACAGATGATAAAATCCAATTATTGAATAGAAACAAAGG
GTTTGCTTTAATTCATGAACTTTCAAGTTTAGTTTCAATGCTTCTGTTGACTTATGGTGGGCCATTGAAGAATAG
GCAGTCAAGTAATTCTCAATTCAGGGAGCAAAGTTGAAGTTATGGCTGCACAAAGCTTAAGTTCACACAAA
ATAGGAAAATTACAATCATATATTCTGACTAACTGAATCCTCAATTTTACTAATTTTAAACATTGAAGTTCCT
ATCAATTTTAGTGCCTATAGAATCAACCTTTCTATAGTCCCCAGAATCTGTATCTACTGAATAGAAAACTCA
AATGGAAATTTTCTATTGCTGATTTAATCATCAAGGTCTGCTACACTGGGCATTTTAAAGACTCAGATTTGATAAT
GATACCCAGACATCTGTGTCTATGTGAACACAAGTAGAGAACTTCCATTTTAAATGATTTTTCTTTGAGGATTT
TCAAATGGGCTTCTGAACATGGGATATCTATGTCATTCTAGTATGTTATTTACTAAGAAATGGGAAAAGTGAGA
AATCTGCATAATTTTATCAACCACCTAATAGAGTCTGTTGATTAATAAACTCTGGAGGGGACTAAGGTA
CATGTAGACATATATTTTCTTCTTGAATAAACTTACTTGGTAATATATGCCATGCTTGAAGTAAGTGGATTA
AACAATGTGTGCATAAATCTTGTCTCCTTCTATCTAGATGTCAACCCCCAAATTACACCAAGAGAAAAATGGTT
CCTTCTGTTTCAAGTCTGTTTTTTCTTTGATCCTTCTTACATGTGAACTCCCTAGGAAAGATAACACATTGTCTCT
AGCACCTTAATGTGAAATAATTATACTGATCCTCTCTCTTGGCCACTTCTTAAGTAAGAGAGGACCAGAATT
GCAGGAAAGTAAAACCTGTGTCCGTACGAATGCTCATATGTGTCTGTATGTATGTGCAGGCGTCTGAGAAAG
GAAAGAGAGGTAGTGACAAGGTCAAAGAAAACAATGCAATTTGGCAAACATGTATTGGCTATCTATGGTCTGT
GAGATACTTAGCCTTCCAGAATTTTGTCTTAGGGATACCATCCTGGTATCCGTAATGTGAATTGAAATCCG
ATAAAATTTATTGTTATTGAATCCTAGTAAAAGTCAGGAAATTAAGTAAATGGAGAAAAATTTAGTTTTAGAGA
AATGTTTTCTGGGATTTCTATATGTGTGATTTAATGCATATGGGTTTTAAATATTTAGGACTCTTTAGTGAGTTA
CTGAGATTTGGCATAGTAAAATCAATAATTGTGTGATCTCTTGGAGGTGGGGTCAGGAAGCTGAATTGTAGGG
CTGTAGAATCTGCTCCAACATTCTAGTAAAAAAGACATTGTGAAATTAAGTGTGAAATTAAGTGTGAAATTAAG

ATCTTAATAGCATTCCCAATATTACATCATAATTATGTTAACATTTAGAAGATCATCCCAAAGTTCCTTATGTGT
TATTTTATCTGATCTCATCTTTTATCTTTCTTGCACTCTTTATAATTTTAAATAGAATAATATATGTGAAGGTATAT
TTTTAAGCTTTCAATTGAATATAACTTTAAAAAATTATAAAAAATCCATTCATTCTCAGACAAATATCATCTTTAT
AGTAGAAGCTTGCAAGGAAAGAAACCATGCAGTATATAATAAAATAAGAACATTTTACATATATTATCTTATCTC
TCCCATCTAATTTATCACAAATGGAAAGTTTACACAACATATACACACAGAATGTACAGTGTGTTAGGAAACAAG
TTAAATGACTCAAATAGGTTTTCTAAAAATAGAATATGTTATGGTCAGAAGTTGTAGCTCACATAGACAAAGC
ATTAATGCTCCCATTAACAAGTATTTCTAGAGCCTTTGTCTTGATCTTTAAAAATTAACCTATAAACATATGTA
TCCAATAAGAATTTTGTCTTTTATGCTATGGTGTATTTTTCTACTAACACGCAGGTTTGCATTTACAAAGTCAAAT
GCTTTTCTGTAGAATGGAATAAAAACGCTCTAACAAATGTAGAACCATGAGTAAATTGGGGGAAAACATACAAC
CGACTCTCCTTTCCACCAATCCCGTATTGTCTCTTTTGTCTATTGTTCCACACTTAGACAACTTATCAGTTTC
CATTCTTGCTTTTAAACACATGTTTACACAGCATTACAATCATAACCCCATCTTCAAATATCTAAAATCATCAA
TGCTGTTTTCAATATCATTCTGTAATTGTATATACATAACTTTGTATCATGTTCTATTTATGCTTTATTAATTATAT
TATTACAGTATATTGCATTGTACATTGTATCTAACTTTACAAAGCATTATGTGTGCTTTGCTACTATTTGATAAAA
TGGCAATGCTTCAAATCTTTGGGTGCGCATCAAAATAATTTATATGGCAACATCTATTGAAAAGAGCATTTT
GAAAACATTTTGAAGAAAATAATTTATGAGATGACAGTTTCTTTGGAATTTCTTCTAAAAGCAAACCTTGTTT
CTTCTAATAGTTTTGTTTTGTTTTAAGAAACATCTACTAATAAAAGTGGTAGTGGCAGTTTTCTTGAGATGT
GCTTTATTTACTCTGGACTAACTACTCTTCTAACAGAAACAATAGTTCTTTTGTACCCTTTTCCCCATGAACCTT
CTAATCAAGTGCTTGTAAGAAGTCAAGTTGAATAAATAAATAAGCAGCAGTATTTGCTATATTTATAAGCTCAC
ATTGTGCAAAAAAGTACCCAATGAATATATTATATATATGATTTATGTATCTTATATATATGTTATTCTCAAT
ACTACCTTTTAATAAATGAAATAATTTTATATGTACTTCCAATACTGCAGGGGAGGTTGCTATTTTAAGAAAAT
CTGGTGAATTTATCTGTTTACAGAGAATACTGTTAAGATATCCTAATTAGTATATATGTTTCAAGATAAATAGATT
GAAAGATTGAGATTTTCTCCCTTCTCCTTTCCAGCCTTTTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTAGGACAGGTCTCTTTT
TAGCTATAGTGAATATATTTTGTCCCCCCCCCAATTTTTGCAATTTGATGTAGGCAATTAACAAAAAG
CACTACCATTTTCTCATGTTTCGTATAACATTATGTATGAGTTTACGACAAACAGGCAGGAATTCAGTTATATAC
AGACTATAAATTTTCTCTTCTAAAATACTCTATAAACTGTGGTATGTGATTCTTGTACACAGTGGATGTGGACT
TTCTTTTTAAAAAATTTTTTTTAAACGTTTATTTATTTTTTTGAGACAGAGAGAGACAGGGCATGAATGGGGG
AGGGTCAGAGCAAGAGGGAGACACAGAATCCAAAACAGGCTCCAGCTCCAAGCTGTTGGCACAGAGCCTGAC
GCAGGGCTCGAACTCACGGACCGCGAGATCATGACCTGAGCCGGAGTCGGACGCTCAACCGACTGAGCCACC
CAGGCGCCCCTGGACTTTCAAATTATTATAGGAGACAGAGGGATGTTGACTTGATAATGCTAACTATGAAATA
CTAAATATAACAATAATGTAATAAAATACCTTATTAATTTTTTTGCCAGAAAAGCCATTTTAAATACAAGATGT
CTCAAACCATAATGCATTAACACTCATTGAGCCAATAATCCCAAATTTTATAATGCTTTCAACAACCTTTTTAT
GTGTAGTCTTTAAAGGAACACTCACTGAATGATTGAATATGGTATATATTGATTTGACTTGTATAGTTATTAC
AATTTGAGAAGAGAGATTTAGTTTATGTAAGTAAGTATTATTTGTCTCTGGCTTTCAAGTTTCTATTAGTATTGG
GTCCAAACTTTATGAGCTTCAATATTAAGCATTATATTATCTTTGATAGAAAACAATGGATGGGAATTTCTTT
GAAAAACATTTAAAGAAATTTCCGATTCCTTTACAACCTGAGAAGATTACTTCTATTGTTAAACATTGTTACTA
AAAATGACTTATTATTTGTAAGGGAAGAAAGAATTATTAATGAACCAGGACTAAATTTTTGAATATTAATTTT
GTTATTTTAAATGAACACTTGACTGCTAGGCTTTTCTTTTTAACATAATGAATGTTATGGAAAATAAGGATGTT
AAATACTGTTTTTTTTTTTTAAATCAAACCTATAAAGAATGAAAAGAATCTGTGTAGGAATTTAATTTCTTACAA
TGGTATATAGAGGAGTCTGTGTTTTATTTGGGATTTCTGTCATCCTAGGTATTTTGGAAAATATTTGCTGTGTCT
CAGGGGATTGTAGGAATAAGGAGTTTTCAGCAACAAATTTTTAGCGATGTCAAAAAAAGGAAAACCTCCAT
GCAAGTGTAAGTAGAACCTTTATGTTTGTCAAGGTGTTACGGAGATTTACATTTGTAGAATGGAATGAA
GTGATTTTCTACATTTGGTAGAGGGACAATTTGCTCAGAGGACTTAATGTGTGTGTGTGTGTGTTTTAATTA
TACATACATTTAACCAAGGTGATTGTACATGTTGTTGCAAGTAACCATTTTTTATTTTTATTTACTTGAAACGATA
ATACACAGTCCACAAAATTTTTAAGGATGAATGCATTTGAAAATAGCACTCTCAAATGATTGCCATTTTTCAT
TTATTGAAATTGGCCCAACTGAGGAGAAATATCATGGAAATAATATAGAACATTTAAAATGTACATGTTTATGG

TGGCTGTGTGCATTTTTAGTAGATTAGGTTCTTATTCAATTTTACAAGCTATTCATGATGTCAAAAATTAGGC
CAAAGTAATATAACCTATTTTCACATCAGTAATTATGGAGAGAAACCAATAAGGAGAAGATTTGGTTTCTTGG
AGAAATTTAATTTATTCATTTGAGGAACTCTCATTTTGTATTTTGTTCATTAATAGAATACTTCTCAAAATTA
TGAAGACTAATTTGTACTCAAAAATTTCTACAAGCCACATATATGTGTTGTAAGTACTGATTTACAAATTAAGATT
TCTATTTTTTTTTTCCAAAATGCTGATTACTTGGGAAGCATCAAACTTTTTAAAGATAACAAATATGTTTAAAC
TTAGTTTTTCTACTCACAGGTTTGGTTTACTGGTATTAGGTCCATATGCACAGCACTTAAAGGTGACTTAGGCTC
TTTCTGTAGCTTTGTCATATTAGGTCATTTGTACAAAGTAGTTATCATTTAGCGTTAGTCCCTCCACTTCTTATTTTC
TTAATTCCTACTGAATGAGTTGGAGAAATATCACCTTCTAGTGTGTTGAAGTATGTAGGAACTTTTAGCTAGGA
GTGTAATCAATTGAACTTACTATTTATGATTTTTTACCTATAGAACTTTAAAAAATTCAGTGAGAATTTCACTTG
GTTCAATCTGTAAGAATTTAGTTTTCTTTTTCTAGCATCTCAAGGTGATTTTTTAATACCTCTTGGAGGGGGG
TAGCAGAATTCAGCTATTTGTGTAGTTATTTGTGGATTAATGAGATAATACATTTAAAGCTTTTAAACAGT
ATTTGGTACACTGTAAGTGCTCAAGAAATACTATCTGTTATATGGTAAACTAAATATAATAGATTCTAAAACCTCA
GTTGGTTGAGATAAATGGAAAACCTTTGCTAATCTCTTAAATCACCCATTGCAAGAATTATAAAAAGGTTTACCT
ACTTCATTTTCTGAGGTGGTTATTGTATTCTAGCAAGCTCTACTATAGTTTTTCATCAAGTAATCACTCTTTGATTA
TTTATCTTAAGAGGCCAACTTCTGCATCACTGTGGAAAAGTAGGACATGCCATTTTATAAAAAAAAATTGATT
TTAAAAAATCCGCAGGCAGAATAGAAAACAATGACCAAACGCATCTGAACACAATCTTTTCCCCAGTCTACTT
TAAGATTATTA AAAAATTGAAACACTTTTGGAACTAAGCATCATAATAAAGTGTGGTGCATGTAAAGAACTT
TCTCTATTGCTTTGTTTTGGGTAAGCACCTAATTTTTTAATTGTTCTGACTTATGCCCTAGTACATGCAAAAA
TAGACCAAACCTGGGCCAGCTTCAGGGTAATTGCCACAGAACTCGAAGCATTACAAATGGATGCCAATTAGAA
AGGTCACACTGAGAGGTGAGGATACATGATTCCTCTGTCAAATGCAAGAAACAAATTTCCAGAAATTTGACCC
AAATGTCTAAGGCTGGCTGGCTGAAATAATGCAGATAATGCAAAAACAGCATCTGTTATTCTTTCTCATCTTGG
CAGGCTAAAGTTATTTTCATGGAATAATGACTTTTTAAACAGTACAAAGCAAGTCTTGCTCTTGTCACTCACTGAA
GCTCTTTGATATTAAGTCGTTCTAATGACTTTGAGCTGAATTGTAGATAAAAAAATTAAGCCCTATGATTATGT
GGATTCTTCTTAAACCTATTGTCCAAGCCCGCTTCCCTTATCTGAGCTTTTATTAGCACTTTTTCTCTAGATGGA
AACCTAATTA AATTATAACGTGATTTATTTTTAAGGAAGTTGAATTTGGAAATAGTATTAATCCTAGCAATTATC
AGTTTTATGCCAGATGGTTTCTTCTGTTTTCTTAGTTAAACACGTTGAAAAATTATTCTTGTAACTTTAGAT
ATAATCATTTGATTTAGTCTTGATTTTACAAAATTGCATGGTCACTAAAAACGCTAAAAACCTTTATTTTTTTA
GGATTA AATGTATAATTTGTGAGTTGCTTTAAATTAGTAACTGTGCAGAGGCATTTAAAGCCTACCTTTATAATC
ATTTTTCTATATATATGTGTATATTTACATCATATTGTACATCTTAACTTACACAACGTTACATGTCAATTATACC
TCAATAAAACTGGAAAAAATTTAAGTTAATAGAGTACTTTAAGGTTTTATATATAAAAATAAATATGAACCAA
AAATATGAAGCATTATATAATTCTGGGGGAAGTAATTTCCATACTGTATTAAGAAATATTCATGGATAATTGT
AGATTCTCAGCTTAGTTTTATAGTAACAATTAGAATATTA AAAAATTAGTTGCTGGGCACAGACAACGCATTTG
CATAGTTCTTTAAAAGTTCTTTCACTCACATTATCTCATTACATGATTAGGTGAGGAAAGAGTCTTAGAGATGTT
AAATAATTTGTTAAGTTAACACAGTTAACAAAGTATTGAACCAGAACCATCCTTTTAAACATCCTGTTTTCTCTGC
AAATGCTACAATGCTTTGTAGGTA AAAATTTAGTTGAGAGAAGATACTAAATTTTTGTTTGGAAACCAATTACATGG
TTTTCACCTATTATTTTATAGGAATTAACAATCGCACAGCTTAGTAATATTTTTATACTACATGTCAAAGAATAAA
TATTGTGGCACATCCTTACAATATTTTGCTCGTGCCTCGCCTCCCATCTTACGCAAGCTCTGTTCCGGACTCTTTT
TTCCCATCTATTTCTGTGTCTTTAGTTTCTGTGTCTGCCGCAGAACCTATCACAGAGTTTTGCACACATTGGTGG
TTCAATGTGATGATGCGCCACATAGGAAACGCCTCTCAAATGAACTTTCAAAGCAGAAGAGAGCTATATTTTG
CTCACTGAAAAATTTCAATTA AAAATGCTTCATTATCAGTAGACGCAAAAATGGCAAACCAAAGCATGAGCCC
AGAATGGGTACACTTAGGCAATACTGGTACTGATTTTTTTCGCGTGTGCTAAGTTCGTTAATTCAGTGTGCATG
GCTTCTGACTCATTCAACCTACACATGTCGAATCTATATGCAGCTCTCCTTAAAATCTTTACTAGTATACTTCA
AATACACAGTGCAGCCAGATTCCTACCATGCAGGTTTTTTCGGCATTCTTTACAAGGGTGAAGATGTATGGTCT
TCTCCTTCTTCAAGATGTGTTGGGAATCTTCGAGAGTGGGAGTAGGCGACTGCTTCCCAAAGAGCCATGAGGG
TGAGTCAGAGCCTTCACTGAGACCTCACTGTCTTTTTGAACTCATTCCAGGCTGAGGTACCTTGTGGAAAAGA

GCACCCTTCTTTCTGTCTGTGTCTCTGACTGCTCGTCTGTTCCCTCCTCACTCTGTTCTGCTCTCTCC
TCAGGTTTGTATCTCTATGGAATCCCATAGAGCACCTTTCTGGATTATATGAGGTGGTGCAGATGTAGG
AGTGAGAGACCTCAAGTGTGGTGGTTACAAGCATAGTCAGATTGTGTCATTCTAGTTAAATTTAAACTAGTCAT
TTTACTTAATCTTTTCGCTTCTGTGGTTTTATGAATTGAAAAGGACAAAGACTAAAATCATGATCTATTGTGATA
GTTGCGCAGTTTAAATGAGATAATACATATAAAATACTTAGAATAGTGCCTGGGAAGTATTCAGCATTAAATTT
AGAAAAGATCTTCTTAATTTGCTCTCAGGCAGCTGTTTATGATCCTGTCTCCTCTCTTAGAAGACGACTTTCG
GGGCGCCTGGGTGGCGCAGTCGGTTAAGCGTCCGACTTCAGCCAGGTCACGATCTCGCGGTCTGTGAGTTCG
GGCCCCGCGTCGGGCTCTGGGCTGATGGCTCGGAGCCTGGAGCCTGTTCCGATTCTGTGTCTCCCTCTCTCTC
TGCCCCCTCCCCGTTTCATGCTCTGTCTCTCTGTCTCAAAAATAAAAATAAAATGTTAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAGAACGACTTTCTGATTTGGGGGTGAGGCAGCT
GTGACCCTTCAGATATTTAGACCAGCCCCAAATCCTGTTTACTGACCTCTTTTTTTTTTTCTTTAGGTCCAC
TTTTAGGCACCTTTTTCGCTACAAGAGCCCCTATCTCCAGAGTTTCTTTTTTTCAAGAAACCTAATTTGAAAG
CAAAATCCCAGGCTCAAGGTCTTAAGAGGCAAGGATTTCTAATGATCATAATCTCATAACACTTTTAGACC
CCTGTTGCATCCTGTTCTTTTCTAAAGAAAATGTAATCTTGAAAGGATGGTTGTAATGATTTTTTTTTTTTT
TTTGCCTTTTCGTAAAGCACGAATGATAGCACATTACCTATTGGGGAAGAAACATTTTAGCTATTTTAAAGGTC
CAGAGAGAAGCATGTGGTAGAATTATTTTTGTTTCTCAGGGTTTTAGGGGATCATGTTTGAAGGAAAGCTAA
TTGCAGAGTTTACGAAACAGGCATGGAATGTGTGCTTGATCAGCCTAAGCAAGGACTAGAACGCTTTCTTTTC
CTGTTTTCGGAGGGTCCAGCTGGCTTGCCGGGATGGGAGTCTGGACTGGACTTCTGCGCTGGGGGCAGT
GTGAGCAGGAGTCAGCAGCCTCGAGAGCTGGGCATGTTTACTGAAAGGGGAAATGGACGCTTGAGCAATAGT
TACCATCATTATCATAAAAAATAACCTATTAAGCACTCCACTCTCCAGTCAAGACCATGAGCTCTTAAAGGC
ATTTGAATAGAACTTCTTTGCCCTCTAAAGGCTTTCAATTTACGTAGTAAACTGAGTGCCAGTTATTAGT
CTCAAACTGGGGTCAGGGTGTGCCTTACAGTAAATGCTGGTTTTCCCGTAAATTTCACTACGTTGATCGA
GCTAGAGAGCCTATTTGTTGCGAAAATCTGGGTGCCATGAATTAACCTGCAGCTTCATTTACCTACAGCGAG
AGAGGGTGTTCATTCTCCAATGGTTGGGGAAATGGCTTTGTTTTATCAGCATTTTGTCAGTATCGGCAA
CTTCAAGACAAGTAGGACTATACAGAAATCTAGGAGATGCCCTTGGGTCTCTATAGCGTGAAGGAGCTGGAAT
CTAAGAATCAGAAGATGGGAGATTTAAGTACAGGTGCTGACCCTGGCATTGGTAAACATGGGGCTTTAGAT
GAATCTTCGTCTTTATTTCTCTGACTGGAGGATTAGACAATAGCATCCTACTAGTCATGAGATTATTGTGAAGGT
GAACTAATAGATGCAAAACCCCTGGTGCATACAGTAGCCCTCAATAGCCCCTTTTTGAGCTGTTAAAGCAT
CAGAGGGAAAACCTTACTTACCTGCATCAAAACACACGGGGTGTGGTTAATGACGCAATTCAGGGTCTC
ACCTTAGATTTACTAAAGACATAACCTCTGGAGATAGGGCCTGGGGAATTTGCATTTTGAAGTGGCTCCCAAC
TAATTTAAGTCAGTTTGTAAAGTTGGAGGGGAACAAATCCTGTGGTTGTGATTCTTACATTACTTCAGG
CTGTTTTATTGTGAAATCCAATTGTGATTTCCCTCAGTCACTCGGGATGAAGAACTGAGATATATAATGGAAA
GATGTCCAGTGCCAAGCAGGAAATAGGCCATGCCCTGGAGATAGCATAGTATGGTTGCAACTGACCTATACAA
AGCCTATGTAGTAAAGAGTAAAAGGCAGCCCTTTGGGTGCATGTGCCCCGGCACTGGGCTGTTCCGCTTGAA
GCGATGGGAGCAGGGGCTGCCTTTCAGCCTTAATCACCACCAAAGGTGGGTTCTTCGTTTCAAGGAGCTTTA
AGCACAACCACACAAAACAGCCTCGGCTAAGGGCACCTGGCCGGGAGCCCCGTAGGTGGGCGTAGGGACA
GGAACCAAGAAGCACTAAAAGGAGGTAGGGAGCCAGAAGCAGGGATGCATGCAGTCAGGAACTTTGCTTA
CAGTACAATTTGGCTTATAATTGTTTTATCGCAGTCTATAATAATTTTTAATTATTTAATAATATTGCAGCCA
CAATGACATTTAATTATTTGTATTTGGTTAATTATTTTCTCATAAGGTTTTTCAAAGAGGGAGGCAAATCAA
AGAAAACGAAGTAAATAAAGAAGTAAACTTGATTAGTACCCCCACAACTCCAAGGATTATACTCACCTTGG
TGCAAATCACTCCTCTCCATACCTCTTTTATGTTACGTTTACTTGTGTTGTTGCCCGTAGTGAGAATTG
GTACTTGTTCATAGACTCAACTCATTCACTGCAGGATCCTCACTCATCATAACACGATATGTTACTAAGGAA
CAGAACTATGTTGAGAGTTTTGAGAAAGCTTTTTGAAAATATTGTTTTCAGAAAGAATTTTTTTGGCTTACT
TGACGCTCAGATTTCAACAACGCAGAATTAGTCTTTTTTAAAATATCCCCGGTTAACCAAAATTTTACCTTTTG
AACTGAATGTGACCTTTCTTAAACATCCATTGTGTGTTTCCACGTGTGAAGAGGTGAGTAGAATTAAGGCA

TAAGAGTTCTATTTTTTAAATATACATTGATATTATTTCACTATGTACACAGTAAGCAGAAGTCATCAGCATTAC
CAACCAGAGCAAATAAGCATTCTGAGCTTTTACTGGCCTACTTTGTGACGCTTATCTCTTGTTCTTCTACCA
TGAATCCTACCTGGAAGTCATACTGAATTACTTACTACCTATAGTAAGTGTGATGTTGACCTGTGAACACACTGT
TCCTGCTCCCTGAGAATCATTCCCATGTCACCTTGCTAATATCTTGTACTTGAAGACTCAGCTCAGATGTCACCT
TTTTAGGAAAACCTCTTCCCTCTGCCAGCCGCCTCCATCCTCTTAGATTCCCTTCCGCTATGCTGTGATTGTT
CCCTCTGCATATCGCTGTCTCATTCCCTGTATCAAGCTGTGCCATGACGGATGTCTACTTGTCTGCTTTTGCCAC
TATTCTGGGAACATTTCAAGGGCAGACATTATGTCTATGTCTGT
GTCTGTGGAGGGGAAGAGAGAGAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATCTGGATGAAG
TATTGCTAGTGACTCCAAAAGTAATTTTTCTTCTTGCCATCAAATATTCTCTCCTGTATCACTGTGTGAAGATAT
ATTTTTCTAAAGAACTCTAACACATGCAATATTAATAGGGCCATATGCTACCCCTCTCTCAGCACCATGAATC
ACACTGATAACATTGAAAATGTATTCTTATTTCAAAGGAATAATATGACCCCATTTCTCGAAACATGCATTCAT
GTTTTATCAGGCAATTGTTCCCTAGTAATTCAGTTCATTTATTTTTCTTGATGGCTTAAGAGGGGAAAATATTA
AAATATTAGAAGTTATTTTTTACTGCAAATCTCAAAGTAATTTAAAACCATAACAGAATTTCAACATATTAAG
GGTTCTGTTATCAATTTAGATACATTGATGTTATTTCACTAAGTATACAGTAAACAGAAATCAACATTACAAA
GATGAATAAAGTAGGAAGATAGAAATGAAAATGGTAATTTAAAGCAACTTTTTAAAAGAAGCCAATATGTCTC
TGGGCACCTGGGTGGCTCAGTCAGTTAAGCATTGTCTGACTCTTGATTTCAGCTCAGGTCATGATCTCACAGT
TTCTGAGTCAAGCCCCACGTTGGGCTCTGCGCTGGCAGTGCTGAGCCTGCTTGAGATTCTCCCTCTCTCTG
CCCCTTCTCCACTCACATTCTCTGTCTCTCAAACCTAAATAAAAAAAAAAAAAAACTAAAAAAAAAAGAGG
CCAATATGTCTTACAAGAGAGAATGGAGGA**GGAAGTTTCCGTCACTGGAAT**TTTGGTTTCTTTACAGTA
TAAGACCTCATTTTATTACATGCTGAAAATATTACTATTTACAAGTTTTTCTTCTTCCCCCACCAGGCCAA
ATT**TA**CCGATGACTGCAAGTTCAGGGAGCGATTCCAAGAAAACAGCTATAATACCTATGCCTCAGCAATACAC
AGAACTGAGCCAGCAGGCCGGGAATGGTATGTGGCCCTCAA**C**AAGAGAGGGAAAGCTAAGCGAGGCTGCAG
CCCAGGGTTAAACCCCAGCACATCTACCCACTTTCTGCCAAGATTCAAGCA**G**CTGGAGCAGCCAGAACTTT
CTTTCAGGTCAGTTCCTGAGAAGAAAAGCCACCCAGTCTGTCAAGCCAAAGTTCCCTTTCTGCACCT
CGGAAAAGTCCAACACCGTGAAGTACAGACT**C**AAATTTCTGTTGGATAATATTCTTCTTGGCCTTGTGAGAA
ACCATGCCTCGCCTCAGGAGTTTCCACGGGTGTCTTTATGGCTCTGAAGAAAACGTTCCGGATACACCTGCAG
CTACACTCCACCGTAGT**GAAGTCCAGTCACTGTTCAGCG**CGACTGAAACAAAAGTGGTTTCTGATAGGAACT
GAACTGGAATCTTTGTCCAACATAGGGAGCACACTGCTCCAGTCAGGACGACATAAAGCCTTTGCTTTATGC
TCGTGCATACTCTGTATTTTGAAGAAAGTAAACAGCGTGGACTATGTATTTTCTGACTTTTACAGATCAGCCT
GAAAGAACATACATGATACATTTTTATTTTTGGTTTCAAAGAATTTTTGATGCAGATAAAATATTTATTAAC
TTTTGTTTTTTGTTTTTGTGTTTTTTTTAAAAAAGTACCTCGGCATTGAGCATATTTTCTTACTTTTATTTAA
TTAATATGACATAACCATTTGAATGCAGTTTATGAATATAAATGTGTTTATAGCCATTTGTAACATGTGGATTT
TTTCATTTTTCTTATTCATCGCACTTTCATTTTTATTTTTATTTTTACCATACCTCAGATAATGTAAGTTAGTCC
ATCATCTTAAAATGCTTAAATCTCTTCAACAGCACCAAAGCTCAGCTTAGATTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCGTGTAAATTCATGACAGTATGTGGAATCCTACCCCTTTGGTGG
CTGGGCTAATAATGGCTTAGGAGTAAGGAGAAAATTAAGGATTTTTTGTATGATTATACACTGGAGGTAAG
GAAAAGGATTTGAGGCACAACACTACCTAAGTCTGCAGCATTACTGGGATCTGATTCTGTCTTGCTTCATTTCT
CCTTTTATCTACTCCCCTGCCCTCATTCTTGAACAGCTGGAGGAATACATTTTATTCTGTCCATCAAGCACACT
ATGAAACCAGAGTGCTTAAAAATACCTCTTCTATGACCCCTGCTATCCCCACTGTATAGATCCACGGGGAGCA
ACCCACTTAGCAGAAAACATGGAAAATCGAAGAAGATGAATCGTGTAAACAGTTACGCACGTCAAGTTCTGTT
GTCAAAAATATTCTTATTACTCAGCCAAACACCTTTGAGTTTGCTGTCTAAAGGTAACCATCCAATGAATAG
ATTGCCCTTAGAATAGATACTCTGTATGATATTTTTAAAAAAGGTGGCCGTGGAATAGAGGAAATTTAAATTT
GGGAATTTGATGATTGAAAATAGCACTTTAATTCTCAACCTGCATACTGAATGTTGGGCATAAATCACAGAAAA
TTTGACTTAAGAGAATTTCCGTAAATTTATTTACTTTCCCGGCAATCATTTCTATGGAGTTCTATAAAATATAAGT
GTTTATATCAGAAATGTGCCTGTAAAAAAGGTACAGCTAATTCTCAGAAGTATGTCTTCCACAGGAAGAGCA

GAAGAATTCACAGAAAGTTTCTGTTGTATGTTTAAGCATGCTTCTTTTCTTTTAAAGGATACTAACAAACTTTTCT
AAAGTTTTGTTTATTTTGGCACACAAATGCAAAGTAGCAATTTATCACAATTGAACTTACTACTACTTAGGGAG
ATTGCCTTATTTAAATAGAAATAAACTATACACATATGATATATATGAAATCACCCATCAATGAAATCATCATGC
CTCTACTCTAGTATTGTGTTTTATTATAAAGCCAATAGTCTGATTAGACATTGTTTGCATTTAATACATGATTTAA
AACATATCAAATGAGATACTACAAAATTTTTATTTAATTTATAAATTTAAATTTCTCTTGGGTTAAATGAAACAGG
GTTTTGGAAACAAAATATGTCCAACCTCATCCAGCTGGCATATCACCTTCTATACACAGTACAAAGCTGAAAA
CAACCCTCTAGTTTACTCTCATATATTGTTAAGAATTGTACCCCGTGTATCAAATTTCTTAGTACACATGAAAAATT
AACTTGTAACAGAACAGTAGACGTGTTCCCTAAATGGGCAAGGAAAAGATGATATTAATGATGATTAACAA
CAAACGAAATTAATGCATATATTACATTAGGCTGATGCTGCTGGTAGTTTAGGTTAAACTGCAAAATAATAGCT
TATCTTGTACTCTAGTTTGATTTGATTAGTACATGAAAGTTAAAGTAGGATAGTTACTAAATATATATCATGCAA
GTCAGGACTCATTAAATTTCAAATTTAAAGCCAAGCTAAAATTAATAAAAAAAAAAATTAATTAACACTTATCTTCAG
TTTACTGGCCATACACAATTACATTTAATTAATGCTCACTGAAGCTTAAAGTTACCTAAATTAATTAATTGAATG
AACTCATGTACAGAAAACACGTATAAATGTAACCTTACTAATAACCTAGAACATTTGAAGGGGGTCCTTGCTT
ATGTCGTTTTCGATAATTTTAAAGTAACTTGGCCCGTCTAACATCAAATACGGTTGTTTAAATCATGGTTACATTTA
CCTAAAAACGTCAATGAATTTGACATTAATAATTTAGGAACTAATTTGCCTAGGAGACAGTAAATACCTTCCTA
TTGAGAATTCAGTTTTATTA