

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Hodnocení variability genů souvisejících s barvou srsti
u holandského ovčáka**

Diplomová práce

**Bc. Tereza Benešová
Biotechnologie a šlechtění zvířat**

Ing. Jakub Vašek, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci "Hodnocení variability genů souvisejících s barvou srsti u holandského ovčáka" vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.7.2020

Poděkování

Tato diplomová práce vznikla za pomoci a podpory od mnoha lidí. Speciální díky patří vedoucímu mé práce Ing. Jakubu Vaškovi, Ph.D. za jeho zájem o dané téma, nekonečnou trpělivost a všechnen čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala panu prof. Ing. Luboši Vostrému, Ph.D. za cenné rady a nápady při statistickém hodnocení výsledků. Můj dík patří i paní Ing. Daniele Čílové a paní Ing. Martině Melounové, Ph.D. za pomoc v laboratoři a sdílení jejich drahocenných znalostí a zkušeností.

Také bych chtěla poděkovat chovatelce Janě Hofferové, která poukázala na řešenou problematiku, ochotně zodpověděla všechny mé dotazy a opatřila pro tuto práci mnoho vzorků DNA. Moje poděkování patří rovněž všem majitelům holandských ovčáků, kteří pro tuto práci poskytli vzorky DNA a fotografie svých psích společníků.

Nakonec bych ráda poděkovala svým přátelům, bez kterých by tato práce nevznikla. Jejich povzbuzování a podpora ve všech mých rozhodnutích je pro mě neocenitelná.

Hodnocení variability genů souvisejících s barvou srsti u holandského ovčáka

Souhrn

Pro holandského ovčáka je typické černé žíhání srsti, a pokud se vyskytne jedinec, který neodpovídá tomuto standardu, je bonitační komisí doporučeno ho do chovu nezařazovat. V poslední době se objevuje stále více psů tohoto plemene, u kterých dochází v krajním případě až ke ztrátě žíhání v průběhu jejich života. Proto byla hlavním cílem této práce snaha zjistit možnou příčinu na molekulárně genetické úrovni spolu s popsáním genetické variability sledovaných genů v populaci holandského ovčáka.

Byly studovány tři nejdůležitější geny, které hrají roli v determinaci zbarvení psů. Jedná se o geny kódující melanokortinový receptor 1 (*MC1R*), agouti signální protein (*ASIP*) a betadefensin 103 (*CBD103*).

U genu *MC1R* byla kompletně sekvenovaná celá kódující sekvence a část promotoru. Díky tomu byly nalezeny tři nové bodové mutace. Všechny se vyskytují v promotorové oblasti, přičemž u dvou z nich (c.-146G>del a c.-45A>G) byla prokázána statisticky významná souvislost s výše uvedenou změnou fenotypu. Dále bylo zjištěno, že většina jedinců má geneticky určenou tmavou masku na čenichu, která je způsobena alelou E^M .

V roce 2019 se v jednom vrhu narodila polovina štěňat s černě žíhaným pálením, což je u holandského ovčáka další nestandardní zbarvení. Proto byl u všech jedinců hodnocen výskyt alely a^t genu *ASIP*, která u psů způsobuje pálení. Ta byla nalezena pouze u matky zmíněného vrhu a většiny jejich štěňat. Následně u nich byla analyzována alela a^y , která byla nalezena u jednoho štěněte v homozygotní sestavě ($a^y a^y$) a u dalších 4 štěňat a jejich matky v heterozygotní sestavě v kombinaci s alelou a^t .

Černé žíhání je způsobeno alelou k^{br} genu *CBD103*, jejíž struktura nebyla dosud spolehlivě popsána. U některých plemen byla dokázána teorie vzniku alely k^{br} duplikací dalších dvou alel (K^B a k^y) tohoto lokusu. Detekcí výskytu obou těchto alelických variant najednou (tj. přítomnost k^{br} alely) byla u holandského ovčáka tato teorie potvrzena.

Tato práce byla podpořena SGS grantem SV20-9-21360 - Studium geneticky podmíněných vlastností s využitím molekulárně-genetických, bioinformatických a statistických metod.

Klíčová slova: *Canis lupus familiaris*, holandský ovčák, pigmentace srsti, černé žíhání, *MC1R*

Evaluation of variability of coat color genes in Dutch Shepherd

Summary

The Dutch Shepherd dog can be characterized by black brindle coloring. It is recommended by the bonitation committee to not breed individuals that do not meet this standard. Recently, there has been an increasing number of dogs of this breed in which the brindle pattern disappears during their life. The main purpose of this work was to find a possible cause at the molecular-genetic level and describe genetic variability of the monitored genes in the Dutch Shepherd population.

The three most important genes playing a role in determining a dog's coat color were studied. These are the genes encoding melanocortin receptor 1 (*MC1R*), agouti signaling protein (*ASIP*) and betadefensin 103 (*CBD103*).

The complete coding region and part of the promoter of the *MC1R* were completely sequenced. As a result, three new SNPs were discovered. All occur in the promoter region, two of which (c.-146G>del and c.-45A>G) have been statistically significantly associated with the phenotype change described above. Furthermore, it has been found that most dogs have a genetically determined melanistic mask caused by the E^M allele.

In 2019, five puppies within one litter were born black with brindle tan points, which is another non-standard color in the Dutch Shepherd. Therefore, the presence of the a^t allele of the *ASIP* gene, which causes black and tan color in dogs, was evaluated in all individuals. This allele was found only in the mother of the litter and most of her puppies. The presence of the a^y allele was then analyzed, which was found homozygous in one puppy ($a^y a^y$) and in another 4 puppies and their mother heterozygous in combination with the a^t allele.

Black brindle is caused by the k^{br} allele of the *CBD103* gene, the structure of which has not yet been reliably described. In some breeds, the theory of the origin of the k^{br} allele was proved by duplicating the other two alleles (K^B and k^y) of this locus. On the base of detection these allelic variants at once (the presence of the k^{br} allele), this theory was confirmed in the Dutch Shepherd.

This study has been funded by the SGS Grant SV20-9-21360 - Study of genetically determined characteristics using molecular-genetic, bioinformatic and statistical methods.

Keywords: *Canis lupus familiaris*, Dutch Shepherd, coat pigmentation, brindle, *MC1R*

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Fylogeneze a původ psa domácího	3
3.2	Charakteristika plemene holandský ovčák	5
3.2.1	Historie plemene	5
3.2.2	Zbarvení holandských ovčáků	6
3.3	Zbarvení srsti u psů	7
3.3.1	Pigmentace srsti	7
3.3.1.1	Melanin	7
3.3.1.2	Regulace melanogeneze	8
3.3.2	Geny ovlivňující zbarvení srsti u psů	10
3.3.2.1	Gen pro melanokortinový receptor 1 (<i>MC1R</i>)	10
3.3.2.2	Gen pro agouti signální protein (<i>ASIP</i>)	11
3.3.2.3	Gen pro beta-defensin 103 (<i>CBD103</i>)	13
3.3.2.4	Interakce mezi jednotlivými alelami genů <i>MC1R</i> , <i>ASIP</i> a <i>CBD103</i>	14
3.4	Metody molekulární biologie	15
3.4.1	Izolace DNA	15
3.4.2	Gelová elektroforéza	15
3.4.3	PCR	16
3.4.4	RFLP	17
3.4.5	Sekvenování	17
4	Materiál a metody	22
4.1	Biologický materiál	22
4.1.1	Hodnocení jedinci	22
4.1.2	Odběr DNA	22
4.1.3	Izolace DNA	22
4.2	Použité primery	22
4.3	Analýza genu pro melanokortinový receptor 1 (<i>MC1R</i>)	23
4.3.1	Amplifikace genu <i>MC1R</i>	23
4.3.2	Sekvenace genu <i>MC1R</i>	23
4.4	Identifikace mutací genu pro agouti signální protein (<i>ASIP</i>)	24
4.4.1	Analýza výskytu SINE inserce	24
4.4.1.1	Amplifikace oblasti intronu 1	24
4.4.1.2	Detekce výskytu SINE inserce	24
4.4.2	Analýza výskytu mutace c.248G>A	25

4.4.2.1	Amplifikace oblasti exonu 4	25
4.4.2.2	Detekce výskytu mutace c.248G>A.....	25
4.5	Identifikace mutací genu pro betadefensin 103 (CBD103).....	26
4.5.1	Analýza oblasti exonu 2.....	26
4.5.1.1	Amplifikace odlišných sekvencí alel K ^B a k ^y	26
4.5.1.2	Detekce výskytu alel K ^B a k ^y	26
4.6	Statistické vyhodnocení výsledků	27
4.6.1	Hodnocení variability alel sledovaných genů v populaci	27
4.6.2	Statistická analýza vlivu mutací genu <i>MC1R</i> na změnu fenotypu.....	27
5	Výsledky.....	28
5.1	Izolace DNA	28
5.2	Analýza genu pro melanokortinový receptor 1 (MC1R)	28
5.2.1	Detekce výskytu mutací v genu <i>MC1R</i>	28
5.2.1.1	Detekce mutací v sekvenci promotoru	29
5.2.1.2	Detekce mutací v exonu	30
5.2.1.3	Populační analýza frekvencí alel a heterozygotnosti lokusů genu <i>MC1R</i>	31
5.2.1.4	Statistická analýza vlivu mutací genu <i>MC1R</i> na výsledný fenotyp	31
5.3	Identifikace mutací genu pro agouti signální protein (ASIP)	32
5.3.1	Detekce výskytu SINE inserce	32
5.3.2	Analýza sekvence intronu 1	33
5.3.3	Detekce výskytu mutace G248A	34
5.3.4	Analýza sekvence exonu 4.....	34
5.3.5	Výsledné alely a genotypy a jejich statistické hodnocení.....	34
5.4	Identifikace mutací genu pro betadefensin 103 (CBD103).....	35
5.4.1	Detekce výskytu alel K ^B a k ^y	35
5.4.2	Analýza sekvencí alel K ^B a k ^y	35
6	Diskuze.....	36
6.1	Hodnocená populace	36
6.2	Genetická variabilita populace v genech <i>MC1R</i>, <i>ASIP</i> a <i>CBD103</i>.....	36
6.2.1	Variabilita genu <i>MC1R</i>	37
6.2.2	Variabilita genu <i>ASIP</i>	38
6.2.3	Variabilita genu <i>CBD103</i>	38
6.3	Asociační analýza	39
7	Závěr	41
8	Literatura.....	42
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	51
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Pes domácí je společníkem člověka už od pravěku. Již v té době pomáhal lidem s lovem zvěře a stal se tak neocenitelným partnerem svého majitele. Tento jedinečný vztah člověka a psa přetrval až dodnes, kdy je využití psa mnohem rozmanitější. Pomáhá například u složek integrovaného záchranného systému, jako jsou hasiči a horská služba nebo u ozbrojených sborů včetně policie, celní správy či vězeňské služby. Uplatňuje se i v zemědělství jako ovčácký nebo pastevecký pes. Velmi důležitá je i jeho funkce vodícího, asistenčního či signálního psa pro lidi se speciálními potřebami. V poslední době se rozvíjí využití jeho citlivého čichu nejen při pachové identifikaci ale i při vyhledávání drog, škůdců, invazních druhů dřevin a dalších. Služební a pracovní kynologie není jedinným odvětvím, kde se se psem můžeme setkat. Velmi rozsáhlou a oblíbenou se stala zájmová a sportovní kynologie s nespočtem aktivit, kterých se lze se psem zúčastnit. Poslední a nejdůležitější roli má pes jako společník svého pána na procházkách, při hlídání jeho rodiny a majetku. Díky všem těmto svým schopnostem se pes stal nepostradatelnou součástí našich životů.

Aby si každý člověk mohl vybrat toho pravého psiho společníka, bylo vyšlechtěno mnoho plemen, která se mezi sebou liší exteriérem a povahou. Uvnitř plemene je vždy stanoven standard, který určuje mimo jiné i jeho exteriér, tedy vnější vzhled. Hlavním znakem holandského ovčáka je jeho černé žíhání, kterým se odlišuje od ostatních ovčáckých plemen psů. S cílem pomoci zachovat toto výjimečné zbarvení vznikla tato práce.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

U holandského ovčáka je znám jev, kdy s přibývajícím věkem dochází u některých zvířat ke ztrátě pruhování srsti a tedy ke změnám pigmentace. Tomuto jedinci postupně tmavne srst a černé žihání se tak stává nezřetelným. Cílem práce je zjistit příčinu tohoto jevu na molekulárně genetické úrovni spolu s popsáním genetické variability u sledovaných genů *MC1R*, *ASIP* a *CBD103* v populaci holandského ovčáka.

K ověření stanovené hypotézy byly navrženy dílčí cíle práce, které lze rozdělit do následujících bodů:

- izolace DNA, stanovení jejího množství a čistoty spolu s ověřením vysokomolekularity
- navržení primerů pro amplifikaci vybraných oblastí genů *MC1R*, *ASIP* a *CBD103*
- detekce polymorfismů kombinací PCR, restričního štěpení a sekvenování
- statistické zpracování a vyhodnocení získaných dat

3 Literární rešerše

3.1 Fylogeneze a původ psa domácího

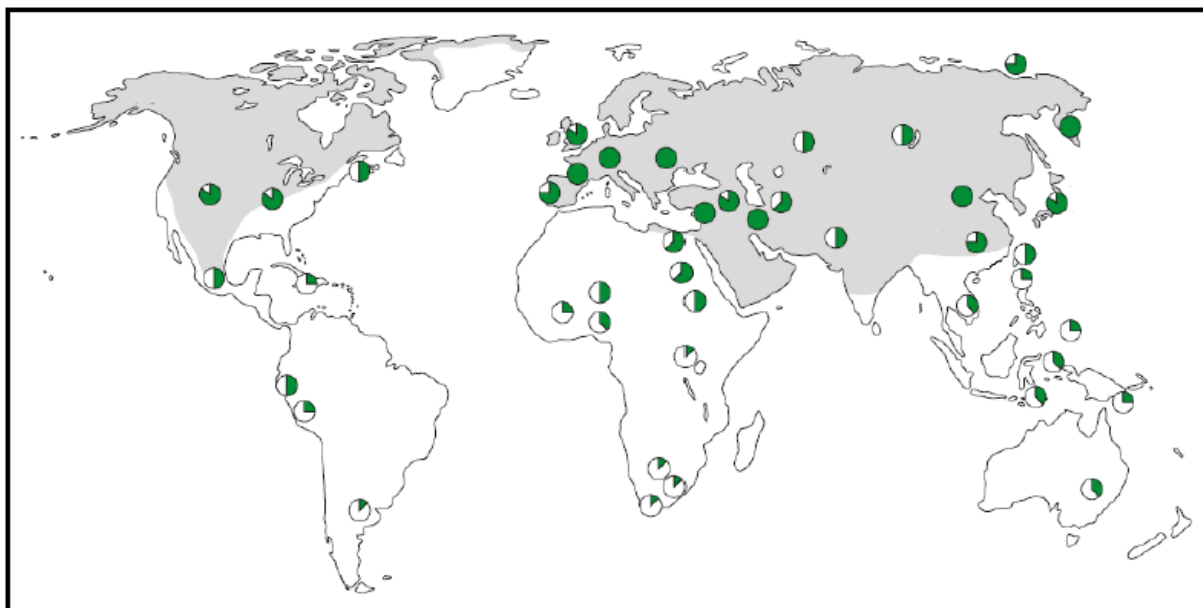
Pes domácí (*Canis lupus familiaris*) je jediný člen čeledi psovitých, o kterém lze říci, že byl plně domestikován. Archeologické nálezy naznačují, že pes byl první domestikované zvíře, které se objevilo na konci poslední doby ledové, kdy existence lidí stále závisela na lovu a sběru potravy (Clutton-Brock 1995).

Dříve se spekovalo, zda je pes domácí původem z vlka obecného (*Canis lupus*) nebo šakala zlatého (*Canis aureus*) (Clutton-Brock 1995). Teorii, že pes pochází pouze z vlka obecného, potvrzují například jeho kosti nalezené poblíž lidských ostatků z Lazaretu v jižní Francii (de Lumley 1969) staré přibližně 150 000 let a Zhoukoudianu v severní Číně z doby před 300 000 lety (Olsen 1985). Rovněž po srovnání mtDNA (mitochondriální DNA) sekvencí psů s vlky, kojoty a šakaly bylo dokázáno, že pes má pouze jednoho předka a tím je vlk obecný (Vilá et al. 1997). Lidé ochočili vlčí mláďata v mnoha částech světa, a proto je pravděpodobné, že k původu psa přispělo několik poddruhů vlka obecného (Sablin & Khlopachev 2002).

Dle rozboru mtDNA haplotypů dnešních psů bylo identifikováno 51 zakládajících linií, což naznačuje, že pes domácí pochází z alespoň 51 vlčic s odlišnými mtDNA haplotypy, a proto bylo domestikováno pravděpodobně několik stovek vlků zároveň (Pang et al. 2009).

Analýza kontrolních sekvencí mtDNA u psů a vlků naznačila počátek domestikace psa na dobu před více než 100 000 lety (Vilá et al. 1997). Molekulárním datováním bylo zahájení domestikace procesu upřesněno na dobu před 18 800 – 32 100 lety (Thalmann et al. 2013). Z analýzy celého mtDNA genomu psů z celého světa vyplývá, že pes domácí jako poddruh vlka obecného vznikl asi před 15 000 lety (Savolainen et al. 2002). Toto potvrzují i archeologické nálezy kostí prvních psů na Středním východě staré 12 000 let (Tchernov & Valla 1997) nebo v Izraeli, kdy je nález lidské kostry s rukou položenou na štěněti odhadnut též na stáří 12 000 let (Davis & Valla 1978). Nejstarším dochovaným nálezem plně domestikovaného psa je spodní čelist objevená v Oberkasselu v Německu se stářím asi 14 223 let (Nobis 1979). Přehled těchto a dalších významných archeologických nálezů domestikovaných psů a jejich přibližné stáří je znázorněn na Obrázku 1.

V otázce geografického původu prvních domestikovaných psů panují v současné době značné rozpory (Thalmann et al. 2013). Dva nálezy prehistorických psů ze Západní Evropy (Goyet v Belgii, stáří 31 700 let) (Germonpré et al. 2009) a Sibíře (Razboinichya v Rusku, stáří 33 000 let) (Ovodov et al. 2011) oddělené tisíci kilometry dokazují, že domestikace psů byla multiregionální, tudíž neměla jediné místo původu (Ovodov et al. 2011). Nicméně na základě největší genetické variability mtDNA psů z oblasti Asie ale někteří autoři zařadili původ psa pouze do této oblasti, konkrétně do jihovýchodní Asie (Savolainen et al. 2002; Pang et al. 2009). Naopak evropští psi, kteří mají největší morfologickou rozmanitost, vykazovali dle výsledků malou genetickou variabilitu (Savolainen et al. 2002). Původ psa v Asii potvrzují i další studie věnující se například variabilitě SNP (single nukleotide polymorphism) v jaderné DNA (Vonholdt et al. 2010) nebo variabilitě MHC (major histocompatibility complex) (Niskanen et al. 2013). Oproti tomu analýza mtDNA genomů prehistorických psovitých ukazuje nejužší fylogenetickou příbuznost těchto šelem s evropskými psy, což naznačuje původ psa domácího v Evropě (Thalmann et al. 2013).



Obrázek 1: Mapa světa shrnující přibližné stáří pozůstatků domestikovaných psů nalezených na různých místech světa. Přibližný rozsah populace vlka obecného je vybarven šedě. Zelené kruhy představují oblasti, kde byly odhaleny pozůstatky domestikovaných psů alespoň na jednom nalezišti. Kruhy jsou rozděleny do osmi částí, kde každá představuje 1 500 let. Vizuálně znázorňují stáří nejstaršího nálezu v daném regionu. Zcela vyplněné kruhy představují nálezy starší 10 500 let (upraveno podle Larson et al. (2012)).

Domestikaci psa lze vnímat jako důsledek cílených aktivit člověka, například selekci na příchyllost k člověku (Galton 1865) nebo jako spontánní evoluční proces, kdy člověk založil novou niku, do které vlci vstoupili za účelem získání potravy. Tito vlci byli tolerantní k přítomnosti člověka a tím měli selekční výhodu oproti ostatním vlkům (Coppinger & Coppinger 2001). Selekcce na krotkost byla tedy prvním krokem, jež vedl k vývoji stovek psích plemen, které známe dnes (Larson & Burger 2013). Aby mohli domestikovaní psi vzniknout, museli být mezi vlky jedinci, kteří splňovali základní kritéria: odolnost, příchyllost k člověku, užitečnost, snadná ochočitelost, snadné rozmnožování a touha po pohodlí bez tendence prchat (Galton 1865).

Proces domestikace zvířat zahrnuje adaptaci na člověka a nové prostředí. Tato adaptace je dosažena kombinací genetických změn napříč generacemi a ovlivněna stimulacemi prostředí a zkušenostmi jedince v průběhu jeho života. Kvůli těmto změnám lze očekávat, že se fenotyp domestikovaných zvířat bude lišit od fenotypu jejich divokých protějšků (Price 1984). Pes se od vlka morfologicky liší například zkrácením nosu a dolní čelisti, což vede k nahuštění zubů a zmenšení trháků (Ovodov et al. 2011). Změna srsti u psa domácího se projevuje větší škálou barev, než je tomu u vlka a bílými znaky, které vlk obecný postrádá (Zeuner 1963). Další odlišnost psa od vlka spočívá v postnatálním vývoji, který je u štěňat domácích psů prodloužený, s následnými dramatickými změnami v dospělosti (Wayne 2001).

Několik center původu psa domácího spolu s intenzivní selekcí zapříčinilo jeho obrovskou genetickou a fenotypovou variabilitu (Ruvinsky & Sampson 2001). Tuto variabilitu lze pozorovat například v morfologii jednotlivých plemen, která se liší ve výšce, stavbě kostry či typu srsti (Young & Bannasch 2006).

3.2 Charakteristika plemene holandský ovčák

Holandský ovčák měl původně funkci ovčáckého a pasteveckého psa, který střežil malé farmy v jižním Nizozemí, zejména na bývalém území Brabantska na hranicích s Belgií. Ovčáci a farmáři zde potřebovali všestranného nenáročného psa, u kterého nezáleželo na vzhledu ale na pracovitosti. Na konci 19. století začalo přibývat orné půdy na úkor vřesovišť, což vedlo k rozšíření využití holandského ovčáka jako detekčního, pátracího a později i vodícího psa (Magera 2011). Vzhledem k již zmíněné všestrannosti je dnes holandský ovčák využíván například jako policejní pes, pes záchranář a obranář (Gerritsen & Haak 2007). Také pomáhá na letištích, v přístavech a na státních hranicích při hledání omamných látek (Rejnartová 2007).

Holandský ovčák je poslušný, pozorný a majiteli velmi oddaný pes (Gerritsen & Haak 2007). Avšak pouze správný trénink a výchova s jemným přístupem dovedou plně rozvinout jeho charakter (Rejnartová 2007). Díky lehké konstituci a pracovnímu využívání je zdravý plemene na velmi dobré úrovni, psi se dožívají vysokého věku a netrpí dědičnými chorobami v takové míře, aby byla vyžadována zvýšená pozornost chovatelů (Rejnartová 2007).

3.2.1 Historie plemene

V červnu 1898 byl v Utrechtu založen Klub holandského ovčáka (Nederlanse Herdeshonden Club), který stanovil první standard plemene (Gerritsen & Haak 2007; Magera 2011). Daný standard se týkal pouze variet srsti a pracovního využití psů, a proto se brzy ukázal být nedostačujícím. Z tohoto důvodu byl v roce 1906 přepracován. Byly povoleny pouze tři variety, které jsou známé i dnes: krátkosrstá, dlouhosrstá a hrubosrstá, dále byla stanovena minimální výška u psů i fen a bílé znaky na srsti byly povoleny pouze na hrudi a na prstech. Od roku 1914 byl v rámci standardu zakázán výskyt bílých znaků na srsti a v roce 1920 bylo rozmezí povolených barev srsti a výšky psů a fen ještě více zúženo (Magera 2011). Radikální změny ve standardu rychle poškodily plemeno a vedly ke zhoršení a zmenšení jeho genetické základny. Hlavně zákazem bílých znaků na srsti bylo z chovu odstraněno obrovské množství jedinců. Tuto situaci řešili chovatelé registrací jedince jako belgického ovčáka, kde byly bílé znaky povoleny (Gerritsen & Haak 2007). Za účelem rozšíření chovatelské základny bylo do plemenné knihy v letech 1818–1937 zařazeno 18 krátkosrstých jedinců bez známého původu (Magera 2011). Před první světovou válkou došlo ke křížení krátkosrsté variety s německými ovčáky pro chov mohutnějších jedinců, kteří mohou být využiti policií. Během druhé světové války bylo kvůli tlaku německé armády na Nizozemí mnoho chovů zrušeno (Gerritsen & Haak 2007). V roce 1960 byl chov holandského ovčáka obnoven, došlo k úpravě standardu povolených barev srsti a uznání plemene Mezinárodní kynologickou organizací (FCI – Fédération Cynologique Internationale) (Magera 2011). Pro úplnost je Příloze 1 uveden aktuální standard plemene.

V České republice se jako první vyskytli hrubosrstí holandští ovčáci. Později v roce 1994 byla do Čech importována první krátkosrstá fena Gabie v. d. Passchin, která byla perfektní zakladatelkou chovu. Přes krátké působení tohoto plemene v České republice jsou jeho zástupci velmi úspěšní nejen na výstavách po celé Evropě, ale i jako pracovní psi u policie, vězeňské služby či v různých psích sportech (Rejnartová 2007).

3.2.2 Zbarvení holandských ovčáků

Barva holandského ovčáka je černě žíhaná (Obrázek 2). „Základní barvou je zlatá nebo stříbrná. Zlatá od světlé pískové až po kaštanovou. Žíhání je jasně zřetelné po celém těle, na límci, kalhotkách a ocasu. Příliš mnoho černé není žádoucí. Černé masce je dáována přednost. Bílé znaky na hrudi a tlapkách nejsou žádoucí.“ (FCI 2009, s. 3). Rozsah pruhování je velmi variabilní. Někteří psi jsou žlutí s malým množstvím černých pruhů, zatímco jiní mají tolik pruhů, že se zdají být celí černí (Kaelin & Barsch 2013).



Obrázek 2: Stříbrný hrubosrstý (vlevo), pískový dlouhosrstý (uprostřed) a kaštanový krátkosrstý (vpravo) holandský ovčák (zdroj: <http://www.zusvituveku.websnadno.cz/vyklad-standardu.html>).

V posledních letech se převážně mezi krátkosrstými holandskými ovčáky šíří jev, kdy v průběhu života jedince mizí žíhání srsti (Obrázek 3). Tento jev začíná být viditelný kolem druhého až třetího roku života. Projevuje se nejdříve kolem slabin a postupem času se rozšiřuje do oblasti břicha, hrudníku a zad. Chlupy v této změněné oblasti jsou v porovnání se standardními tmavší, matné, hrubší, což má za následek, že je žíhání nevýrazné a na některých místech často úplně chybí (Jana Hofferová, osobní komunikace, 10. 11. 2018). Tento fenotyp bude v práci dále nazýván jako „bez žíhání“.



Obrázek 3: Na obou fotografiích je fena B'Onze Liefde Hollandse Ster ve věku 2 roky (vlevo) a 6 let (vpravo). Při porovnání fotografií je viditelné, že v průběhu stárnutí feny mizí žíhání v oblasti slabin, hrudníku a zad, které je nahrazeno tmavšími matnými chlupy. Zdroj první fotografie: <https://www.hscd-ev.de/>, autor druhé fotografie: Andrea Grossmannová. Další fotografie nejen B'Onze Liefde Hollandse Ster jsou součástí Přílohy 2.

3.3 Zbarvení srsti u psů

Domestikace zvířat způsobuje, vznik nových fenotypů (Daverio et al 2016). Pes domácí byl selektován například na základě velikosti a stavby těla, což se projevilo i na velké různorodosti ve zbarvení jeho srsti (Dostál 2007). Vlastní barva srsti je determinována více geny a jedná se tedy o polygenní znak (Kaelin & Barsch 2013).

3.3.1 Pigmentace srsti

Pigmentace kůže, srsti a očí je dána přítomností barviva melaninu (Ruvinsky & Sampson 2001). Melaniny jsou syntetizovány v membránových organelách zvaných melanozomy, které lze najít ve specializovaných buňkách, melanocytech (Ito 2003; Rees 2003). Tyto buňky, původem z neurální lišty, migrují během embryonálního vývoje do pokožky, chlupových folikulů a duhovky, kde zajišťují přísun pigmentu do okolních buněk (Duval et al. 2002; Goding 2007). Pigmentace samotné srsti je zajištěna transportem melanozómů s nahromaděnými melaninovými pigmenty do chlupů během jejich růstu (Russo et al. 2007).

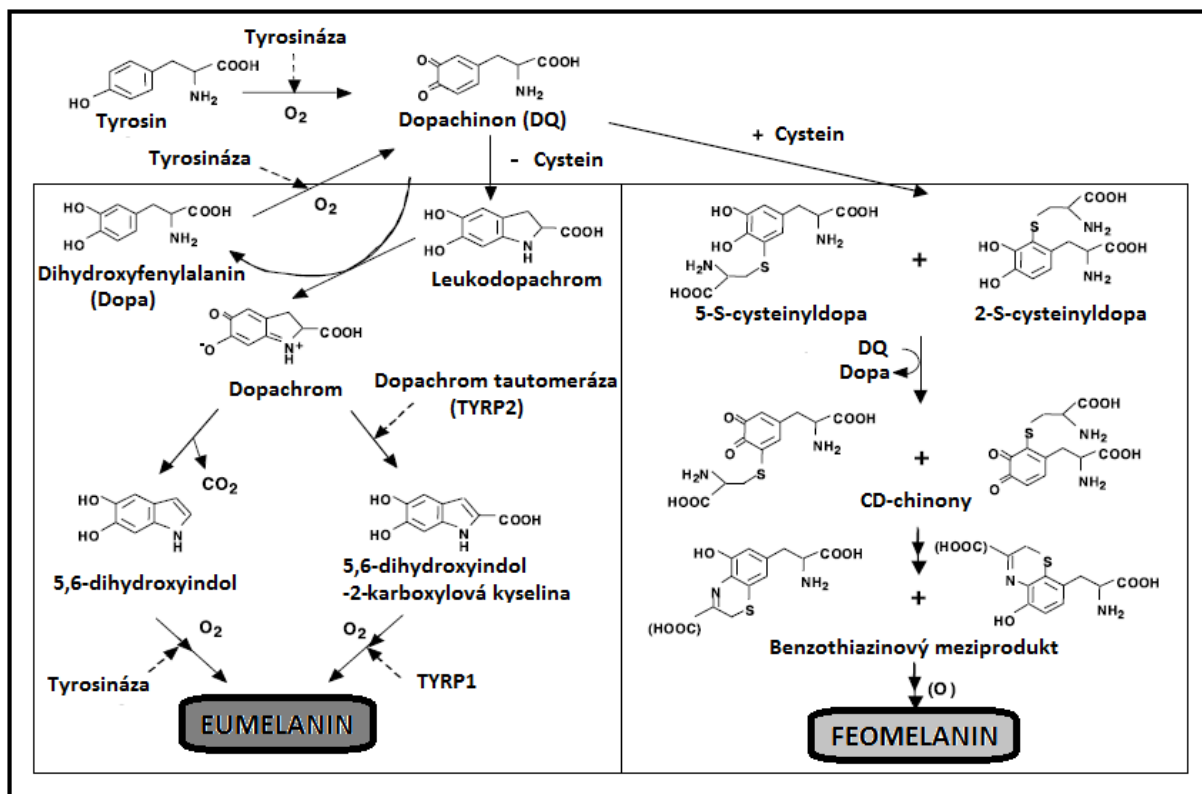
3.3.1.1 Melanin

Melaniny jsou velké biopolymery složené z různého množství tyrosinu a cysteinu (Ruvinsky & Sampson 2001). U zvířat jsou známy dva hlavní typy melaninových pigmentů produkovaných melanocyty, eumelanin a feomelanin. Oba typy mají podobné uspořádání uhlíkových vazeb (Ito 2003) a jejich výchozí látkou je aminokyselina tyrosin, která je enzymem tyrosinázou přeměněna na prekurzor dopachinon (Thody et al 1991; Ito 2003).

Eumelanogeneze pokračuje oxidací dopachinonu za vzniku eumelaninu (Thody et al 1991; Simon 2008). Syntéza eumelaninu je specifická vysokou hladinou dopachinonu (Ito 2003; Land et al 2003). Toto barvivo má na rozdíl od feomelaninu dvě odlišné formy, nerozpustnou černou a rozpustnou hnědou (Freinkel & Woodley, 2001).

Tvorbu feomelaninu oproti eumelanogenezi charakterizuje nízká hladina dopachinonu a snadno dostupný cystein, který se váže na dopachinon (Thody et al 1991; Barsch 2006; Simon 2008). Od eumelaninu se tedy feomelanin liší přítomností cysteinu, tudíž i obsahem síry a je charakteristický svou červenohnědou až žlutou barvou (Ito & Jimbow 1983; Tsatmali et al. 2002).

Syntéza melaninů funguje na bázi binárního spínače, což znamená výhradní produkci eumelaninu nebo feomelaninu, nikdy obou zároveň. Mezi syntézou těchto dvou pigmentů dokážou melanocyty chlupových folikulů velmi rychle přepínat. Tím vznikají barevné vzory mnoha různých savců, které jsou vytvářeny rozmístěním chlupů, jež obsahují výhradně eumelanin nebo feomelanin (Kerns et al. 2004; Barsch 2006). Schéma eumelanogeneze a feomelanogeneze včetně výchozích látek, meziproductů a katalyzátorů jednotlivých reakcí je znázorněno na Obrázku 4.



Obrázek 4: Průběh syntézy eumelaninu a feomelaninu (upraveno podle Ito (2003)).

3.3.1.2 Regulace melanogeneze

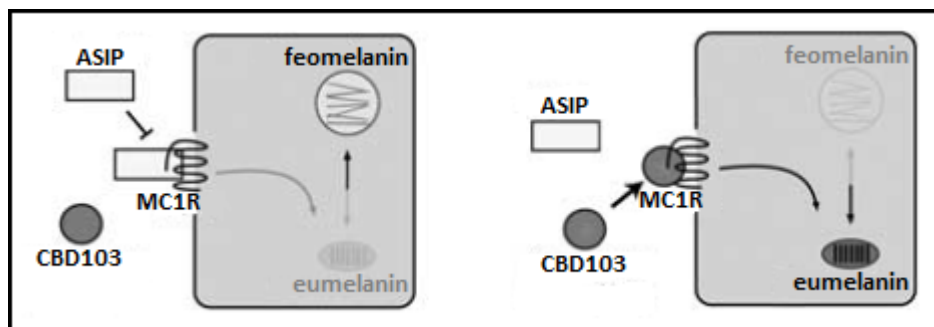
Barviva eumelanin a feomelanin jsou syntetizována v různých koncentracích (Watson et al. 2018). Poměr mezi jejich množstvím ovlivňují desítky až stovky genů (Xi et al 2012), které je možné rozdělit do dvou hlavních skupin. Do první skupiny se řadí geny působící na melanocyty (ovlivňují jejich vývoj, morfologii, buněčnou diferenciaci, proliferaci, migraci z neurální lišty a ukládání melanosómů do rostoucího chlupu a pokožky). Ve druhé skupině jsou geny působící přímo na syntézu jednotlivých pigmentů (Rieder et al. 2001; Ruvinsky & Sampson 2001). Ta může být řízena katalýzou reakcí vedoucích k tvorbě jednotlivých pigmentů nebo prostřednictvím transmembránového receptoru s heptahelikální strukturou na povrchu melanocytů, melanokortinového receptoru 1 (*MC1R*) (Ollmann et al. 1998; Barsch 2006). Aktivace *MC1R* vede k produkci eumelaninu, naopak jeho inhibice či ztráta funkce způsobuje přechod k syntéze feomelaninu (Robbins et al. 1993; Newton et al. 2000).

Aktivaci *MC1R* zajišťuje jeho agonista – melanocyty stimulující hormon (α MSH), který vzniká z proopiomelanokortinu (POMC) (Ruvinsky & Sampson 2001; Barsch 2006). Signál poskytovaný α MSH aktivuje adenylátcyklázu, která způsobuje zvýšení koncentrace cAMP v cytoplasmě (Takeuchi et al. 1989). Vysoká hladina cAMP uvádí v činnost proteinkinázu A, která stimuluje melanocyt k produkci eumelaninu (Ruvinsky & Sampson 2001).

Naopak inhibici *MC1R* způsobuje agouti signální protein (*ASIP*), který tak funguje jako antagonist. Principem je kompetice tohoto signálního proteinu s α MSH o obsazení vazebného místa melanokortinového receptoru 1, čímž dochází k jeho zablokování. Hladina cAMP v melanocytech je díky tomu snížena, což vede k feomelanogenezi (Kerns et al. 2007). Při jeho pravidelné produkci, melanocyty oscilují mezi eumelanogenezí a feomelanogenezí, čímž se

vytváří agouti vzor (Takeuchi et al. 1989; Lu et al. 1994). Tento vzor je charakteristický pásem feomelaninového pigmentu na chlupu, který má špičku a bázi s eumelaninovým pigmentem (Barsch 2006). *ASIP* je exprimován v dermálních papilách chlupových folikulů, nikoliv v melanocytech jako je tomu u *MC1R* (Takeuchi et al. 1989; Bultman et al. 1991; Candille et al. 2004). V různých oblastech těla bývají exprimovány dvě různé agouti izoformy (Kerns et al. 2004). První izoforma je vytvářena během rané fáze růstu chlupu, což způsobuje výše popsanou oscilaci a vznik pruhovaných chlupů po celém těle. Druhá izoforma je produkována během celé fáze růstu chlupu a projevuje se bledě žlutými chlupy na břišní krajině (Berryere et al. 2005).

U psů se na pigmentaci podílí také beta-defensin 103 (*CBD103*), který je znám díky svým antimikrobiálním vlastnostem (Ganz 2003; Candille et al. 2007). Podobně jako α MSH a *ASIP* je *CBD103* ligandem pro melanokortinový receptor 1. Při zvýšeném množství soutěží s α MSH o specifickou vazbu na *MC1R* a blokuje schopnost agouti signálního proteinu inhibovat *MC1R* signalizaci, což vede ke zvýšené produkci cAMP v melanocytech, a tedy k syntéze eumelaninu (Obrázek 5) (Kaelin et al. 2008).



Obrázek 5: Interakce mezi melanokortinovým receptorem (*MC1R*), agouti signálním proteinem (*ASIP*) a beta-defensinem 103 (*CBD103*) u psů a výsledná produkce jednoho z melaninů (upraveno podle Kaelin et al. (2008)).

Na procesu melanogeneze se dále podílí například tyrosináze příbuzný protein 1 (TYRP1) a dopachrom tautomeráza (DCT/TYRP2) katalyzující oxidaci dalších sloučenin (Obrázek 4), které přispívají k tvorbě eumelaninu (Barsch 2006). Produkci těchto a dalších látek důležitých pro tvorbu pigmentu ovlivňuje mnoho transkripčních faktorů. Patří mezi ně například transkripční faktor spojený s mikroftalmií (MITF), který je silný aktivátor transkripce genu *MC1R* (Steingrímsson et al. 2004; Seberg & Cornell 2017).

Výsledné zbarvení ovlivňuje i množství a modifikace granulí pigmentu v samotném chlupu (Dostál 2007). Chlup se skládá z dřene (medula), kůry (kortex) a tenké kutikuly (Willis 1989). Rozhoduje tedy například počet granulí v buňkách meduly a kortexu, uložení granulí ve vnitřní či vnější části meduly, ale i samotný druh pigmentu, tvar, velikost a rozvrstvení granulí po celé délce chlupu (Dostál 2007).

Syntéza pigmentu začíná u některých plemen dříve a u některých později. Může se měnit i množství produkovaného pigmentu během života jedince. Jsou známa plemena, u kterých se zbarvení během života mění. Je to například kerry blue teriér, který se narodí černý a stářím zesvětluje do mordé barvy, nebo český fousek, který se naopak narodí čistě bílý a postupem času prokvétá hnědými chlupy (Dostál 2007).

3.3.2 Geny ovlivňující zbarvení srsti u psů

Systém změny tvorby pigmentu (pigment-type switching) ovlivňují u psů tři geny. Je to gen pro melanokortinový receptor 1 (*MC1R*), gen pro agouti signální protein (*ASIP*) a gen pro beta-defensin 103 (*CBD103*) (Kaelin & Barsch 2013). Dále bylo identifikováno několik genů, které modifikují zbarvení vzniklé spolupůsobením tří výše zmíněných genů. Jsou to například geny kódující tyrosináze příbuzný protein 1 (*TYRP1*), proteazomální podjednotku beta 7 (*PSMB7*), transkripční faktor spojený s mikroftalmií (*MITF*), jaderný heterogenní ribonukleoprotein (*RALY*), premelanozomový protein 17 (*PMEL17/SILV*), melanofilin (*MLPH*) a další (Dreger et al. 2019; Weich et al. 2020).

3.3.2.1 Gen pro melanokortinový receptor 1 (*MC1R*)

Lokus E (Extension) pro melanokortinový receptor 1 exprimovaný melanocyty se u psů nachází na pátém chromozómu (CFA5) (Schmutz et al. 2001; Schmutz et al. 2003). Otevřený čtecí rámec *MC1R* je 951 bp dlouhý a je lokalizován v jediném exonu (Everst et al. 2000). Dominantní alely vedou k produkci funkčního proteinu způsobujícího syntézu hnědého až černého eumelaninu, naopak recesivní alely, které jsou zodpovědné za vznik nefunkčního proteinu, umožňují tvorbu žlutého až červeného feomelaninu (Robbins et al. 1993; Newton et al. 2000; Klungland & Våge 2003).

Původem nejstarší alela E, která je zodpovědná za vznik funkčního melanokortinového receptoru 1 a tudíž rovnoměrné rozložení pigmentu po celém těle, způsobuje u psů hnědou nebo černou barvu (Obrázek 6a) (Newton et al. 2000).

Další alela E^M, která je dominantní vůči ostatním alelám v tomto lokusu, vznikla substitucí adeninu za guanin (c.790A>G), čímž dochází k záměně methioninu za valin (M264V) a tvorbě eumelanistické masky. Eumelanistická maska je charakteristická tmavou barvou čenichu a může zasahovat až k očím a uším (Obrázek 6b). Tento fenotyp byl popsán u mnoha plemen včetně německého ovčáka, boxera, německé dogy, greyhonda a dalších. U plemen s černým, hnědým nebo modrým zbarvením nebo bílým čenichem není maska vidět (Schmutz et al. 2003). Barva masky může být černá, hnědá nebo šedá v závislosti na alelách v ostatních lokusech (Schmutz & Melekhovets 2012).

V roce 2010 byla identifikována alela E^G způsobující vznik světlé masky u chrtů. Lze tak pozorovat domino efekt u afghánského chrta a zbarvení grizzle u plemene saluki (Obrázek 6c). Příčinná mutace je záměna guaninu za thymin (c.233G>T) a vede k zabudování valinu do nově vznikajícího proteinu místo původního glycinu (G78V) (Dreger & Schmutz 2011).

U plemene anglický kokršpaněl byla díky sekvenování genu *MC1R* nalezena substituce (c.250G>A), která vede k nahrazení kyseliny asparagové za asparagin v transmembránové doméně melanokortinového receptoru 1. Alela s touto mutací byla nazvána E^H a vede ke snížené expresi eumelaninu a tím světlejší srsti s postupným přechodem barev od zlaté až po hnědou. Nejtmavší zbarvení lze pozorovat na vrchu hlavy a na hřbetu, kde se vytváří typické tmavé sedlo (Obrázek 6d) (Miklósi 2018; Genomia 2019; VetGen 2019).

První popsaná recesivní alela (e) v tomto genu vznikla substitucí cytosinu za thymin v pozici 916 (c.916C>T). Ta způsobuje vznik předčasného stop kodonu (R306ter). Místo pokračování tvorby funkčního proteinu je tedy syntéza zastavena, což vede ke vzniku žlutého zbarvení (Obrázek 6e) (Everst et al. 2000; Newton et al. 2000).

Nedávno byla identifikována recesivní alela e^2 , která způsobuje nestandardní krémové zbarvení australského honáckého psa. Tato alela je způsobena záměnou guaninu za cytosin v promotorové sekvenci genu *MC1R* 430 nukleotidů před start kodonem (c.-430G>C), což vede ke ztrátě vazebného místa pro MITF a tím k redukci tvorby mRNA vzniklé transkripcí genu pro melanokortinový receptor 1. Další recesivní alelou je e^3 , která vzniká delecí dvou nukleotidů v kódující sekvenci *MC1R* (c.816_817delCT). Předpokládá se, že tato mutace vede ke vzniku receptoru, kterému chybí poslední transmembránová doména. Tato změna receptoru vede u plemen aljašský a sibiřský husky k extrémně snížené tvorbě feomelaninu a tedy téměř bílému zbarvení (Obrázek 6f) (Dürig et al. 2018).

Gen má tedy mnoho alel s následující postupnou úplnou dominancí: $E^M > E^G > E > E^H > e$ (Schmutz 2018; Genomia 2019). Dvoudimenzionální struktura proteinu *MC1R* se znázorněnými pozicemi mutacemi je Přílohou 3.



Obrázek 6: Fenotypové projevy alel genu *MC1R*: a) velký knírač (E), b) německý boxer (E^M), c) saluki (E^G), d) anglický kokršpaněl (E^H), e) zlatý retrívr (E), f) sibiřský husky (e^3).

Zdroj: <https://www.pets4homes.co.uk/dog-breeds/>

3.3.2.2 Gen pro agouti signální protein (*ASIP*)

Zatímco *MC1R* je složen pouze z jednoho exonu, *ASIP* obsahuje 4 exony oddělené dlouhými introny (Lightner 2009). Jeho lokus (A) byl nalezen na 24. chromozómu (CFA24) (Kerns et al. 2004). Agouti protein je parakrinní signální molekula sekretovaná specializovanými buňkami sousedícími s melanocyty. Dominantní alely *MC1R* umožňují produkci obou melaninových barviv, přičemž výsledný fenotyp závisí na alelách *ASIP*. Alely vedoucí k tvorbě funkčního proteinu zajišťují produkci feomelaninu oproti alelám, které způsobují nefunkčnost agouti signálního proteinu a následkem je vznik eumelaninu (Schmutz et al. 2003). Distribuce eumelaninu a feomelaninu napříč tělem psa a podél jednotlivých chlupových os je určena hierarchií čtyř alel: $a^y > a^w > a^t > a$ (Dreger & Schmutz 2011).

Alela a^w (wolf sable – vlkošedá) je považována za nejstarší, jelikož se vyskytuje ve vysoké frekvenci u primitivních plemen, jako jsou například špicové a je shodná se sekvencí genu *ASIP* u vlka obecného (Berryere et al. 2005; Dreger & Schmutz 2011). Tuto alelu má fixovanou velmi málo plemen, což u domestikovaného psa naznačuje vysokou úroveň divergence v lokusu *A*. Fenotypový projev této alely je charakteristický chlupy s agouti vzorem, které se vyskytují na hlavě a zádech, zatímco ventrální část těla je tvořena převážně feomelaninovým zbarvením srsti (Obrázek 7a) (Schmutz & Berryere 2007; Dreger & Schmutz 2011).

Díky dvěma bodovým mutacím v exonu 4 genu *ASIP* vznikla alela a^y (yellow – žlutá). Mutace c.244G>T a c.248G>A (Oguro-Okano et al. 2011) vedou k záměně dvou aminokyselin (A82S) a (R83H) v polypeptidovém řetězci (Berryere et al. 2005). Výsledkem je pak žlutá barva ve formě sobolí (sable) (Obrázek 7b) nebo plavé (fawn) (Obrázek 7c), které se vyskytují u převážně většiny FCI plemen (Schmutz & Berryere 2007; Dreger & Schmutz 2011).

Třetí alela a^t (tan point – pálení) je pravděpodobně výsledkem staré mutace, jelikož se objevuje u velkého množství psů. Mohla tedy vzniknout ještě před tvorbou moderních plemen. Jediný rozdíl oproti alele a^w je v inzerci SINE (Short Interspersed Nuclear Element) do oblasti intronu 1 (exony jsou sekvenčně shodné), která je přibližně 239 bp dlouhá a jejíž orientace je vůči kódující sekvenci *ASIP* reverzní (Dreger & Schmutz 2011; Ciampolini et al. 2012). Sekvenčně je z 92,3 % shodná se SINEC_Cf sekvencí, která je v psím genomu velmi častá a známá tím, že způsobuje alternativní sestřih (Wang and Kirkness 2005; Dreger & Schmutz 2011). V sekvenci SINE přítomné v genu pro *ASIP* jsou časté SNP, bodové inserce a delece, které na výsledný fenotyp nemají vliv. Tento fenotyp nazývaný „black and tan“ neboli pálení (Obrázek 7d) je charakteristický feomelaninově zbarvenými distálními částmi končetin, stranami tlamy, malými flíčky nad každým okem, oblastmi na kaudálním povrchu hrudníku a na ventrálním povrchu ocasu. Zbytek srsti je eumelanisticky zbarvený. Druhý fenotyp, který tato alela způsobuje, je známý jako „saddle tan“ (sedlové pálení). Je velmi podobný fenotypu black and tan, přičemž jsou feomelaninové oblasti rozšířenější a eumelaninová pigmentace je omezena na oblast „sedla“ na hřbetě (Obrázek 7e) (Dreger & Schmutz 2011).

Poslední známá alela (a) způsobující recesivní černé zbarvení byla objevena u německých ovčáků a je charakteristická změnou guaninu za thymin v pozici 288 ve čtvrtém exonu, což má za následek nahrazení argininu za cystein (R96C) (Kerns et al. 2004), a přítomností SINE inserce (stejně jako u alely a^t) (Dreger & Schmutz 2011). Z toho vyplývá, že vznikla pravděpodobně z alely a^t jednou bodovou mutací (Kerns et al. 2004). Tuto hypotézu potvrzuje i fakt, že tato forma genu pro *ASIP* byla nalezena pouze u ovčáckých psů, špiců a plemene samojed. To může naznačovat, že se jedná o poměrně novou mutaci (Dreger & Schmutz 2011). Přítomnost cysteinu v pozici 96. aminokyseliny vede k narušení motivu ICK (inhibitor cystine knot) a to má za následek výhradní produkci eumelaninu a vznik černé srsti po celém těle (Obrázek 7f) (Kerns et al. 2004).



Obrázek 7: Fenotypové projevy alel genu *ASIP*: a) saarloosův vlčák (a^w), b) sobolí tibetský španěl (a^y – sobolí), c) plavý francouzský buldoček (a^y – plavá), d) dobrman (a^t – pálení), e) velšteriér (a^t – sedlové pálení), f) německý ovčák (a).

Zdroj: <https://www.pets4homes.co.uk/dog-breeds/>

3.3.2.3 Gen pro beta-defensin 103 (*CBD103*)

V roce 2007 byla pomocí vazebné analýzy prokázána přítomnost třetího genu, který ovlivňuje mechanismus zvaný „pigment-type switching“. Tento gen byl identifikován jako gen pro beta defensin 103 (*CBD103*), který se nachází na 16. chromozómu (CFA16). Jeho lokus dostal název K a u psů byly detekovány tři alely s následujícím pořadím dle dominance: $K^B > k^{br} > k^y$ (Candille et al. 2007; Schmutz & Berryere 2007).

Alela k^y (yellow – žlutá) je považována za původem nejstarší a je zodpovědná za tvorbu feomelaninu. Jedinci, kteří mají tuto alelu na obou chromozómech, mají fenotyp tvořen barvami od světle žluté až po kaštanovou (Obrázek 8a) (Schmutz & Berryere 2007).

Delece tří nukleotidů ve druhém exonu kódujících 23. aminokyselinu glycin vznikla alela K^B (black – černá). Tato delece má za následek zvýšenou produkci betadefensinu 103 a jeho vyšší afinitu k melanokortinovému receptoru 1, což způsobuje výhradní produkci eumelaninu a vznik fenotypu „dominantní černá“ (Obrázek 8b) (Kerns et al. 2007; Chen et al. 2009).

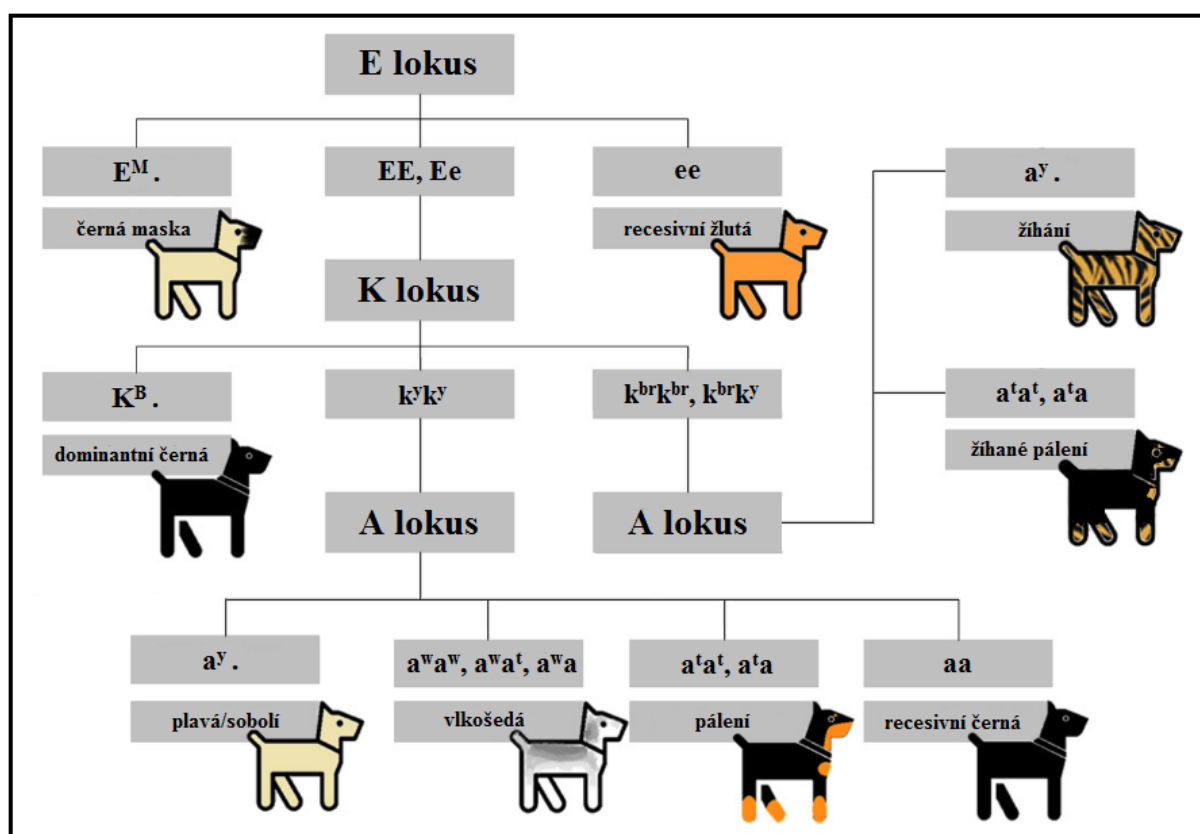
Poslední objevenou alelou je k^{br} (brindle – žihání). Tato alela způsobuje fenotyp projevující se eumelaninovými pruhy srsti na základním světlém zbarvení (Obrázek 8c) (Kerns et al. 2007). Žihání se vyskytuje například u plemen greyhound, vipet, německá doga, skotský jelení pes a dalších (Schmutz et al. 2003). Candille et al. (2009) se domnívá, že tato alela vznikla nealelickou homologní rekombinací mezi K^B a k^y chromozómy, která vedla k duplikaci oblasti betadefensinu 103 alespoň před tisíci lety. Tato duplikace je tedy tvořena jednou kopií K^B a jednou kopií k^y , což vede k expresi obou alel a vzniku pruhovaného zbarvení. Danou teorii potvrzuje další studie, ve které bylo nalezeno CNV (Copy Number Variation) v lokusu pro *CBD103* například u plemen boxer nebo akita inu (Chen et al. 2009). Kvůli své složité struktuře nebyla alela k^{br} nikdy spolehlivě popsána (Dreger et al. 2019).



Obrázek 8: Fenotypové projevy alel genu *CBD103*: a) belgický ovčák malinois (k^y), b) labradorský retrívér (K^B), c) vipet (k^{br}). Zdroj: <https://www.pets4homes.co.uk/dog-breeds/>

3.3.2.4 Interakce mezi jednotlivými alelami genů *MC1R*, *ASIP* a *CBD103*

Alely výše zmíněných genů spolu v různé míře interagují. Alely genu *MC1R* jsou epistatické vůči alelám v ostatních lokusech. Pokud má pes alespoň jednu dominantní alelu, díky níž se tvoří funkční melanokortinový receptor 1, může se projevit fenotyp alel K lokusu. Pro projev alel A lokusu je potřeba zároveň s dominantní alelou v E lokusu i jedna z recesivních alel v K lokusu (Kerns et al. 2007; Candille et al. 2009). Zjednodušené schéma interakcí alel tří výše zmíněných genů je na Obrázku 9.



Obrázek 9: Schéma interakce mezi alelami genů *MC1R*, *CBD103* a *ASIP* – genetická podstata vzniku různých typů zbarvení srsti psů. (Zdroj: Korec et al. (2019), upraveno podle Kerns et al. (2007) a Candille et al. (2009)). Tečka v genotypu znamená, že se na druhé pozici může vyskytovat jakákoliv alela daného lokusu.

3.4 Metody molekulární biologie

3.4.1 Izolace DNA

Izolace DNA spočívá v její extrakci z buněk a oddělení od ostatních buněčných složek. Cílem je získat DNA v nativním stavu v dostatečném množství a čistotě. Prvním krokem je lýze buněk, při které se naruší cytoplazmatická membrána například mechanicky či působením detergentů a enzymů. Dále je třeba přechistit vzniklou směs od RNA, proteinů a dalších látek. K tomu slouží komerčně dostupné enzymy, jako jsou RNázy (pro rozklad RNA) a proteinázy (pro rozklad proteinů). Dalším krokem je srážení DNA alkoholem, její imobilizace na kolonce a promytí od ostatních přítomných látek, které nosičem volně procházejí. Po přečištění lze DNA znovu rozpustit v pufru a uvolnit tak z kolonky (Doškař et al. 2010). Pro automatizaci byly vyvinuty komerčně dostupné kity, které umožňují snadnější a rychlejší izolaci DNA (Průša 1997).

Koncentrace a kvalita izolované DNA může být odhadnuta spektrofotometricky měřením absorbance roztoku při vlnových délkách 260 a 280 nm. Poměr těchto dvou absorbancí se pro DNA pohybuje okolo 1,8. Zároveň platí, že hodnota menší než 1,75 svědčí o kontaminaci bílkovinami. Následně lze ověřit vysokomolekularitu získané DNA elektroforetickou separací v agarózovém gelu (Průša 1997; Doškař et al. 2010).

3.4.2 Gelová elektroforéza

Principem gelové elektroforézy je separace DNA molekul při jejich pohybu v gelu na základě jejich molekulární hmotnosti – velikosti. Vysoce elektronegativní molekuly DNA v gelu migrují vlivem stejnosměrného elektrického proudu směrem k opačně nabitě elektrodě (anodě) (Průša 1997; Doškař et al. 2010). Gel je síť polymerních molekul s póry, v nichž se nukleové kyseliny pohybují. Menší molekuly prochází těmito póry rychleji než větší. Agarózová elektroforéza je nejefektivnější na separaci DNA fragmentů o velikosti 100 bp až 25 kb. Fragmenty menší jak 100 bp jsou lépe separovatelné pomocí polyakrylamidové elektroforézy (Lee et al. 2012).

Jednotlivé vzorky DNA se nanášejí do jamek, které jsou vytvořeny pomocí hřebínku před ztuhnutím gelu (Lee et al. 2012). Ten je uložen horizontálně v cele a ponořen do pufru (TE, TBE nebo TAE). Nanášení vzorků do jamek předchází jejich smíchání s látkou, která obsahuje barvu viditelného spektra (např. sacharóza) (Průša 1997). Tato barva zviditelní vzorek a dodá mu hustotu, díky čemuž se lépe nanášejí do jamky. Další výhodou přidání tohoto barviva spočívá v jeho standardním pohybu v gelu, což umožňuje odhadnout polohu separovaných DNA fragmentů (Lee et al. 2012).

Jelikož samotná DNA není v gelu pouhým okem vidět, využívá se vizualizace různými barvivy. Nejčastěji se používá fluorescenční barvivo ethidium bromid, který má schopnost vmezeřit se do molekuly DNA a pod ultrafialovým zářením emituje červené světlo (Doškař et al. 2010). Alternativou je například SYBR Green, Crystal Violet, Methyl Blue a jiné (Lee et al. 2012).

Velikost DNA fragmentu lze stanovit srovnáním jeho polohy s polohou hmotnostního standardu v gelu (Doškař et al. 2010). Tento standard nebo takzvaný žebřík obsahuje fragmenty o známé velikosti a používá se v každé řadě vzorků (Lee et al. 2012).

3.4.3 PCR

Polymerázovou řetězovou reakci (PCR – Polymerase chain reaction) vyvinul v roce 1983 biochemik Kary Banks Mullis (Mullis 1990). Jedná se o in vitro metodu, díky níž lze rychle a jednoduše nasyntetizovat velké množství specifického úseku DNA (Lorenz 2012).

PCR je založena na replikaci nukleových kyselin opakováním tří hlavních kroků. Prvním je zahřátí na 95 °C pro rozvolnění dvoušroubovice DNA na dvě samostatná vlákna (denaturace). Tím se sekvence zpřístupní primerům, které v další fázi po ochlazení hybridizují s komplementárním úsekem templátové DNA (anelace). Třetím krokem je prodlužování primerů DNA polymerázou (elongace), která přidává deoxynukleosidtrifosfáty na základě komplementarity jednotlivých bází za vzniku fosfodiesterové vazby. S každým takovým cyklem se množství daných molekul DNA zdvojuje, čímž dochází k jejich exponenciálnímu nárůstu. Vznikají tak molekuly dvouvláknové DNA, které jsou na svých 5' koncích ohraničeny sekvencí primerů (Mullis et al. 1986). Počet cyklů se obvykle pohybuje od 15 do 30 (Průša 1997). Samotná reakce probíhá v termocykleru, ve kterém se teplota mění automaticky dle konkrétního nastavitelného programu (Pantůček a Doškař 2010).

Templátová DNA může být přítomna v malé koncentraci a může pocházet v podstatě z jakýchkoliv zdrojů (z krve, bukových stěrů aj.), v čisté formě nebo ve směsi různých biologických materiálů (Mullis 1990). Nečistoty ve formě solí, detergentů a dalších látek nicméně působí na proces amplifikace negativně. Toto znečištění může být minimalizováno dostatečným naředěním vzorků (Pantůček a Doškař 2010). Cílová sekvence nemusí být známá, ale je potřeba znát sekvence úseků DNA, na které budou nasedat primery (Průša 1997). Důležitá je také úplná počáteční denaturace DNA, aby se primery mohly vázat specificky (Pantůček a Doškař 2010). Takto lze pomocí PCR amplifikovat fragmenty dlouhé až 40 kb, čehož se využívá například při sekvenování a mapování genomu (Cheng et al. 1994).

Přesnost a úspěšnost této metody je založena na navržení specifické sekvence primerů s přihlédnutím k sekvenci celého genomu studovaného organismu. Délka primerů bývá od 18 do 25 nukleotidů, přičemž obsah G a C je v rozmezí 40-60 %. Oba primery by měly mít přibližně stejnou teplotu tání, jejich sekvence by mezi sebou neměly být komplementární a neměly by tvořit sekundární struktury (vlásky) (Pantůček a Doškař 2010). Takto navržené primery se do reakce přidávají vždy v nadbytku (Mullis et al. 1986). Typická anelační teplota se pohybuje v rozmezí 55-68 °C po dobu 30-60 s (Pantůček a Doškař 2010). Zatímco nízká teplota snižuje specifitu, vysoká teplota snižuje výtěžnost (Průša 1997).

Syntézu nových vláken při 68-72 °C katalyzuje DNA polymeráza od 5' konce k 3' konci začínající od primerů. Během prvního cyklu pokračuje syntéza nového vlákna až za sledovanou sekvencí, ale následné cykly již amplifikují úsek mezi dvěma primery. Pokud je amplifikovaná sekvence bohatá na G a C, volí se vyšší elongační teplota (až 80 °C) (Průša 1997; Pantůček a Doškař 2010). Objev termostabilních polymeráz zjednodušil PCR a umožnil její automatizaci. Termostabilní DNA polymerázy (například *Taq – Thermus aquaticus*) vydrží vysoké teploty během denaturace, a tak je není třeba přidávat do reakce při každém cyklu. Mimo to zlepšují specifitu, výtěžnost a sensitivitu amplifikace (Saiki et al. 1988). Komerčně dostupné jsou mimo jiné i takzvané Hot Start DNA polymerázy, které eliminují nespecifické nasedání a prodlužování primerů při laboratorní teplotě tím, že jsou aktivní až při překročení určité teploty (většinou teplota denaturace – 94 °C) (Pantůček a Doškař 2010).

Reakce dále obsahuje pufr (například Tris-HCl) a dvojmocné hořečnaté kationty (Mullis et al. 1986). Pro získání nejlepších výsledků se musí koncentrace jednotlivých složek (hlavně Mg^{2+}) přizpůsobit konkrétní reakci (Lorenz 2012).

Jelikož je tato metoda velmi citlivá na kontaminaci, byla v laboratořích zavedena zvláštní opatření jako je použití jednorázových rukavic, UV světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše a systém negativní kontroly (Pantůček a Doškař 2010).

3.4.4 RFLP

RFLP neboli délkový polymorfismus restrikčních fragmentů je molekulárně genetická metoda založená na štěpení DNA restrikčními endonukleázami typu II na různě dlouhé fragmenty (Snustad & Simmons 2009). Tyto endonukleázy rozpoznávají určitou krátkou sekvenci DNA odpovídající palindromu a v ní nebo v její blízkosti DNA štěpí. Polymorfismus spočívá ve variabilitě výskytu těchto štěpných míst u různých molekul DNA (Průša 1997). Zmíněná štěpná místa mohou vznikat či zanikat například mutacemi DNA, proto může RFLP sloužit k detekci konkrétních mutací (Snustad & Simmons 2009).

Často se využívá modifikace této metody v podobě PCR-RFLP, kdy je pomocí PCR amplifikován jeden konkrétní fragment DNA, který je poté štěpen restrikční endonukleázou (Pantůček a Doškař 2005). K detekci štěpení slouží elektroforéza, při které se vzniklé fragmenty separují a následně porovnají s hmotnostním standardem (Snustad & Simmons 2009).

3.4.5 Sekvenování

Sekvenování DNA spočívá v určení pořadí jednotlivých nukleotidů, tedy stanovení její primární struktury. Díky tomu lze následně odvodit aminokyselinovou sekvenci proteinu, který tento úsek DNA kóduje a zjistit další informace například o regulaci tvorby dané bílkoviny nebo o přítomnosti a poloze mutací v sekvenci DNA (Pantůček 2010).

První generace sekvenování

Do takzvané první generace sekvenování patří Sangerova dideoxyterminační metoda (Metzker 2010). Ta je založena na schopnosti DNA polymerázy při PCR zabudovat do nově vznikajícího řetězce 2,3-dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP). Tyto nukleosidtrifosfáty postrádají hydroxylovou skupinu nejen na 2' ale i na 3' uhlíku, tudíž DNA polymeráza nemá kam připojovat další nukleosidtrifosfáty (dNTP) (Atkinson et al. 1969). Amplifikace probíhá v termocykleru a nejčastěji se využívá *Taq* DNA polymerázy, jelikož je schopna pracovat při vysoké teplotě a nízké koncentraci solí, což pomáhá udržovat DNA v denaturovaném stavu, která tak netvoří špatně sekvenovatelné sekundární struktury (vlásenky) (Průša 1997; Innis et al. 1988). Při sekvenaci vzniká směs různě dlouhých fragmentů, které mají sekvenčně stejný začátek a končí vždy v jiné pozici jiným ddNTP (Sanger et al. 1977). Detekce těchto terminujících ddNTP je umožněna díky jejich fluorescenčnímu značení například při kapilární elektroforéze (Obrázek 10a) (Metzker 2010). Vyhodnocování dnes probíhá již na počítačích pomocí specializovaných softwarů (Průša 1997). Sangerova metoda dominovala téměř dvě desetiletí, během kterých byla automatizována a je stále využívána pro sekvenování PCR produktů (Mardis 2008; Metzker, 2010), přičemž délka čtení je přibližně 700 bází (Pettersson et al. 2009).

Druhá generace sekvenování

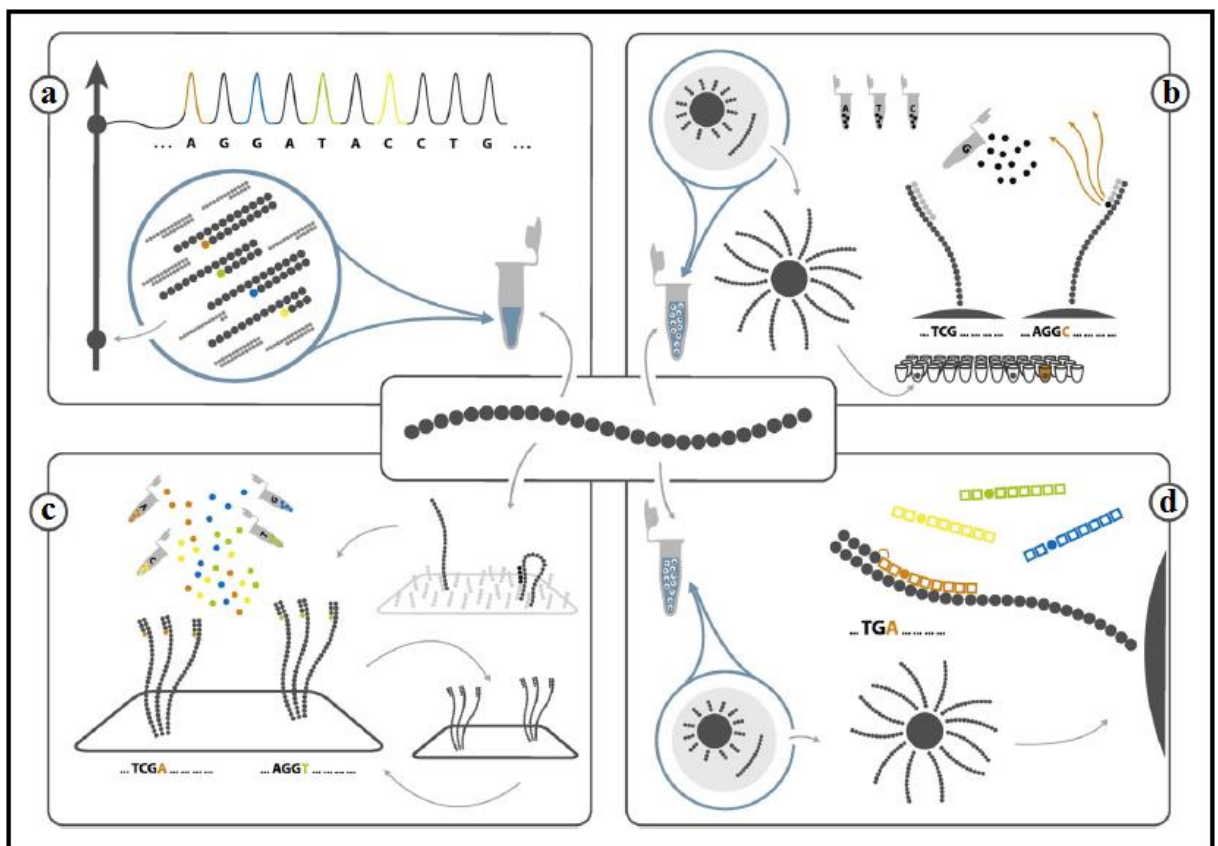
Metody druhé generace sekvenování mají společný postup: přípravu knihovny, sekvenování, zarovnání a sestavení sekvence. Předností těchto technik je relativně levná produkce obrovského objemu dat (Metzker 2010). Z toho vyplývá nevýhoda těchto metod, která spočívá ve vysoké náročnosti na zpracování a ukládání dat (Ari & Arikan, 2016). Mezi druhou generaci sekvenování se řadí platformy jako je Roche 454 Genome Sequencer, Illumina Genome Analyzer, Life Technologies SOLiD System a další (Zhou et al. 2010).

Pyrosekvenování (Roche 454) bylo první komerčně dostupnou metodou sekvenování, které nevyužívalo ddNTP. Metoda je založena na fragmentaci molekul DNA na krátké úseky o různé délce, které jsou následně imobilizovány na magnetických kuličkách (na každé kuličce je ideálně jeden fragment) (Margulies et al. 2005). Následuje emulzní PCR, jejíž princip spočívá v amplifikaci jednoho vlákna DNA v kapce vody, která je obklopena olejem, což vytváří ohraničené prostředí tzv. mikroreaktoru (Dressman et al. 2003). Kuličky se pak po jedné umístí do jamek na pikotitrační destičce, kde probíhají jednotlivé pyrosekvenační reakce. Do jamek se přidávají sekvenační primery spolu s DNA polymerázou, sulfurylázou, luciferázou a luciferinem. Deoxynukleosidtrifosfáty jsou jednotlivě po sobě aplikovány na destičku a jejich zabudování do nově vznikajícího vlákna způsobí uvolnění pyrofosfátu, který je sulfurylázou konvertován na adenosintrifosfát (ATP). Díky přítomnosti ATP může luciferáza oxidovat luciferin na oxyluciferin, který vydává záření (Obrázek 10b). Emise světla a jeho intenzita je detekována CCD kamerou. Po každém cyklu jsou dNTP degradovány apyrázou (Margulies et al. 2005) a celý cyklus může začít nanovo. Výhodou této metody byla možnost čtení stovek tisíc sekvencí v reálném čase s délkou čtení cca 400 bází, což umožnilo osekvenování celkem 500 Mbp z jedné pikotitrační destičky v každém cyklu (Pettersson et al. 2009). Další výhodou sekvenování pomocí Roche 454 byla rychlost (od začátku až do konce trvala sekvenace pouhých 10 hodin). Jedním z nedostatků byla relativně vysoká chybovost u sekvenování homopolymerů delších než 6 bází (Liu et al. 2012). Další nevýhodou byla vysoká cena na osekvenovanou bázi (Rothberg and Leamon, 2008).

Platforma, která v současné době dominuje na trhu, byla vyvinuta firmou Solexa, jež později odkoupila firma Illumina, dle níž nese metoda název. Postup spočívá v tvorbě stejně dlouhých fragmentů DNA, na které se připojí specifické oligonukleotidy (adaptéry), na každý konec jiný. Díky tomu mohou hybridizovat s komplementárními oligonukleotidy, které jsou připevněny na opticky transparentní reakční cele („flow cell“). Následuje amplifikace, kde jako primer slouží právě tyto oligonukleotidy. Po denuraci se templátové vlákno DNA oddělí a zůstane pouze nově nasyntetizované vlákno DNA kovalentně připojené k povrchu reakční cely. Na té jsou též oligonukleotidy komplementární s druhým adaptorem na konci DNA vlákna, které se ohne a hybridizuje s ním. To je základ pro takzvanou můstkovou amplifikaci (Ari & Arikan 2016). Na cele se tak vytvoří miliony shluků sestávajících z tisíců stejných fragmentů. Po odstranění jednoho typu fragmentů se přidá DNA polymeráza, nukleotidy s blokující skupinou a fluoroforem na 3' konci a první (forward) sekvenační primery. DNA polymeráza připojí vhodný nukleotid, nenavázané nukleotidy se odmyjí, dojde k emisi záření a signály jednotlivých kolonií se detekují CCD kamerou (Obrázek 10c). Následuje odštěpení blokující skupiny na 3' konci navázaného nukleotidu a promytí fluoroforu, prodloužení vlákna o jeden nukleotid a detekce signálu se opakuje. Nakonec jsou nově syntetizované řetězce fragmentů

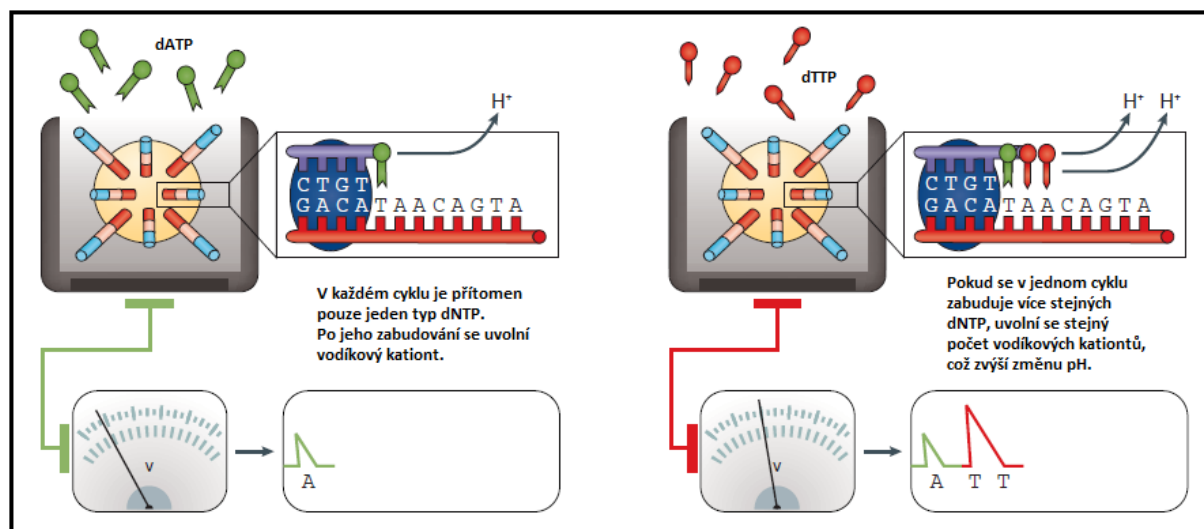
chemicky odstraněny a sekvenační reakce začíná nasednutím reverzního primeru (druhý sekvenční primer) a znovu následují výše popsané kroky (Pettersson et al. 2009; Ari & Arikan 2016). Ve srovnání se Sangerovým sekvenováním je systém Illumina schopen produkovat více dat za kratší dobu a má nižší náklady na osekvenování jedné báze. Míra chybovosti (hlavně substitucí) je však vyšší (Metzker 2010; Ari & Arikan 2016). V porovnání s Roche 454 vykazuje lepší výkon při sekvenování homopolymerních sekvencí, jelikož je díky blokujícím skupinám možné zabudování pouze jednoho nukleotidu v jedné reakci (Mardis 2013).

Další metodou je SOLiD systém od Life Technologies, který se dnes již nevyužívá. Konstrukce knihovny je obdobná té pro pyrosekvenaci. K amplifikaci jednotlivých fragmentů se též používá emulzní PCR a vzniklé kuličky jsou imobilizovány na skleněném povrchu (Liu et al. 2012). Sekvenační reakce spočívá v připojování sond DNA ligázou. Sondy jsou sekvence o osmi nukleotidech, z nichž první dva jsou určeny k hybridizaci s templátem a jsou fluorescenčně značené. Ostatní jsou degenerované (mohou vázat jakoukoli sekvenci DNA), přičemž poslední 3 obsahují fluorescenční barvivo pro detekci prvních dvou bází (na Obrázku 10d jsou degenerované nukleotidy symbolizovány čtverečky a nedegenerované kolečky). Díky kombinaci těchto fluorescenčních značení lze detekovat všech 16 možných dinukleotidů. Po zaznamenání signálu jsou nehybridizované sondy odmyty, poslední tři připojené báze odstěpeny a proces ligace se opakuje. Pro vyplnění nedetekovaných mezer začne v dalším kole sekvenace s posunem o jednu bázi. Takto je po pěti kolech každá báze přečtena dvakrát, což zvyšuje přesnost sekvenace (Ari & Arikan 2016).



Obrázek 10: Zjednodušené schéma a) Sangerova sekvenování, b) Roche 454 pyrosekvenování, c) Illumina (Solexa) a d) SOLiD sekvenování (upraveno podle Pettersson et al. (2009)).

Mezi další komerčně dostupnou platformu sekvenování patří Ion Torrent (další produkt Life Technologies). Začíná emulzní PCR a od ostatních metod se liší detekcí jednotlivých nukleotidů na základě rozdílu v pH. Tento rozdíl vzniká uvolňováním protonů (H^+ iontů) během zabudování nukleotidu a lze ho zjistit pomocí detektoru umístěného na polovodiči s jamkami (Obrázek 11). Každá jamka má svůj vlastní detektor a je v ní pouze jedna molekula DNA (Rothgerg et al. 2011). Hlavní nevýhody tohoto systému jsou problémy se čtením homopolymerů, jelikož je změna pH změřená senzorem nedokonale úměrná počtu detekovaných nukleotidů (Goodwin et al. 2016). Mezi výhody patří relativně delší a rychlejší čtení a levnější cena, než poskytují jiné platformy (Liu et al. 2012).



Obrázek 11: Zjednodušené schéma metody Ion Torrent (upraveno dle Goodwin et al. (2016)).

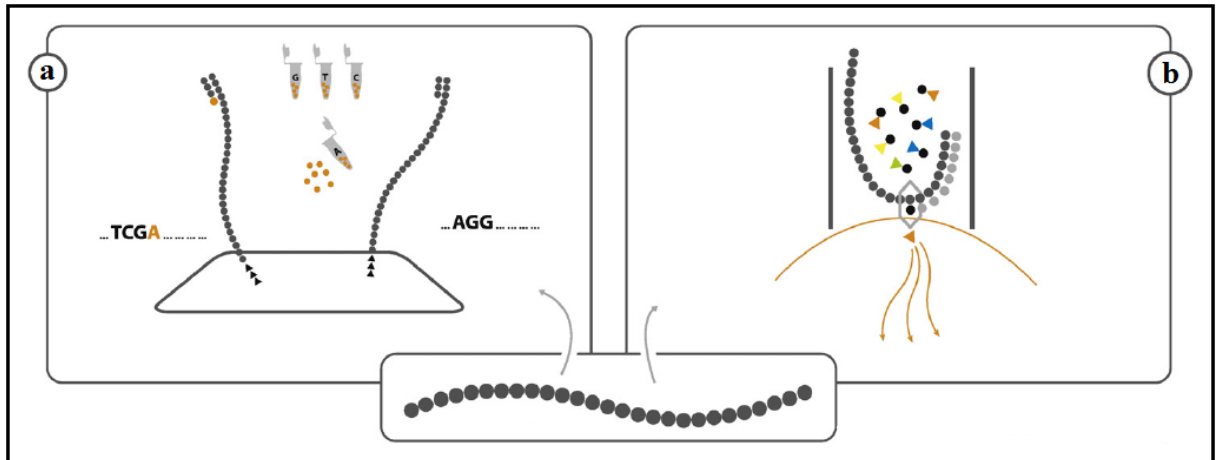
Třetí generace sekvenování

Technologie třetí generace vznikly za účelem snížení ceny a zjednodušení celého procesu. To je dosaženo sekvenováním jedné jediné molekuly DNA (Metzker 2010).

Za první komerčně dostupnou technologii spadající do této skupiny se považuje tSMS (true single molecule sequencing) společnosti Helicos Biosciences. Funguje na stejném principu jako Illumina, ale postup neobsahuje krok můstkové amplifikace (Heather and Chain 2016). K fragmentům se připojí poly-A adaptéry, které hybridizují s poly-T oligonukleotidy připojené na skleněné cele. Následně se přidávají fluorescenční nukleotidy se zablockovaným 3' koncem, díky čemuž zaznamenává vysoce citlivá CCD kamera zabudování každého nukleotidu zvlášť (Obrázek 12a) (Kulski 2016). I když byla tato metoda relativně pomalá a nákladná, byla to první technologie, která umožnila sekvenování neamplifikované DNA a tím zamezila vzniku všem přidruženým zkreslením a chybám (Schadt et al. 2010).

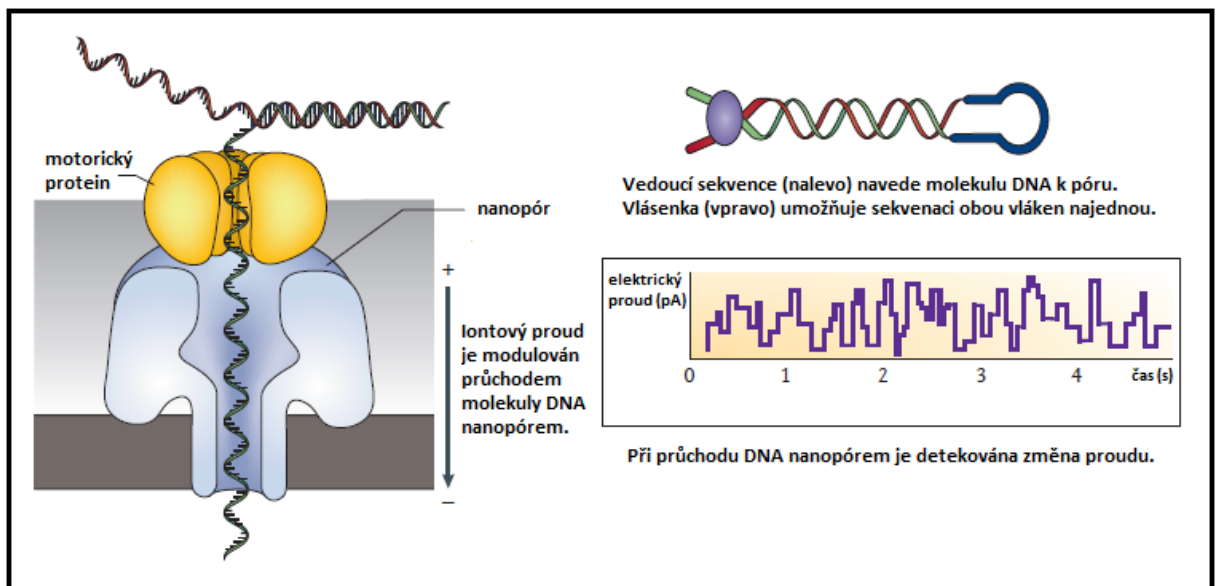
Další velmi úspěšnou metodou třetí generace je SMRT (single molecule real time) vyvinutá společností Pacific Biosciences (Heather and Chain 2016). Funguje na principu destičky s nanojamkami, na jejichž dně je imobilizována DNA polymeráza. V každé jamce je sekvenována jedna molekula DNA. Záblesky vznikající na dně jamky při zabudování fluorescenčních nukleotidů jsou snímány CCD kamerou (Obrázek 12b). Tento přístup nevyžaduje promývání nukleotidů po každém čtení, čímž se zrychluje jejich inkorporace do

nově vznikajícího vlákna a zlepšuje se kvalita čtené sekvence (Shokralla et al. 2012). Primární analýza dat probíhá v reálném čase pomocí softwaru SMRT Analysis (Kulski 2016).



Obrázek 12: Schéma metod a) tSMS a b) SMRT (upraveno podle Pettersson et al. (2009)).

V roce 2014 byl firmou Oxford Nanopore Technologies představen nový přenosný sekvenátor MinION, který má rozměry mobilního telefonu a s počítačem komunikuje USB portem (Lu et al. 2016). Princip této technologie spočívá v protažení molekuly DNA iontovým kanálem ve fosfolipidové membráně a detekci změn ve struktuře pórů při průchodu jednotlivých nukleotidů (Obrázek 13) (Goodwin et al. 2015). Nevýhodou je velká chybovost způsobená především rozdílnou aktivitou jednotlivých kanálů, což lze ale napravit opakovaným čtením (Lu et al. 2016). Nespornou výhodou je sekvenace v reálném čase bez amplifikace a modifikace vzorku a dlouhé čtení (až 10 kb) (Chhapekar et al. 2016). Proto bývá sekvenování pomocí nanopórů některými autory označováno jako metoda čtvrté generace sekvenování (Ku & Roukos 2013; Chhapekar et al. 2016; Yin et al. 2019).



Obrázek 13: Sekvenování pomocí přístroje MinION. Motorický protein (žlutě) protahuje jedno vlákno DNA do nanopóru (šedě), což způsobuje změnu iontového proudu. Tyto změny jsou v průběhu času zaznamenávány (fialová křivka) (upraveno podle Goodwin et al. (2016)).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Hodnocení jedinci

Do hodnocení bylo vybráno 125 jedinců plemene holandský ovčák, z nichž 3 byli dlouhostrstí, 6 hrubosrstých a zbytek tvořili krátkosrstí. Jedinci pocházeli převážně z České republiky, dále pak ze Slovenska, Německa, Švýcarska a Polska. Sledovaní psi byli všech věkových kategorií a obě pohlaví byla rovnoměrně zastoupena.

4.1.2 Odběr DNA

Jednotlivé vzorky DNA byly odebrány neinvazivní metodou – stěrem z bukální sliznice. Všichni chovatelé dostali návod na postup při odběru, aby bylo zamezeno kontaminaci (Příloha 4). Pro stěr bukální sliznice sloužil speciální kartáček k tomu určený (Cyto-brush). Po odběru a oschnutí od slin byl kartáček uzavřen v papírové obálce, dokud nebyla provedena vlastní izolace DNA.

4.1.3 Izolace DNA

Izolace DNA z odebraných vzorků probíhala pomocí komerčně dostupného kitu NucleoSpin Tissue XS od firmy Macherey-Nagel. Dle přiloženého návodu byl dodržen postup pro izolaci DNA z bukálních stěrů. Každá takto izolovaná DNA následně prošla kvantitativním a kvalitativním ohodnocením. Koncentrace vzorku byla zjištěna spektrofotometrem NanoPhotometer (Implen). Vysokomolekularita byla ověřena pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu.

4.2 Použité primery

Primery využití při řešení diplomové práce jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled použitých primerů

název	sekvence (5' - 3')	gen	zdroj
MC1R-F	GGAGGGTGCAGTGGGTTCT	<i>MC1R</i>	navrženy při řešení diplomové práce
MC1R -R	AGTCACATGGGTATCAATCACCA		
MC1R_B-R	AGGTGCCATTGAGAGAGCC		
ASIP_SINE-F	GGACAGTTTCACCGAATATAGGA	<i>ASIP</i>	navrženy při řešení diplomové práce
ASIP_SINE-R	TCAGGAAGATGGTCAGGAAGA		
ASIP_ex4-F	GATGTCTGGTCTGGAGCCTC	<i>ASIP</i>	Berryere et al. 2005
ASIP_ex4-R	TCAGCATCTGGGACTGAGAACGC		
CBD103_ex2-F	TCTTTGCAGGAAATGGGGGA	<i>CBD103</i>	navrženy při řešení diplomové práce
CBD103_ex2-R	TACAACGCTCCCATCCATT		
CBD103_ex2del-F	CTTTGCAGGAAATGGGATTAT		
CBD103_ex2del-R	CAGGAGGCATTTTCACACTT		

Primery MC1R, MC1R_B, ASIP_SINE, CBD103_ex2 a CBD103_ex2del byly navrženy v programu Primer3 Input v4.1.0 (Untergasser et al. 2012), který je dostupný na adrese <http://primer3.ut.ee>. Kvalita a specifita všech dvojic primerů byla ověřena pomocí softwarů OligoEvaluator dostupné na stránkách Sigma-Aldrich (<http://www.oligoevaluator.com>) a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Zhang et al. 2000).

4.3 Analýza genu pro melanokortinový receptor 1 (*MC1R*)

Gen *MC1R* je typický výskytem většího počtu mutací, proto bylo k jejich detekci zvoleno sekvenování pomocí Sangerovy dideoxyterminační metody. K tomu byla uzpůsobena i samotná amplifikace.

4.3.1 Amplifikace genu *MC1R*

Pro navržení vhodných primerů k hodnocení variability genu *MC1R* byly analyzovány sekvence NC_006587.3 a NM_001014282.2 z databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information) dostupné na adrese <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Pozice primerů a známých mutací ve vybrané sekvenci jsou uvedeny v Příloze 5.

Reakční směs o celkovém objemu 10 μ l obsahovala 10 ng izolované DNA, 0,2 μ M MC1R-F primer, 0,2 μ M MC1R-R primer a 1 \times Multiplex PCR Master Mix Plus (Qiagen). Každý vzorek byl amplifikován ve dvou kopiích v termocykleru C-1000 Touch (Bio-Rad) nebo T-gradient (Biometra). Teplotní profil amplifikace uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2: Program PCR pro amplifikaci

fáze PCR	teplota (°C)	čas (min)	počet cyklů
predenaturace	95	10	1
denaturace	95	0,5	
anelace	60	1,5	35
elongace	72	1	
postelongace	72	10	1

4.3.2 Sekvenace genu *MC1R*

Pro sekvenování byly použity fragmenty separované v 1% agarózovém gelu o předpokládané délce 1500 bp, jejichž velikost byla odhadnuta pomocí s hmotnostního standardu GeneRuler 100 bp (Thermo Fisher Scientific). Tyto fragmenty byly následně z gelu izolovány pomocí kitu Gene Jet Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific) dle manuálu výrobce a kvantifikovány pomocí UV spektrometrie. Výsledná koncentrace DNA byla upravena dle požadavků poskytovatele sekvenačních služeb (Eurofins Genomics Germany GmbH). Součástí sekvenační reakční směsi byl vždy jeden z primerů MC1R-F, MC1R-R nebo MC1R_B-R o 2,5 μ M koncentraci.

Analýza sekvencí byla provedena v softwarech BioEdit v7.2.5 (Hall 1999), MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar 2004) dostupného na adrese <https://www.ebi.ac.uk>, Sequencing Analysis Software v5.2 (Thermo Fisher Scientific) a Variant Reporter v1.1 (Thermo Fisher Scientific).

4.4 Identifikace mutací genu pro agouti signální protein (*ASIP*)

Jelikož byly u plemene holandský ovčák pozorovány pouze barvy žlutá, černě žíhaná a žíhané pálení, byly k detekci zvoleny alely a^y , a^w a a^t . Alela způsobující recesivní černou barvu srsti po celém těle psa (a) nebyla detekována, protože se u holandského ovčáka toto zbarvení nevyskytuje. Jelikož je alela a^w považována za původní, tj. bez mutací, alela a^t vznikla inzercí SINE v intronu 1 a alela a^y je charakteristická dvěma mutacemi v exonu 4, byly k analýze vybrány právě oblasti intronu 1 a exonu 4 genu *ASIP*.

4.4.1 Analýza výskytu SINE inserce

Jelikož má SINE inserce v intronu 1 velikost přibližně 239 bp, byla k detekci jejího výskytu použita agarózová elektroforéza, pomocí níž lze spolehlivě rozlišit amplifikované fragmenty dle jejich velikosti. Tomu byla uzpůsobena i amplifikace vybrané oblasti.

4.4.1.1 Amplifikace oblasti intronu 1

Pomocí sekvence publikované v databázi NCBI pod číslem NC_006606.3 dle Dreger & Schmutz (2011) a Ciampolini et al. (2012), byla zjištěna sekvence SINE inserce a detekována oblast, ve které se nachází. Primery byly navrženy, aby dané místo ohraničovaly (Příloha 6).

Složení reakční směsi o celkovém objemu 10 μ l bylo následující: 5 ng DNA, 0,2 μ M ASIP_SINE-F primer, 0,2 μ M ASIP_SINE-R primer a 1 \times Multiplex PCR Master Mix Plus (Qiagen). Vzorokly byly amplifikovány v termocykleru C-1000 (Bio-Rad) nebo T-gradient (Biometra). Podmínky amplifikace jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Program PCR pro amplifikaci

fáze PCR	teplota (°C)	čas (min)	počet cyklů
predenaturace	95	10	1
denaturace	95	0,5	
anelace	60	1,5	35
elongace	72	1	
postelongace	72	10	1

Specifita a kvalita amplifikace byla u několika vybraných jedinců ověřena Sangerovou dideoxyterminační metodou dle postupu uvedeného v podkapitole 4.3.2. a získané sekvence byly porovnány s referenční sekvencí NC_006606.3 pomocí softwaru MUSCLE (Edgar 2004).

4.4.1.2 Detekce výskytu SINE inserce

Elektroforetická separace amplifikovaných fragmentů probíhala 40 minut v 1,5% agarózovém gelu. Následně byla pozice fragmentů porovnána s hmotnostním standardem GeneRuler 100 bp (Thermo Fisher Scientific). U jedinců s alelou a^t vznikal díky SINE inzerci amplikon dlouhý 478 bp. Bez SINE inserce (alely a^w a a^y) byl amplifikován fragment o velikosti cca 239 bp.

4.4.2 Analýza výskytu mutace c.248G>A

4.4.2.1 Amplifikace oblasti exonu 4

Analýzou sekvence číslo NC_006606.3 z databáze NCBI a pomocí programu Primer3 Input 4.1.0 (Untergasser et al. 2012) bylo ověřeno, že primery ASIP_ex4-F a ASIP_ex4-R ohraničují část exonu 4 se známými mutacemi. Jejich pozice je označena v Příloze 7.

V reakční směsi o celkovém objemu 10 µl se nacházely následující komponenty: 5 ng DNA, 0,2 µM ASIP_ex4-F primer, 0,2 µM ASIP_ex4-R primer a 1× Multiplex PCR Master Mix Plus (Qiagen). Amplifikace probíhala v termocykleru C-1000 (Bio-Rad) nebo T-gradient (Biometra) a její podmínky uvedené v Tabulce 4 byly optimalizovány pro specifičnost primerů a zároveň vysokou výtěžnost reakce.

Tabulka 4: Program PCR pro amplifikaci

fáze PCR	teplota (°C)	čas (min)	počet cyklů
predenaturace	95	10	1
denaturace	95	0,5	
anelace	64	1,5	35
elongace	72	1	
postelongace	72	10	1

Amplifikací byl tvořen fragment o délce 285 bp, který byl u několika vybraných jedinců osekvenován a porovnán s referenční sekvencí NC_006606.3 pomocí softwaru MUSCLE (Edgar 2004).

4.4.2.2 Detekce výskytu mutace c.248G>A

Analýzou sekvence ampliconu pomocí softwaru NEBcutter v2.0 (Vincze et al. 2003) dostupného na adrese <http://nc2.neb.com> bylo detekováno restrikční místo pro enzym BtsCI, který rozpoznává sekvenci v pozici mutace G248A (alela a^y), poblíž kterého štěpí obě vlákna DNA. Rozpoznávací sekvence tohoto enzymu je označena v Příloze 8.

Restrikční štěpení probíhalo v termocykleru T-gradient (Biometra) v celkovém objemu 10 µl se složením: 5 µl amplifikovaného produktu, 1 µl NEBuffer CutSmart (New England Biolabs) a 2 U enzymu BtsC1 (New England Biolabs). Podmínky reakce jsou v Tabulce 5.

Tabulka 5: Program pro restrikční štěpení

fáze reakce	teplota (°C)	čas (min)
štěpení	60	15
denaturace	80	20

Fragmenty byly po štěpení elektroforeticky separovány 40 minut v 2% agarózovém gelu a jejich velikost určena pomocí hmotnostního standardu GeneRuler 100 bp (Thermo Fisher Scientific). Výskyt mutace způsobuje tvorbu restrikčního místa a štěpením vznikají fragmenty o délkách 150 a 135 bp. Nemutovaná alela naopak restrikční místo neobsahuje, a proto fragment zůstává 285 bp dlouhý.

4.5 Identifikace mutací genu pro betadefensin 103 (*CBD103*)

U plemene holandský ovčák se vyskytuje černě pruhované zbarvení, které je způsobeno alelou k^{br} . Tato alela je dle Candille et al. (2009) charakteristická výskytem jedné kopie alely K^B a jedné kopie alely k^y na jednom chromozómu zároveň. Jelikož se od sebe tyto dvě alely liší delecí tří nukleotidů v exonu 2, byla jako metoda jejich detekce zvolena amplifikace pomocí dvou párů primerů, které ji spolehlivě odliší. K tomu byla použita sekvence ENSCAFG00000032247 z databáze Ensembl dostupné na adrese <http://www.ensembl.org/>.

4.5.1 Analýza oblasti exonu 2

4.5.1.1 Amplifikace odlišných sekvencí alel K^B a k^y

První dvojice primerů *CBD103_ex2* byla navržena tak, aby F-primer nasedal na sekvenci bez delecce, která obsahuje trojici nukleotidů GGA. F-primer z druhé dvojice primerů *CBD103_ex2* měl naopak sekvenci komplementární k té, která je typická delecí zmíněných nukleotidů. Všechny čtyři primery byly navrženy v programu Primer3 Input 4.1.0 (Untergasser et al. 2012). Pozice primerů *CBD103_ex2* je uvedena v Příloze 9 a primerů *CBD103_ex2del* v Příloze 10.

Oba typy sekvencí exonu 2 genu *CBD103* byly amplifikovány se shodným postupem. Složení reakční směsi o celkovém objemu 10 μ l bylo následující: 5 ng DNA, 0,2 μ M F primer, 0,2 μ M R primer a 1 \times Multiplex PCR Master Mix Plus (Qiagen). Amplifikace probíhala v termocykleru C-1000 (Bio-Rad) nebo T-gradient (Biometra) a její podmínky jsou uvedené v Tabulce 6.

Tabulka 6: Program PCR pro amplifikaci

fáze PCR	teplota (°C)	čas (min)	počet cyklů
predenaturace	95	10	1
denaturace	95	0,5	
anelace	60	1,5	35
elongace	72	1	
postelongace	72	10	1

Specifita dvojic navržených primerů byla ověřena sekvenací obou amplifikovaných fragmentů u několika vybraných jedinců.

4.5.1.2 Detekce výskytu alel K^B a k^y

Jelikož měly výše zmíněné amplifikace probíhat pouze u jedinců s alelou k^y (amplifikace s primery *CBD103_ex2*) nebo u jedinců s alelou K^B (amplifikace s primery *CBD103_ex2del*), byla k jejich detekci zvolena elektroforetická separace v 1,5% agarózovém gelu. Separované fragmenty byly následně porovnány s hmotnostním standardem GeneRuler 100 bp (Thermo Fisher Scientific). Při použití primerů *CBD103_ex2* vznikal amplikon o velikosti 186 bp. Pokud byly v reakční směsi primery *CBD103_ex2del*, tvořily se fragmenty dlouhé 202 bp.

4.6 Statistické vyhodnocení výsledků

4.6.1 Hodnocení variability alel sledovaných genů v populaci

Variabilita populace byla vyhodnocena v programu Cervus v3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). S jeho pomocí byly vypočítány frekvence alel a výsledných genotypů. Dále byla stanovena hodnota očekávané (H_E) a pozorované (H_O) heterozygotnosti. Očekávaná heterozygotnost je teoretickou frekvencí heterozygotů, která v populaci nastane při dosažení rovnovážného stavu dle Hardy-Weinbergerova zákona.

4.6.2 Statistická analýza vlivu mutací genu *MC1R* na změnu fenotypu

Pro hodnocení vztahu mezi distribucí detekovaných mutací a nestandardním zbarvením bez žihání byla zvolena metoda logistické regrese. Byly vytvořeny dva modely. První z nich zohlednil vliv genotypu jedinců na výsledné zbarvení. U druhého pak byly vzaty v úvahu jejich haplotypy. Výhoda těchto modelů spočívá v možnosti exponenciální transformace regresních koeficientů na poměry šancí. V tomto případě byl tedy stanoven poměr šance vzniku nestandardního zbarvení v souvislosti s genotypem nebo haplotypem, podle toho, který model byl použit. Oba modely byly vytvořeny a vyhodnoceny v programu R v3.6.2 (R Core Team 2019). Regresní rovnice měla tvar:

$$\text{logit}(Y) = \alpha + \beta_1 X_1 \quad (1)$$

kde α je intercept (výchozí hodnota), oproti kterému jsou haplotypy/genotypy porovnávány a β je regresní koeficient. Logit (Y) je přirozený logaritmus šance, že má daný genotyp nebo haplotyp vliv na výsledný fenotyp. Jeho exponenciální transformací lze získat tuto rovnici:

$$\text{šance}(Y = 1) = \exp[\text{logit}(Y)] = \exp(\alpha + \beta_1 X_1) \quad (2)$$

kde šance ($Y = 1$) je šance, že má daný genotyp/haplotyp vliv na výsledný fenotyp. Pravděpodobnost lze spočítat jako poměr šancí:

$$P(Y = 1) = \text{šance}(Y = 1) / [1 + \text{šance}(Y = 1)] = \frac{\exp(\alpha + \beta_1 X_1)}{1 + \exp(\alpha + \beta_1 X_1)} \quad (3)$$

kde $P(Y = 1)$ je pravděpodobnost, že má daný genotyp/haplotyp vliv na výsledný fenotyp.

Výsledky byly tedy formulovány pomocí šancí a výsledná hodnota udávala, kolikrát větší šanci má jedinec s daným genotypem/haplotypem, že se u něj v průběhu života bude vytrácet žihání.

5 Výsledky

5.1 Izolace DNA

Po izolaci byla pomocí UV spektrofotometru NanoPhotometer (Implen) určena koncentrace DNA, jejíž průměrná hodnota byla 95 ng/μl. Spektrofotometr zobrazil i poměr absorbancí A_{260}/A_{280} , jenž se pohyboval mezi hodnotami 1,8 až 2,1, což je typické pro čistou DNA. Vysokomolekularita izolované DNA byla ověřena pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu.

5.2 Analýza genu pro melanokortinový receptor 1 (*MC1R*)

K analýze genu *MC1R* byla kromě celé kódující oblasti vybrána i část sekvence odpovídající promotoru, jelikož se v něm vyskytuje mutace (e²), která u australských honáckých psů způsobuje krémové zbarvení (Dürig et al. 2018). Protože se u plemene holandský ovčák často vyskytuje eumelanistická maska, byla do analyzované sekvence zahrnuta i pozice její příčinné mutace. Aby mohlo být následně provedeno zarovnání osekvenovaných úseků (alignment), byly primery navrženy tak, že měl výsledný amplicon délku 1500 bp.

5.2.1 Detekce výskytu mutací v genu *MC1R*

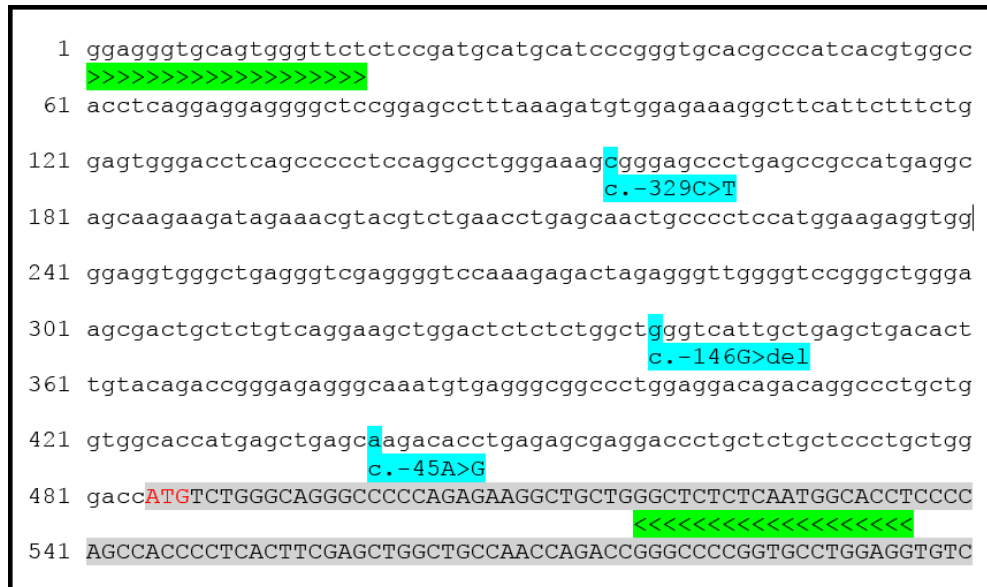
Výskyt mutací byl detekován sekvenováním pomocí Sangerovy dideoxyterminační metody a díky specifitě navržených primerů byly získány sekvence, které se z 99-100 % shodovaly s referenční sekvencí (Obrázek 14).

MC1R				
Sequence ID: Query_61421 Length: 1426 Number of Matches: 1				
Range 1: 1 to 1426				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2634 bits(1426)	0.0	1426/1426(100%)	0/1426(0%)	Plus/Plus
Query 37		CGGGTGCACGCCCATCACGTGGCCACCTCAGGAGGAGGGGCTCCGGAGCCTTTAAAGATG		96
Sbjct 1		CGGGTGCACGCCCATCACGTGGCCACCTCAGGAGGAGGGGCTCCGGAGCCTTTAAAGATG		60
Query 97		TGGAGAAAGGCTTCATTCTTTCTGGAGTGGGACCTCAGCCCCCTCCAGGCCTGGGAAAGC		156
Sbjct 61		TGGAGAAAGGCTTCATTCTTTCTGGAGTGGGACCTCAGCCCCCTCCAGGCCTGGGAAAGC		120
Query 157		GGGAGCCCTGAGCCGCCATGAGGCAGCAAGAAGATAGAAACGTACGTCTGAACCTGAGCA		216
Sbjct 121		GGGAGCCCTGAGCCGCCATGAGGCAGCAAGAAGATAGAAACGTACGTCTGAACCTGAGCA		180

Obrázek 14: Ukázka porovnání části sekvence jedince č. 1 s referenční sekvencí v programu BLAST. Sekvence analyzovaného jedince č. 1 začíná až na pozici 37. nukleotidu referenční sekvence, protože nebylo kvůli délce ampliconu 1500 bp možné osekvenovat jeho začátek a konec. Příklad alignmentu celého ampliconu je v Příloze 11.

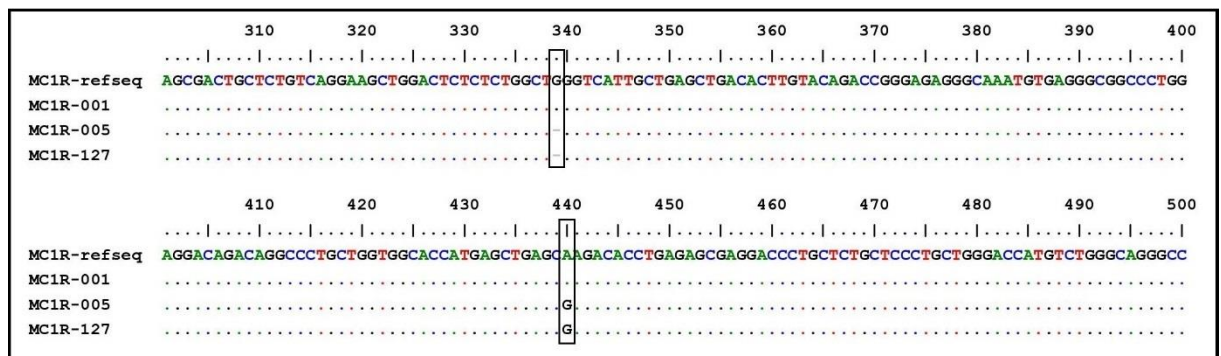
5.2.1.1 Detekce mutací v sekvenci promotoru

Během prvotní analýzy sekvencí několika vybraných psů byly u dvou jedinců bez žihání nalezeny dvě SNP mutace v sekvenci promotoru. Jedná se o delecí guaninu vzdálené 146 nukleotidů od start kodonu (c.-146G>del) a záměnu adeninu za guanin nacházející se 45 nukleotidů před start kodonem (c.-45A>G). U dlouhosrstých jedinců byla nalezena další bodová mutace ve formě substituce thyminu za cytosin ve vzdálenosti 329 nukleotidů před start kodonem (c.-329C>T). Pozice těchto mutací jsou znázorněny na Obrázku 15.



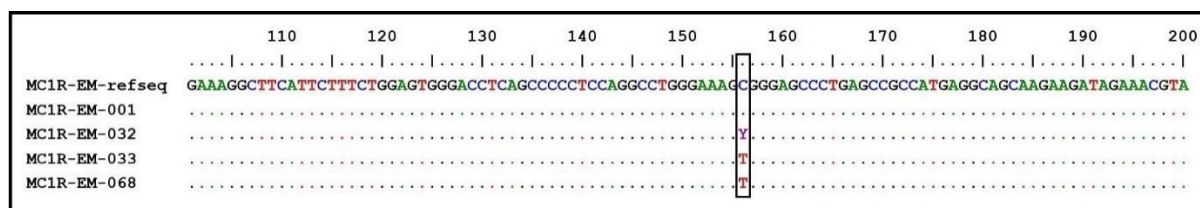
Obrázek 15: Pozice nově objevených mutací v oblasti promotoru genu *MC1R* (modře). Pozice primerů jsou označeny zelenou barvou. Symbol > a < ukazuje směr sekvenace. Kódující sekvence je označena šedou barvou, přičemž start kodon je zvýrazněn červeně. Sekvence 5' UTR a promotorové oblasti jsou odlišeny malými písmeny.

Pro potvrzení výskytu mutací c.-146G>del a c.-45A>G byly sekvence jedinců č. 5 a 127 s nestandardním zbarvením porovnány se sekvencí získané od černě žihaného jedince č. 1 (Obrázek 16).



Obrázek 16: Porovnání sekvencí jedince s černým žiháním (č. 1), dvou jedinců bez žihání (č. 5 a 127) s referenční sekvencí. Kompletní alignment genu *MC1R* je v Příloze 12.

Výskyt třetí nově pozorované mutace c.-329C>T byl u dlouhosrstých jedinců (č. 32, 33 a 68) ověřen srovnáním sekvencí těchto jedinců, krátkosrstého holandského ovčáka (č. 1) a referenční sekvence (Obrázek 17).

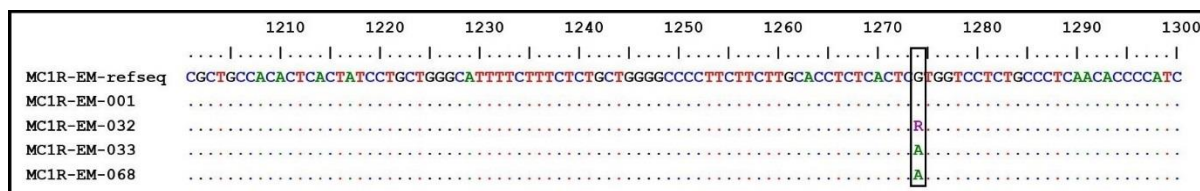


Obrázek 17: Porovnání sekvencí krátkosrstého jedince (č. 1), tří dlouhosrstých jedinců (č. 32, 33 a 68) s referenční. Kompletní alignment genu *MC1R* je v Příloze 12.

5.2.1.2 Detekce mutací v exonu

Jelikož se u plemene holandský ovčák vyskytuje pouze černé žihání na světlém základním zbarvení a u mnoha jedinců lze pozorovat eumelanistickou masku, předpokládalo se, že se u všech psů bude ze známých alel vyskytovat pouze původní alela E, která je zodpovědná za funkční melanokortinový receptor 1, a alela E^M, která způsobuje vznik výše zmíněné masky. Tento předpoklad potvrdila analýza sekvencí všech jedinců, ve kterých se žádná z příčinných mutací známých alel E^G, E^H, e¹, e² a e³ nevyskytla.

Mutace c.790A>G, typická pro alelu E^M, byla detekována ve dvou kopiích u všech krátkosrstých a hrubosrstých jedinců. Všichni tito jedinci tedy mají tmavou masku na čenichu. Oproti tomu dva dlouhosrstí jedinci měli v pozici 790 pouze adenin (Obrázek 18), tudíž eumelanistickou masku nemají. Třetí dlouhosrstý ovčák byl heterozygot (Obrázek 18) a jelikož je alela E^M dominantní vůči původní alele E, má tento jedinec eumelanistickou masku.



Obrázek 18: Porovnání amplifikovaných sekvencí s referenční sekvencí při použití primeru MC1R-R. Porovnání kompletních sekvencí genu *MC1R* je v Příloze 12.

Genotypy zjištěné sekvenováním všech jedinců jsou spolu se získanými informacemi o každém jedinci (pohlaví, věk, fenotyp) zpracovány do tabulky v Příloze 13.

5.2.1.3 Populační analýza frekvencí alel a heterozygotnosti lokusů genu *MC1R*

Počet testovaných jedinců, výsledné frekvence alel a očekávané a pozorované heterozygotnosti jsou uvedeny v Tabulce 7 pro čtyři detekované SNP.

Tabulka 7: Relativní frekvence alel a heterozygotnost v lokusu *MC1R* u testovaných jedinců. Ve sloupci lokus je uvedena pozice dané mutace. Hodnota n je počet genotypovaných jedinců. H_E je očekávaná a H_O pozorovaná heterozygotnost.

lokus	n	alela	frekvence	H_E	H_O
<i>MC1R</i> _ -329	120	C	0,9792	0,0410	0,0083
		T	0,0208		
<i>MC1R</i> _ -146	119	G	0,5336	0,4998	0,5294
		–	0,4664		
<i>MC1R</i> _ -45	119	A	0,4622	0,4992	0,5546
		G	0,5378		
<i>MC1R</i> _ 790	122	A	0,0205	0,0403	0,0082
		G	0,9795		

5.2.1.4 Statistická analýza vlivu mutací genu *MC1R* na výsledný fenotyp

Pro hodnocení vztahu mezi detekovanými alelami a ztrátou žihání s přibývajícím věkem psa byly vybrány mutace c.-146G>del a c.-45A>G. Mutace c.-329C>T se totiž vyskytuje pouze u dlouhosrstých jedinců a mutace c.790A>G, která způsobuje tvorbu eumelanistické masky, byla naopak pozorována v homozygotní sestavě u všech jedinců kromě dlouhosrstých. Jelikož se ztráta žihání projevuje v pozdějším věku, nebyla do hodnocení zařazena štěňata a dvouletí jedinci, u kterých nelze změnu fenotypu ještě pozorovat.

V prvním modelu (Tabulka 8) byli hodnoceni všichni vybraní jedinci (celkem 67) a byla posuzována závislost jejich fenotypu na genotypu v obou sledovaných mutacích. Protože se zkoumané mutace nachází ve vzdálenosti 101 bp od sebe, zohledňoval druhý model (Tabulka 8) vliv haplotypů jedince na jeho výsledný fenotyp. V tomto modelu bylo použito 52 jedinců, u kterých šlo pomocí sekvenace a jejich příbuzenských vazeb s ostatními testovanými jedinci spolehlivě určit haplotypy na obou chromozomech.

Modely byly upraveny tak, aby neobsahovaly haplotypy nebo genotypy s malou četností, jež by mohly hodnocení zkreslit. Data byla porovnávána vždy vůči původnímu nemutovanému haplotypu/genotypu.

Tabulka 8: Výsledky analýzy vlivu mutací genu *MC1R* na fenotyp jedince

Intercept je výchozí hodnota, vůči které jsou ostatní haplotypy/genotypy porovnávány. V tomto případě je to původní genotyp GGAA nebo původní haplotyp GAGA, kdy jsou mutace G a A vždy společně na jednom chromozómu. P je výsledná hodnota pravděpodobnosti, že má daný genotyp/haplotyp statisticky signifikantní vliv na výsledný fenotyp na stanovené hladině významnosti $\alpha = 0.05$. Exponenciální transformací regresních koeficientů bylo možné vyjádřit kolikrát daný genotyp/potažmo haplotyp zvyšuje šanci na ztrátu žihání.

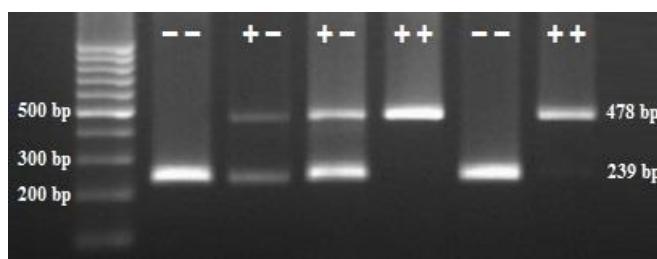
model	n	intercept	kombince	P	exp
M1 (genotypy)	67	0.00780	G-GA	0.99445	$1,2536 \times 10^{-7}$
			G-GA	0.59809	1,4933
			--GG	0.00407	14,2222
M2 (haplotypy)	52	0.00780	GGGA	0.99445	$1,2536 \times 10^{-7}$
			G-GA	0.33258	2,2222
			-G-G	0.00407	14,2222

5.3 Identifikace mutací genu pro agouti signální protein (*ASIP*)

Holandský ovčák je typický svým zbarvením, černým žiháním na světlém základu. Aby mohl mít světlou srst, potřebuje jednu z funkčních alel genu pro agouti signální protein. Jejich příčinné mutace byly detekovány zvláště, jelikož se vyskytují v různých částech genu *ASIP*. Důvody, proč byl detekován pouze výskyt SINE inzerce a mutace G248A, jsou uvedeny v diskuzi.

5.3.1 Detekce výskytu SINE inzerce

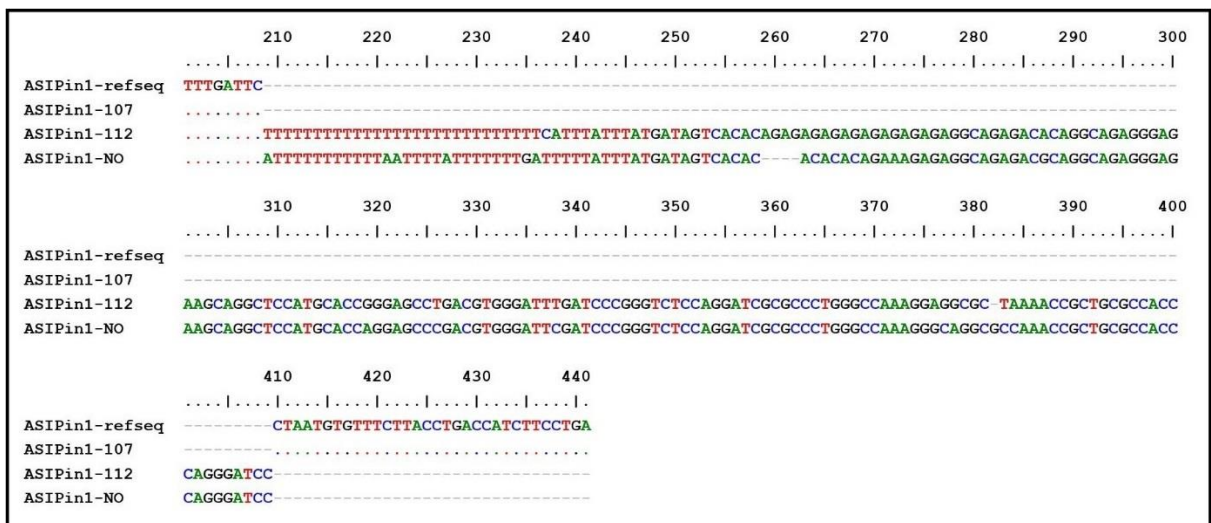
Amplifikační oblasti, kde by se měla SINE inzerce vyskytovat, vznikaly různě dlouhé fragmenty podle toho, zda jedinec tuto inzerci měl nebo ne. Pokud ji jedinec neměl, tvořil se fragment o velikosti přibližně 239 bp. Pokud měl jedinec naopak dvě kopie genu *ASIP* se SINE inzercí, byl amplifikován jeden fragment o velikosti cca 478 bp. Poslední možností pak byla kombinace jedné kopie se SINE inzercí a jedna kopie bez ní. V tom případě vznikaly dva fragmenty o velikostech cca 239 a 478 bp. Výsledek elektroforetické separace všech tří možných kombinací lze pozorovat na Obrázku 19.



Obrázek 19: Elektroforeogram fragmentů vzniklých amplifikací pomocí primerů *ASIP_SINE*. Výskyt SINE inzerce je označen symbolem +. Naopak jedinci s fragmenty nemutované DNA mají v genotypu symbol -. Genotyp +- je tedy heterozygot s oběma fragmenty.

5.3.2 Analýza sekvence intronu 1

Zkoumaná SINE inserce nemá v intronu 1 přesně určenou pozici, přičemž se mezi různými jedinci často liší svou délkou a výskytem bodových mutací v sekvenci. Přestože její délka ani mutace nemají na výsledný fenotyp psů vliv, byla pro ověření schopnosti markeru tuto inserci detekovat provedena sekvenace amplifikované oblasti. K analýze sekvence byli vybráni dva jedinci plemene holandský ovčák. Jeden s žíhaným pálením pro detekci SINE inserce a jeden s černým žíháním pro analýzu sekvence, která SINE inserci neobsahuje. Jelikož tato SINE patří do skupiny SINEC_Cf, která je typická výskytem mnoha bodových mutací, byla pro srovnání analyzovaná také sekvence jednoho černého německého ovčáka, pro jejichž zbarvení je tato SINE inserce nezbytná. Porovnání sekvencí získaných od všech výše zmíněných jedinců je na Obrázku 20.



Obrázek 20: Porovnání amplifikovaných sekvencí s referenční sekvencí při použití primerů ASIP_SINE. Sekvence SINE inserce začíná v pozici 209 a končí v pozici 409. Sekvence jedince 107 se shoduje s referenční, která SINE inserci neobsahuje. Oproti tomu sekvence holandského ovčáka s páleným žíháním (112) a černého německého ovčáka (NO) SINE inserci obsahuje. Ta se u těchto plemen liší nejen bodovými mutacemi v sekvenci, ale i délkou. Černý německý ovčák má délku SINE inserce 196 bp, kdežto u holandského ovčáka s páleným žíháním je tato inserce 199 bp dlouhá. Porovnání celé sekvence se SINE insercí je v Příloze 14.

Ze všech analyzovaných jedinců se SINE inserce vyskytla pouze štěňat z jednoho vrhu a jejich matky. Matka byla heterozygot, přičemž její fenotyp je černé žíhání. Štěňata vykazovala variabilitu v genotypu i fenotypu. U pěti z nich byla detekována SINE inserce v homozygotní sestavě, což vedlo ke změně fenotypu na žíhané pálení. Další čtyři štěňata měla SINE inserci pouze v jedné kopii a spolu s posledním štěnětem, u kterého nebyla inserce detekována, měla klasické černé žíhání. U těchto jedinců byl dále analyzován výskyt mutace G248A pro určení výsledných alel a genotypů.

5.3.3 Detekce výskytu mutace G248A

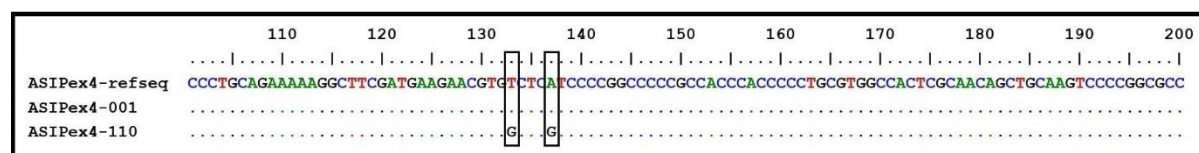
Mutace G248A vytváří v oblasti exonu 4 genu *ASIP* štěpné místo pro enzym BtsCI. U homozygota s mutovanou alelou po štěpení amplifikovaného fragmentu o délce 285 bp vznikají dva fragmenty o velikostech 135 a 150 bp. Vzhledem k nízké rozlišovací schopnosti agaróзовé elektroforózy se fragmenty 135 a 150 bp jeví jako jediný. Ten lze spolehlivě odlišit od původního fragmentu, který u jedinců bez mutace není štěpen. U heterozygota s jednou kopií s mutací G248A a s jednou kopií bez ní jsou celkově viditelné pouze dva fragmenty dva, jeden o velikosti cca 135 – 150 bp a druhý 285 bp (Obrázek 21).



Obrázek 21: Elektroforeogram fragmentů vzniklých štěpením pomocí enzymu BtsCI

5.3.4 Analýza sekvence exonu 4

Sekvence amplifikovaná pomocí primerů *ASIP_ex4* byla u dvou fenotypově odlišných jedinců porovnána s referenční sekvencí (Obrázek 22).



Obrázek 22: Porovnání amplifikovaných sekvencí s referenční sekvencí při použití primerů *ASIP_ex4*. Jedinec č. 1 má černě pruhované zbarvení na světlé základní srsti, která je určena mutacemi na pozicích 133 a 136, což odpovídá alele A^y . Oproti tomu sekvence jedince č. 110, který má pruhovaná pouze světlá místa pálení, obsahuje v obou pozicích bázi guanin, což je typické pro ostatní alely A lokusu. Porovnání celé sekvence exonu 4 genu *ASIP* je v Příloze 15.

5.3.5 Výsledné alely a genotypy a jejich statistické hodnocení

Detekované genotypy genu *ASIP* testovaných jedinců jsou uvedeny v Příloze 16. Jejich statistické hodnocení bylo provedeno pouze pro výskyt SINE inzerce (Tabulka 9).

Tabulka 9: Relativní frekvence alel a heterozygotnost testovaných jedinců v lokusu *ASIP* SINE. Hodnota n je počet genotypovaných jedinců. H_E je očekávaná a H_o pozorovaná heterozygotnost.

Lokus	n	alela	frekvence	H_E	H_o
<i>ASIP_SINE</i>	125	+	0,0640	0,1203	0,0480
		-	0,9360		

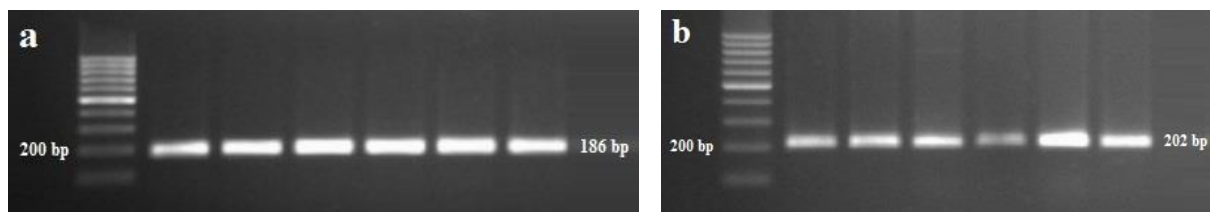
5.4 Identifikace mutací genu pro betadefensin 103 (*CBD103*)

Plemeno holandský ovčák je charakteristické svým černě žíhaným zbarvením. To je způsobeno alelou k^{br} , která je dle Candille et al. (2009) složena z jedné kopie alely K^B a jedné kopie alely k^y . Cílem analýzy genu *CBD103* u holandských ovčáků bylo potvrdit tuto hypotézu.

5.4.1 Detekce výskytu alel K^B a k^y

Po provedení amplifikace se specifickými primery *CBD103_ex2*, jež nasedají pouze do oblasti, která je charakteristická pro alelu k^y , byly výsledné fragmenty elektroforeticky separovány. Z výsledku této analýzy vyplývá, že všichni jedinci mají tuto alelu (Obrázek 23a).

Při amplifikaci pomocí primerů *CBD103_ex2del* vznikaly pouze fragmenty bez trojice nukleotidů (GGA), což je charakteristické pro alelu K^B . Z elektroforeogramu na Obrázku 23b vyplývá, že tuto alelu mají rovněž všichni testovaní jedinci.

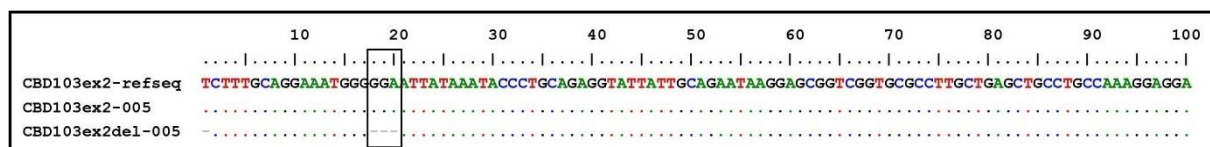


Obrázek 23: Elektroforeogram amplikonů vzniklých při použití primerů a) *CBD103_ex2* a b) *CBD103_ex2del*

U všech jedinců byla detekována alela K^B i alela k^y . Protože je tedy populace z hlediska alel K^B a k^y homogenní, nebylo provedeno její statistické hodnocení.

5.4.2 Analýza sekvencí alel K^B a k^y

Jelikož byly obě dvojice primerů navrženy speciálně pro tuto práci, byly produkty amplifikací u několika vybraných jedinců osekvenovány (Obrázek 24).



Obrázek 24: Porovnání amplifikovaných sekvencí s referenční sekvencí při použití primerů *CBD103_ex2* versus *CBD103_ex2del*. Sekvence amplikonu *CBD103ex2* jedince č. 5 byla shodná s referenční sekvencí *CBD103ex2-refseq*, která byla použita k navržení primerů. V databázi Ensembl je tedy pod ID ENSCAFG00000032247 uložena sekvence alely k^y . Naopak sekvence amplikonu *CBD103ex2del* jedince č. 5 obsahuje delecí, která je typická pro alelu K^B . Kompletní srovnání těchto sekvencí je v Příloze 17.

6 Diskuze

6.1 Hodnocená populace

Pro správnost hodnocení genetické variability u jakéhokoliv organismu je důležité získat co největší počet vzorků. Pro účely této práce bylo celkem odebráno 125 vzorků DNA od čistokrevných jedinců plemene holandský ovčák, z nichž 17 jedinců mělo fenotyp označený jako „bez žíhání“ a 5 jedinců s fenotypem „pálené žíhání“. K většímu počtu vzorků pomohl samotný typ odběru, který proběhl neinvazivní metodou bukalního stěru. Ten je snadný, může ho tedy provést sám chovatel a psa nijak nestresuje.

V porovnání s ostatními studiemi zabývajícími se geny pro zbarvení srsti u psů není 125 jedinců mnoho, ale s přihlédnutím k tomu, že jsou všichni jednoho plemene, je to dostačující počet ke statistickému hodnocení. Množství sledovaných jedinců lze porovnat například se studií Dürig et al. (2018) zabývající se variabilitou v genu *MC1R*. V této studii bylo mimo jiné hodnoceno 334 jedinců australského honáckého psa z nichž 10 bylo nestandardně krémově zbarvených. Přestože bylo jedinců s nestandardním fenotypem jen 10, byla nalezena asociace mezi tímto zbarvením a výskytem mutace c.-430G>C.

V rámci této práce nebyli analyzováni pouze jedinci plemene holandský ovčák, ale pro optimalizaci některých postupů byly vzorky doplněny i jinými plemeny, jako například československý vlčák nebo německý ovčák.

6.2 Genetická variabilita populace v genech *MC1R*, *ASIP* a *CBD103*

Na variabilitu ve zbarvení srsti je u každého plemena psa pohlíženo jinak. U některých je žádoucí zachovat co nejvíce barev a vzorů a u jiných, jako je tomu u holandského ovčáka, je jedno zbarvení základní charakteristikou plemene. U holandského ovčáka je ve standardu stanoveno, že musí mít zřetelné černé žíhání na základní barvě, která je stříbrná nebo zlatá, přičemž zlatá může být v ostínech od světlé pískové až po kaštanovou (FCI 2009).

Již z fenotypu holandského ovčáka lze předpokládat, jak bude přibližně vypadat jeho genotyp pro hlavní geny determinující zbarvení srsti u psů. Gen *MC1R* určuje, zda a v jaké míře bude melanokortinový receptor 1 aktivní. Tento receptor je potřeba k tvorbě eumelaninu, proto je pro černé žíhání srsti nezbytné, aby byl funkční. Jedinec má tedy jednu z alel E nebo E^M. Dalším genem kontrolujícím tvorbu pigmentu v srsti je gen pro agouti signální protein (*ASIP*). Agouti signální protein zajišťuje svou vazbou na melanokortinový receptor 1 produkci světlého barviva feomelaninu. Mezi alely genu *ASIP*, díky kterým vzniká tento funkční protein, patří a^y, a^w a a^t. Alela a^w zodpovědná za vlkošedé zbarvení srsti se u holandského ovčáka nevyskytuje, proto mohou být v genotypu jedince pouze alely a^y nebo a^t. Třetí gen, který u psa na rozdíl od ostatních savců určuje, zda se bude tvořit eumelanin nebo feomelanin, je *CBD103*, přičemž pro žíhání srsti je nezbytná minimálně jedna kopie alely k^{br}.

Z výše popsaných skutečností vyplývá, že by variabilita v genech *MC1R*, *ASIP* a *CBD103* u plemene holandský ovčák neměla být vysoká. I přesto se ale v plemeni vyskytují jedinci s nestandardními fenotypy, kteří byli do výzkumu zařazeni, což míru variability některých studovaných genů v této hodnocené populaci značně změnilo.

6.2.1 Variabilita genu *MC1R*

Díky navržení specifických primerů se u většiny jedinců podařilo úspěšně amplifikovat a osekvenovat část promotoru a celý exon genu *MC1R* a byly identifikovány tři nové mutace v sekvenci promotoru. Tyto mutace označené podle jejich pozice od start kodonu kódující sekvence jsou c.-329C>T, c.-146G>del a c.-45A>G. U některých jedinců se sekvenace opakovaně nezdařila nebo byla předčasně ukončena a nebyl tudíž získán dostatečně dlouhý úsek pro porovnání s referenční sekvencí. Tito jedinci nebyli do následného genotypování zařazeni a místo genotypu mají v Příloze 13 označení NA.

Mutace c.-329C>T se vyskytovala pouze u dlouhosrstých jedinců, a proto byla její frekvence v populaci rovna hodnotě 0,0208. Pravděpodobně kvůli této nízké frekvenci očekávaná heterozygtnost ($H_E=0,0410$) neodpovídala pozorované ($H_O=0,0083$). Kvůli své malé četnosti nebyla tato mutace dále analyzována.

Další mutací, která se vyskytovala naopak jen u krátkosrstých a hrubosrstých psů, byla mutace c.-146G>del, tedy delece guaninu v sekvenci promotoru 145 nukleotidů před start kodonem. V procesu sekvenování všech jedinců bylo získáno 63 sekvencí, které od této pozice vykazovaly zdvojené píky (Příloha 18). Aby byla potvrzena úvaha, že se jedná o sekvence jedinců, kteří mají jednu kopii DNA s delecí a druhou bez delece, byl navržen sekvenační primer *MC1R_EB-R* (Příloha xx), který na amplifikovanou DNA nasedal v počáteční sekvenci exonu. Pomocí něj byl spolehlivě osekvenován region promotoru až do místa delece, od kterého měla sekvence znovu zdvojené píky (Příloha 18). Po určení genotypu 119 jedinců byla vypočítána frekvence mutace rovna 0,4664. Hodnota pozorované heterozygotnosti ($H_O=0,5294$) se velmi blížila očekávané heterozygotnosti ($H_E=0,4992$), což odpovídalo rozložení alel v populaci, která je v Hardy-Weinbergově rovnováze.

Třetí nově detekovaná mutace c.-45A>G se vyskytovala u všech variet holandského ovčáka (krátkosrstí, hrubosrstí a dlouhosrstí) a z nově objevených mutací vykazovala nejvyšší frekvenci 0,5378 v populaci. Očekávaná heterozygotnost (0,4992) korespondovala s pozorovanou ($H_O=0,5546$), což odpovídalo rovnovážnému rozložení v populaci stejně jako u mutace c.-146G>del.

Poslední detekovanou mutací genu *MC1R* tentokrát v sekvenci exonu byla mutace c.790A>G, jež je typická pro alelu E^M a je příčinou vzniku eumelanistické masky u psů. Tato alela byla v populaci očekávaná ve vysoké frekvenci, jelikož je u plemene holandský ovčák žádaná a u mnoha testovaných jedinců byla při odběru na žíhané srsti dobře viditelná. Jelikož tuto mutaci měli kromě tří dlouhosrstých jedinců všichni ve dvou kopiích, byla její frekvence vysoká (0,9795), což se odrazilo na nízké pozorované heterozygotnosti ($H_O=0,0082$) oproti očekávané ($H_E=0,0403$). Z dlouhosrstých jedinců měl alelu E^M pouze jeden jedinec v jedné kopii. U dalších dvou dlouhosrstých jedinců se alela E^M nevyskytovala vůbec, a proto eumelanistickou masku neměli. Masky je ve standardu holandského ovčáka preferovaná, ale ne vyžadovaná a jelikož je dlouhosrstá varieta málopočetná, je frekvence jedinců bez masky u dlouhosrstých ovčáků větší než u dalších dvou variet (krátkosrstá a hrubosrstá).

6.2.2 Variabilita genu *ASIP*

Pro plemeno holandský ovčák je typické černě žíhané zbarvení srsti na celém těle, které je podmíněno alelou a^y genu pro agouti signální protein, díky níž má holandský ovčák v základu světlou srst. V populaci se občas objeví jedinci, kteří mají fenotyp zvaný žíhané pálení, za něž je zodpovědná alela a^t v kombinaci s alelou k^{br} genu *CBD103*. Žíhání jen na některých místech těla, jako je tomu u žíhaného pálení, je nestandardní a takto zbarvení jedinci by neměli být v chovu použiti.

V roce 2019 se u pěti štěňat v jediném vrhu vyskytl fenotyp žíhaného pálení, a proto byla u všech vzorků testována alela a^t . SINE inzerce, která je pro tuto alelu typická, se vyskytovala pouze mezi štěňaty ze zmíněného vrhu a u jejich matky. Frekvence této mutace ve sledované populaci byla rovna hodnotě 0,0640 a pozorovaná heterozygotnost ($H_o=0,0480$) neodpovídala očekávané ($H_E=0,1203$). SINE inzerce byla sekvenována u jednoho holandského a jednoho německého ovčáka pro potvrzení její meziplenné variability, co se týče délky a přítomnosti bodových mutací, jak uvádějí Dreger & Schmutz (2011).

Jelikož měla štěňata se žíhaným pálením rozdílnou míru černých oblastí (Příloha 19), byla analyzována také alela a^y , aby byl u štěňat a jejich matky potvrzen její výskyt. Tato alela je charakteristická dvěma mutacemi c.244G>T a c.248G>A, přičemž pro její identifikaci stačí detekovat pouze jednu z nich. V této práci byl detekován výskyt mutace c.248G>A pomocí restričního štěpení.

Při kombinaci výsledků z analýzy výskytu SINE inzerce a mutace c.248G>A byl ve vrhu štěňat zjištěn následující genotypový štěpný poměr: 1 ($a^y a^y$) : 4 ($a^y a^t$) : 5 ($a^t a^t$). Oba rodiče byli černě žíhaní po celém těle, tudíž měli každý minimálně jednu alelu a^y . U matky byl zjištěn genotyp $a^y a^t$ a aby se jí mohla narodit štěňata s genotypem $a^t a^t$, musel být i otec, jehož vzorek DNA nebyl mezi testovanými, heterozygot $a^y a^t$.

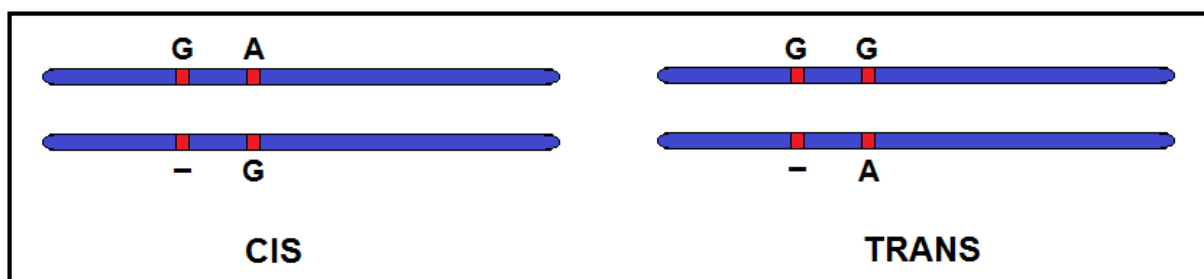
Počet sledovaných jedinců v této práci byl oproti celosvětové populaci holandských ovčáků malý, takže se mezi nimi může alela a^t vyskytovat v hojnějším počtu. Aby se tato alela v populaci nešířila a nerodila se štěňata se žíhaným pálením, může chovatel nechat budoucí rodiče na výskyt této alely otestovat. Pokud budou oba mít genotyp $a^y a^t$, měl by se chovatel rozhodnout pro jiné spojení.

6.2.3 Variabilita genu *CBD103*

Pro standardní zbarvení holandského ovčáka je důležitý i gen *CBD103*, jež ve formě alely k^{br} zajišťuje pravidelné střídání světlých a tmavých pruhů v srsti. Toto střídání oblastí, ve kterých se produkuje výhradně eumelanin nebo feomelanin, je dáno strukturou alely k^{br} , která je pravděpodobně složena z alelických variant K^B a k^y . Tuto teorii potvrdily výsledky analýzy výskytu dvou výše zmíněných alel, kdy všichni žíhaní holanští ovčáci měli minimálně jednu kopii od každé alely. Jelikož je struktura alely k^{br} složitá a zůstává u většiny plemen nepopsaná, nebyl dále gen pro betadefensin 103 analyzován.

6.3 Asociační analýza

Na základě výsledků polymorfismů studovaných genů byla podrobněji zkoumána možná asociace mezi dvěma nově objevenými mutacemi c.-146G>del a c.-45A>G a postupnou ztrátou žihání srsti. K vlastnímu testování byl vybrán zobecněný lineární model v podobě logistické regrese, jelikož responzní proměnná vykazuje binární charakter. Pro vlastní hodnocení byly vytvořeny dva modely, přičemž první bral v potaz genotypovou sestavu alel (M1), kdežto druhý model (M2) odpovídal sestavám haplotypů, které byly odvozeny pomocí sekvenování a rodokmenové analýzy, a zohledňoval tak cis nebo trans konfiguraci studovaných mutací (Obrázek 25).

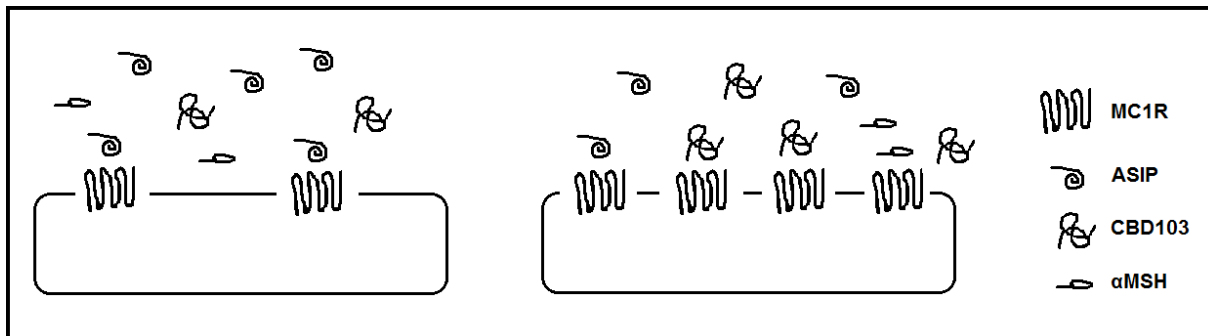


Obrázek 25: Možné konfigurace cis a trans mutací c.-146G>del a c.-45A>G

U modelu M1 vyšel statisticky významný regresní koeficient pro genotyp -- GG ($P = 0.00407$) oproti výchozí úrovni reprezentované původním genotypem GGAA. Pro snazší interpretaci výsledku byl model exponenciálně transformován (exp), díky čemuž můžou být hodnoty regresních koeficientů interpretovány jako poměry šancí dle formulované hypotézy. V našem případě bylo zjištěno, že je u jedince s genotypem -- GG $14,2 \times$ větší šance ztráty žihání srsti.

Následně byl vytvořen model M2, v němž vyšel statisticky významný regresní koeficient pro haplotyp - G - G ($Pr = 0,00407$) vůči původnímu haplotypu GAGA. Po exponenciální transformaci bylo zjištěno, že má jedinec s haplotypem - G - G $14,2 \times$ větší šanci, že se mu bude s přibývajícím věkem vytrácet žihání srsti.

Z výsledků asociační analýzy je tedy patrné, že na ztrátu žihání srsti u holandského ovčáka má vliv výskyt obou mutací na obou chromozómech. Molekulární mechanismus takové změny by mohl vypadat následovně. Mutace na dvou místech v sekvenci promotoru vzdálené od sebe pouhých 101 bp mohou mít za následek lepší vazbu transkripčních faktorů nebo zvýšenou stabilitu RNA vzniklé transkripcí mutované DNA. Obě tyto možnosti by mohly mít za následek intenzivnější produkci melanokortinového receptoru 1, což by zvýšilo počet receptorů, a proto by již agouti signální protein nebyl produkován v dostatečném množství. Volná vazebná místa by spíše obsadily molekuly α MSH nebo betadefensinu 103, které se při menším počtu receptorů neměly kam navázat. Pro snazší pochopení této úvahy bylo vytvořeno zjednodušené schéma (Obrázek 26).



Obrázek 26: Možný vliv mutací c.-146G>del a c.-45A>G na proces melanogeneze. Schéma znázorňuje a) snížené množství melanokortinových receptorů a b) zvýšený počet melanokortinových receptorů.

U holandského ovčáka se vyskytuje mimo alely k^y i alela K^B , která způsobuje nadměrnou produkci a zvýšenou afinitu betadefensinu 103. Tento protein by mohl spolu s α MSH postupem času převážit nad agouti signálním proteinem, což by mohlo vést k tmavnutí srsti.

Ve studii z roku 2012 (Leonard et al.) detekovali u jedinců plemene labradorský retrívr různý počet kopií alely K^B , který se pohyboval od 2 do 4 kopií na jedince. Pokud se tato variabilita vyskytuje i u holandského ovčáka, mohla by být vysvětlením toho, proč se u některých jedinců s genotypem – – GG žihání vytrácí a u jiných ne. Čím více by měl jedinec kopií alely K^B , tím více betadefensinu 103 s větší afinitou by tvořil, tudíž by se žihání vytrácelo rychleji než u jedince s jedinou kopií této alely.

Tyto poznatky by mohly chovatelům pomoci s výběrem chovných jedinců, aby se mutace způsobující ztrátu žihání srsti v populaci nešířily a nevznikali tak další jedinci, kteří budou mít nestandardní zbarvení.

7 Závěr

V rámci diplomové práce bylo dosaženo všech stanovených cílů. Splnění dílčích cílů lze shrnout do následujících bodů:

- Izolace DNA z bukových stěrů pomocí kitu NucleoSpin Tissue XS od firmy Macherey-Nagel byla dostačující pro veškeré analýzy od amplifikace, přes restriční štěpení až po sekvenaci. Vyizolovaná DNA byla tedy vyhovující po kvalitativní i kvantitativní stránce.
- Navržené primery *MCIR* byly specifické a pomocí nich byla uskutečněna amplifikace i následná sekvenace. Dodatečně navržený primer *MCIR_EB-R* výborně posloužil k sekvenaci části promotoru a pomocí něj byl potvrzen genotyp u 63 jedinců.
- Pro identifikaci alely a^t genu *ASIP* byly navrženy primery, pomocí nichž byla úspěšně amplifikována část intronu 1. Také alela a^y v exonu 4 genu *ASIP* byla detekována díky specifické amplifikaci a restričnímu štěpení.
- Dvojice navržených PCR markerů *CBD103_ex2* a *CBD103_ex2del* byla použita k jednoznačné detekci alel K^B a k^y genu *CBD103*.

Splnění výše popsaných dílčích cílů bylo nezbytné pro provedení asociační analýzy a hodnocení genetické variability sledované populace holandských ovčáků. Tato variabilita byla u všech studovaných genů vyjádřena frekvencí jednotlivých alel (mutací) a porovnáním heterozygotností (očekávané a pozorované). V sekvenci promotoru genu *MCIR* byly identifikovány tři nové mutace c.-329C>T, c.-146G>del a c.-45A>G a u většiny jedinců byla detekována alela E^M , která vede ke vzniku eumelanistické masky. Bylo dokázáno, že černě žíhané zbarvení holandského ovčáka je způsobeno alelou k^{br} , jejíž struktura je složena minimálně z jedné kopie alely K^B a jedné kopie alely k^y . Ve sledované populaci holandských ovčáků byla detekována alela a^t , která je zodpovědná za nestandardní fenotyp pálené žíhání. Dále byla prokázána statisticky významná souvislost mutací c.-146G>del a c.-45A>G v promotoru genu *MCIR* se změnou fenotypu holandských ovčáků, kdy se v průběhu života jedince ztrácí žíhání srsti. Z těchto zjištění také vyplývají i doporučení pro budoucí chov holandských ovčáků a zachování jejich černě žíhaného zbarvení.

8 Literatura

- Ari S, Arikani M. 2016. Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future. Pages 109-135 in Hakeem KR, Tombuloğlu H, Tombuloğlu G, editors. *Plant Omics: Trends and Applications*. Springer International Publishing, Cham.
- Atkinson MR, Deutscher MP, Kornberg A, Russell AF, Moffatt JG. 1969. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. XXXIV. Termination of Chain Growth by a 2',3'-Dideoxyribonucleotide. *Biochemistry* **8**:4897 - 4904.
- Barsh GS. 2006. Regulation of Pigment Type Switching by Agouti, Melanocortin Signaling, Attractin, and Mahoganoid. Pages 395-409 in Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Oetting WS, Ortonne JP, editors. *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Berryere TG, Kerns JA, Barsh GS, Schmutz SM. 2005. Association of an Agouti allele with fawn or sable coat color in domestic dogs. *Mammalian Genome: Incorporating Mouse Genome* **16**:262-272.
- Bultman SJ, Russell LB, Gutierrez-espeleta GA, Woychik RP. 1991. Molecular characterization of a region of DNA associated with mutations at the agouti locus in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**:8062 - 8066.
- Candille SI, Kaelin CB, Kerns J, Barsch G. Canine coat color prediction: World Intellectual Property Organization, USA. WO 2009/134226 A1.
- Candille SI, Kaelin CB, Cattanauch BM, Vu B, Thompson DA, Nix MA, Kerns JA, Schmutz SM, Millhauser GL, Barsh GS. 2007. A β -Defensin Mutation Causes Black Coat Color in Domestic Dogs. *Science* **318**:1418-1423.
- Candille SI, Van Raamsdonk CD, Changyou Chen CD, Kuijper S, Yanru Chen-Tsai S, Russ A, Meijlink F, Barsh GS, Hogan BLM. 2004. Dorsoventral Patterning of the Mouse Coat by Tbx15. *PLoS Biology* **2**:30-42.
- Ciampolini R, Cecchi F, Spaterna A, Bramante A, Bardet SM, Oulmouden A. 2012. Characterization of different 5'-untranslated exons of the *ASIP* gene in black-and-tan Doberman Pinscher and brindle Boxer dogs. *Animal Genetics* **44**:114-117.
- Clutton-Brock J. 1995. Origins of the dog: domestication and early history. Pages 7-20 in Serpell J, editor. *The domestic dog: its evolution, behaviour and interactions with people*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Coppinger R, Coppinger L. 2001. *Dogs: a new understanding of canine origin, behavior, and evolution*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Daverio MS, Rigalt F, Romero S, Vidal-rioja L, Di Rocco F. 2016. Polymorphisms in *MC1R* and *ASIP* genes and their association with coat color phenotypes in llamas (*Lama glama*). *Small Ruminant Research* **144**:83-89.
- Davis SJM, Valla FR. 1978. Evidence for domestication of the dog 12,000 years ago in the Natufian of Israel. *Nature* **276**:608-610.

- de Lumley H. 1969. Une cabane de chasseur acheuléens dans la grotte du Lazaret à Nice: les issues, les foyers, les activités artisanales. *Archeologia* **28**:26-33.
- Dostál J. 2007. Genetika a šlechtění psů. Dona, České Budějovice.
- Doškař J, Růžičková V, Pantůček R, Šmarda J. 2010. Purifikace a separace nukleových kyselin. Pages 7-16 in Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J, editors. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno.
- Dreger DL, Hooser BN, Hughes AM, Ganesan B, Donner J, Anderson H, Holtvoigt L, Ekenstedt KJ. 2019. True Colors: Commercially-acquired morphological genotypes reveal hidden allele variation among dog breeds, informing both trait ancestry and breed potential. *PLoS ONE* **14**:1-24.
- Dreger DL, Schmutz SM. 2011. A SINE Insertion Causes the Black-and-Tan and Saddle Tan Phenotypes in Domestic Dogs. *Journal of Heredity* **102**:S11-S18.
- Dressman D, Yan H, Traverso G, Vogelstein B. 2003. Transforming Single DNA Molecules into Fluorescent Magnetic Particles for Detection and Enumeration of Genetic Variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:8817-8822.
- Dürig N, Letko A, Lepori V, Hadji Rasouliha S, Loechel R, Kehl A, Hytönen MK, Lohi H, Mauri N, Dietrich J, Wiedmer M, Drögemüller M, Jagannathan V, Schmutz SM, Leeb T. 2018. Two *MC1R* loss-of-function alleles in cream-coloured Australian Cattle Dogs and white Huskies. *Animal Genetics* **49**:284-290.
- Duval C, Smit NPM, Kolb AM, Régnier M, Pavel S, Schmidt R. 2002. Keratinocytes Control the Pheo/Eumelanin Ratio in Cultured Normal Human Melanocytes. *Pigment Cell Research* **15**:440-446.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* **32**:1792-7.
- Everts RE, Rothuizen J, Oost BA. 2000. Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (*MC1R*) in Labrador and Golden retrievers with yellow coat colour. *Animal Genetics* **31**:194-199.
- FCI. 2009. Standard plemene holandský ovčák. FCI-standard č. 223. Thuin, Belgie.
- Freinkel RK, Woodley DT. 2001. *The biology of the skin*. The pantheon publishing group, New York.
- Galton F. 1865. Hereditary character and talent. *Macmillan's Magazine* **12**:157-166.
- Ganz T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **3**:710-720.
- Genomia. 2019. Testování psů: Locus EH. Genomia. Available from <https://www.genomia.cz/cz/test/locus-eh/> (accessed March 21, 2020).
- Germonpré M, Sablin MV, Stevens RE, Hedges REM, Hofreiter M, Stiller M, Després VR. 2009. Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia:

- osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *Journal of Archaeological Science* **36**:473-490.
- Gerritsen R, Haak R. 2007. Dutch shepherd dogs. Pages 127-135 in Gerritsen R, Haak R, editors. *K9 working breeds: characteristics and capabilities*. Dog Training Press, Edmonton.
- Goding CR. 2007. Melanocytes: The new Black. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**:275-279.
- Goodwin S, Gurtowski J, Ethe-sayers S, Deshpande P, Schatz MC, McCombie WR. 2015. Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. *Genome research* **25**:1750-1756.
- Goodwin S, McCombie WR, McPherson JD. 2016. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* **17**:333 - 351.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**:95-98.
- Heather JM, Chain B. 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **107**:1-8.
- Cheng S, Fockler C, Higuchi R, Barnes WM. 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:5695 - 5699.
- Chen WK, Swartz JD, Alvarez CE, Rush LJ. 2009. Mapping DNA structural variation in dogs. *Genome Research* **19**:500 - 509.
- Chhapekar SS, Gaur R, Kumar A, Ramchiary N. 2016. Reaping the Benefits of Next-generation Sequencing Technologies for Crop Improvement – Solanaceae. Pages 247-285 in Chhapekar SS, Gaur R, Kumar A, Ramchiary N, editors. *Next Generation Sequencing-Advances, Applications and Challenges*. InTech, London.
- Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**:9436 - 9440.
- Ito S. 2003. A Chemist's View of Melanogenesis. *Pigment Cell Research* **16**:230-236.
- Ito S, Jimbow K. 1983. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas. *Journal of Investigative Dermatology* **80**:268 - 272.
- Kaelin CB, Barsh GS. 2013. Genetics of pigmentation in dogs and cats. *Annual Review of Animal Biosciences* **1**:125 - 156.
- Kaelin CB, Candille SI, Yu B, Jackson P, Thompson DA, Nix MA, Binkley J, Millhauser GL, Barsh GS. 2008. New ligands for melanocortin receptors. *International journal of obesity* **7**:S19-S27.

- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**:1099-1106.
- Kerns JA, Candille SI, Barsh GS, Cargill EJ, Clark LA, Murphy KE, Olivier M, Lust G, Todhunter RJ, Berryere TG, Schmutz SM. 2007. Linkage and segregation analysis of black and brindle coat color in domestic dogs. *Genetics* **176**:1679 - 1689.
- Kerns JA, Newton J, Barsh GS, Berryere TG, Schmutz SM, Rubin EM, Cheng J-F. 2004. Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mammalian Genome* **15**:798 - 808.
- Klungland H, Våge DI. 2003. Pigmentary Switches in Domestic Animal Species. *Annals of the New York Academy of Sciences* **994**:331-338.
- Korec E, Hančl M, Bydžovská M, Chalupa O, Korcová J. 2019. Inheritance of coat colour in the cane Corso Italiano dog. *BMC Genetics* **20**:1-5.
- Ku C-S, Roukos DH. 2013. From next-generation sequencing to nanopore sequencing technology: Paving the way to personalized genomic medicine. *Expert Review of Medical Devices* **10**:1 - 6.
- Kulski JK. 2016. Next-Generation Sequencing – An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. Pages 3-60 in Kulski JK, editor. *Next Generation Sequencing—Advances, Applications and Challenges*. InTech, London.
- Land EJ, Ito S, Wakamatsu K, Riley PA. 2003. Rate constants for the first two chemical steps of eumelanogenesis. *Pigment Cell Research* **16**:487 - 493.
- Larson G, Burger J. 2013. A population genetics view of animal domestication. *Trends in Genetics* **29**:197-205.
- Larson G, Karlsson EK, Perri A, Webster MT, Ho SYW, Peters J, Stahl PW, Piper PJ, Lingaas F, Fredholm M, Comstock KE, Modiano JF, Schelling C, Agoulnik AI, Leegwater PA, Dobney K, Vigne JD, Vilà C, Andersson L, Lindblad-Toh K. 2012. Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:8878-8883.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* (e3923) DOI: 10.3791/3923.
- Lightner JK. 2009. Genetics of coat color II: the agouti signaling protein (*ASIP*) gene. *Answers Research Journal* **2**:79-84.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012. DOI: 10.1155/2012/251364.
- Lorenz TC. 2012. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments* (e3998) DOI 10.3791/3998.

- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, Cone RD. 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* **371**:799 - 802.
- Lu H, Giordano F, Ning Z. 2016. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics* **14**:265-279.
- Magera S. 2011. Geschichte und Ursprung. Holländischen Schäferhund Club Deutschland e.V. Available from <https://www.hscd-ev.de/> (accessed January 2020).
- Mardis ER. 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics* **9**:387-401.
- Mardis ER. 2013. Next-generation sequencing platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry* **6**:287 - 303.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Yi-Ju C, Zhoutao C, Dewell SB, Lei D, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, Wen H, Helgesen S, Chun HH, Irzyk GP, Jando SC. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**:376-380.
- Metzker ML. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics* **11**:31-46.
- Miklósi A. 2018. *The dog: A natural history*. Ivy Press, Brighton.
- Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **262**:56 - 65.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**:263 - 273.
- Newton JM, He L, Metallinos DL, Barsh GS, Wilkie AL, Jordan SA, Jackson IJ, Holmes NG. 2000. Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mammalian Genome* **11**:24-30.
- Niskanen AK, Hagström E, Lohi H, Ruokonen M, Esparza-salas R, Aspi J, Savolainen P. 2013. MHC variability supports dog domestication from a large number of wolves: high diversity in Asia. *Heredity* **110**:80-85.
- Nobis G. 1979. Der älteste Haushund lebte vor 14 000 Jahren. *Die Umschau* **19**:610.
- Oguro-Okano M, Honda M, Yamazaki K, Okano K. 2011. Mutations in the Melanocortin 1 Receptor, β -Defensin103 and Agouti Signaling Protein Genes, and Their Association with Coat Color Phenotypes in Akita-Inu Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* **73**:853-858.
- Ollmann MM, Wilson BD, Barsh GS, Lamoreux ML. 1998. Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. *Genes and Development* **12**:316-330.
- Olsen SJ. 1985. *Origins of the domestic dog: the fossil record*. University of Arizona Press, Tucson.

- Ovodov ND, Crockford SJ, Kuzmin YV, Higham TFG, Hodgins GWL, van der Plicht J. 2011. A 33,000-year-old incipient dog from the Altai Mountains of Siberia: Evidence of the earliest domestication disrupted by the last Glacial Maximum. *PLoS ONE* 6 (e22821) DOI: 10.1371/journal.pone.0022821.
- Pang JF, Kluetsch C, Zou XJ, Zhang AB, Luo LY, Angleby H, Ardalan A, Ekström C, Sköllermo A, Lundeberg J, Matsumura S, Leitner T, Zhang YP, Savolainen P. 2009. MtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze river, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular Biology and Evolution* 26:2849-2864.
- Pantůček R. 2010. Stanovení sekvence DNA (sekvencování DNA). Pages 59-72 in Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J, editors. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno.
- Pantůček R, Doškař J. 2010. Amplifikace nukleových kyselin. Pages 73-110 in Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J, editors. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno.
- Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. 2009. Generations of sequencing technologies. *Genomics* 93:105-111.
- Price EO. 1984. Behavioral aspects of animal domestication. *The Quarterly Review of Biology* 59:1-32.
- Průša R. 1997. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. 2. lékařská fakulta UK a Lambda Bio-Med spol. s r.o., Praha.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from <https://www.R-project.org/>
- Rees JL. 2003. Genetics of hair and skin color. *Annual Review of Genetics* 37:67-90.
- Rejnartová E. 2007. Holandský ovčák. Available from <https://www.czech-press.cz/> (accessed January 2020).
- Rieder S, Taourit S, Mariat D, Langlois B, Guérin G. 2001. Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome: Incorporating Mouse Genome* 12:450-455.
- Robbins LS, Kelly MA, Roselli-rehfuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD, Nadeau JH, Johnson KR. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72:827 - 834.
- Rothberg JM., Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, Simons JF, Marran D, Myers JW, Davidson JF, Branting A, Nobile JR, Puc BP, Light D, Clark TA. 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475:348-352.
- Rothberg JM, Leamon JH. 2008. The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnology* 26:1117-1124.

- Russo V, Fontanesi L, Scotti E, Tazzoli M, Dall'olio S, Davoli R. 2007. Analysis of melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene polymorphisms in some cattle breeds: their usefulness and application for breed traceability and authentication of Parmigiano Reggiano cheese. *Italian Journal of Animal Science* **6**:257-272.
- Ruvinsky A, Sampson J. 2001. *The Genetics of the Dog*. CAB International, Wallingford.
- Sablin MV, Khlopachev GA. 2002. The earliest ice age dogs: evidence from Eliseevichi I. *Current Anthropology* **43**:795-799.
- Saiki RK, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, Gelfand DH, Stoffel S. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487 - 491.
- 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**:5463-5467.
- Savolainen P, Zhang YP, Luo J, Lundeberg J, Leitner T. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science* **298**:1610-1613.
- Seberg HE, Cornell RA. 2017. Beyond MITF: Multiple transcription factors directly regulate the cellular phenotype in melanocytes and melanoma. *Pigment cell* **30**:454-466.
- Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology* **21**:1794 - 1805.
- Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. 2010. A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics* **19**:R227 - R240.
- Schmutz SM. 2018. The E Locus in Dogs. Saskatoon. Available from <https://homepage.usask.ca/~schmutz/> (accessed March 2020).
- Schmutz SM, Berryere TG. 2007. Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review. *Animal genetics* **38**:539-549.
- Schmutz SM, Berryere TG, Ellinwood NM, Kerns JA, Barsh GS. 2003. *MC1R* Studies in Dogs With Melanistic Mask or Brindle Patterns. *Journal of Heredity* **94**:69-73.
- Schmutz SM, Melekhovets Y. 2012. Coat color DNA testing in dogs: Theory meets practice. *Molecular and Cellular Probes* **26**:238-242.
- Schmutz SM, Moker JS, Berryere TG, Christison KM, Dolf G. 2001. An SNP is used to map *MC1R* to dog chromosome 5. *Animal Genetics* **32**:43 - 44.
- Simon JD, Hong L, Peles DN. 2008. Insights into melanosomes and melanin from some interesting spatial and temporal properties. *Journal of Physical Chemistry B* **112**:13201-13217.
- Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA. 2004. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annual Review of Genetics* **38**:365-415.
- Takeuchi T, Kobunai T, Yamamoto H. 1989. Genetic control of signal transduction in mouse melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **92**:239 - 242.

- Thalmann O, Shapiro B, Cui P, López-giráldez F, Domingo-roura X, Napierala H, Uerpmann HP, Giemisch L, Worthington B, Druzhkova A, Wahlberg N, Koepfli KP, Meyer M, Krause J, Pääbo S. 2013. Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a european origin of domestic dogs. *Science* **342**:871-874.
- Thody AJ, Higgins EM, Wakamatsu K, Ito S, Burchill SA, Marks JM. 1991. Pheomelanin as well as Eumelanin Is Present in Human Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* **97**:340-344.
- Tchernov E, Valla FF. 1997. Two new dogs, and other Natufian dogs, from the southern Levant. *Journal of Archaeological Science* **24**:65 - 95.
- Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. 2002. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **50**:125 - 133.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**:(e115) DOI: 10.1093/nar/gks596
- VetGen. 2019. Canine Coat Color: VetGen DNA CHROMAGENE Coat Color Testing. Available from <https://www.vetgen.com/> (accessed March 2020).
- Vilà C, Savolainen P, Amorim IR, Rice JE, Honeycutt RL, Crandall KA, Lundeberg J, Wayne RK. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* **276**:1687-1689.
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. 2003. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic acids research* **31**:3688-3691.
- Vonholdt Bridgett M, Pollinger JP, Lohmueller KE, Han E, Parker HG, Quignon P, Degenhardt JD, Boyko AR, Earl DA, Auton A, Reynolds A, Bryc K, Brisbin A, Knowles JC, Mosher DS, Spady TC, Elkahloun A, Geffen E, Pilot M, Jedrzejewski W. 2010. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* **464**:898-902.
- Wang W, Kirkness EF. 2005. Short interspersed elements (SINEs) are a major source of canine genomic diversity. *Genome research* **15**:1798–1808.
- Watson A, Wayman J, Kelley R, Feugier A, Biourge V. 2018. Increased dietary intake of tyrosine upregulates melanin deposition in the hair of adult black-coated dogs. *Animal Nutrition* **4**:422-428.
- Wayne RK. 2001. Consequences of domestication: morphological diversity of the dog. Pages 43-60 in Ruvinsky A, Sampson J, editors. *The Genetics of the Dog*. CAB International, Wallingford.
- Weich K, Bannasch D, Affolter V, York D, Rebhun R, Grahn R, Kallenberg A. 2020. Pigment intensity in dogs is associated with a copy number variant upstream of KITLG. *Genes* **11**:75.
- Willis MB. 1989. *Genetics of the Dog*. Howell Book House, London 417.

- Xi D, Liu Q, Huo Y, Sun Y, Leng J, Gou X, Mao H, Deng W. 2012. Nucleotide diversity of the melanocortin 1 receptor gene (*MC1R*) in the gayal (*Bos frontalis*). *Molecular Biology Reports: An International Journal on Molecular and Cellular Biology* **39**:7293-7301.
- Yin Q, Tang J, Zhu X. 2019. Next-generation sequencing technologies accelerate advances in T-cell therapy for cancer. *Briefings in Functional Genomics* **18**:119-128.
- Young A, Bannasch D. 2006. Morphological variation in the dog. Pages 47-65 in Ostrander EA, Giger U, Lindblad-Toh K, editors. *The Dog and Its Genome*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
- Zeuner FE. 1963. *A history of domesticated animals*. Hutchinson, London.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational biology* **7**:203-214.
- Zhou X, Ren L, Meng Q, Li Y, Yu Y, Yu J. 2010. The next-generation sequencing technology and application. *Protein* **1**:520-536.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

α MSH	melanocyty stimulující hormon
<i>ASIP</i>	gen pro agouti signální protein
ATP	adenosintrifosfát
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pair, komplementární pár bází
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
<i>CBD103</i>	gen pro betadefensin 103
CFA	autosomální chromozóm psa
CNV	polymorfizmy počtu kopií segmentů DNA
ddNTP	dideoxynukleosidtrifosfáty
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
dNTP	deoxynukleosidtrifosfáty
DOPA	3,4-dihydroxyfenilalanin
DQ	dopachinon
FCI	mezinárodní kynologická organizace
H _E	očekávaná heterozygotnost
H _O	pozorovaná heterozygotnost
ICK	inhibitor cystinového uzlu
kb	kilo base pairs, kilobáze
Mbp	megabáze
<i>MC1R</i>	gen pro melanokortinový receptor 1
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
<i>MITF</i>	gen pro transkripční faktor spojený s mikroftalmií
<i>MLPH</i>	gen pro melanofilin
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
MUSCLE	Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	polymerázová řetězová reakce
<i>POMC</i>	gen pro proopiomelanokortin
<i>PSMB7</i>	gen pro proteazomální podjednotka beta 7
<i>RALY</i>	gen pro jaderný heterogenní ribonukleoprotein
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
SINE	krátké rozptýlené jaderné elementy
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
TE	tris-EDTA pufr
TAE	tris-acetát-EDTA pufr
TBE	tris-borát-EDTA pufr
<i>TYRP1</i>	gen pro tyrosináze příbuzný protein 1
<i>TYRP2</i>	gen pro dopachrom tautomeráza, někdy také DCT

10 Samostatné přílohy

Příloha 1: Standard plemene holandský ovčák

FEDERATION CYNOLOGIQUE INTERNATIONALE

Secretariat General: 13, Place Albert I–B 6530 THUIN (Belgie)

FCI-Standard č. 223 / 21.10.2009

Překlad: Ing. H. Petrusová

HOLANDESKÝ OVČÁK

(Hollandse Herdershond)

ZEMĚ PŮVODU: Nizozemí

DATUM PUBLIKACE PLATNÉHO STANDARDU: 28.07. 2009

POUŽITÍ: Společenský a ovčácký pes.

KLASIFIKACE FCI:

Skupina 1	Ovčáčtí a pastevečtí psi.
Sekce 1	Ovčáci.
Bez zkoušky z výkonu.	

KRÁTKÝ HISTORICKÝ PŘEHLED: Původně byl holandský ovčák především venkovský ovčácký pes. Holanďané měli odedávna ornou půdu, kterou – kromě jiného – udržovala stáda ovcí. Psi měli držet ovce stranou od úrody, což dělali tak, že hlídali hranici mezi silnicí a polem. Doprovázeli stádo při cestě na louky, trhy a do přístavů. Na farmách drželi slepice dál od zeleninové zahrady, sháněli krávy k dojení, a tahali mlékařské káry. Také upozorňovali farmáře, pokud někdo cizí přišel na dvůr. Kolem roku 1990 zmizela stáda ovcí z větší části Nizozemí. Všestranné schopnosti učinily holandského ovčáka vhodným k výcviku, který začal být v té době populárním. Tak začala jeho nová kariéra jako policejního psa, jako stopaře a pátracího psa a jako vodícího psa pro nevidomé. Samozřejmě je dodnes schopný se starat o stádo ovcí. První standard plemene pochází z 12.6.1898.

CELKOVÝ VZHLED: Střední velikosti, středně těžký, dobře osvalený pes silné a harmonické stavby těla. Pes s velkou vytrvalostí, živým temperamentem a inteligentním výrazem. Podle typu srsti je plemeno rozděleno do tří variet: krátko, dlouho a hrubosrsté.

DŮLEŽITÉ PROPORCE: Délka těla (od ramenního kloubu k sedacím hrbolům) přesahuje výšku v kohoutku, přibližný poměr 10:9, což vyhovuje pohybu v klusu. Poměr délky mozkovny k tlamě je 1:1.

POVAHA/TEMPERAMENT: Velmi věrný a spolehlivý, vždy ostražitý, pozorný, čilý, samostatný, vytrvalý, inteligentní, poslušný a nadaný s temperamentem typického ovčáka. Holandský ovčák ochotně pracuje se svým pánem a samostatně se zabývá jakýmkoli úkolem, který mu byl přidělen. Při práci s větším stádem musí být schopný pracovat společně s několika dalšími psy.

HLAVA: Proporční k tělu, při pohledu shora a ze strany klínovitá. Spíše podlouhlá, bez vrásek; suchá, líce ploché bez výrazných lících kostí. Díky osrstění se hlava hrubosrsté variety zdá být více čtyřúhelníková, ale jde pouze o optický klam.

MOZKOVNA:

Lebka: Plochá.

Stop: Mírný, přesto jasně patrný.

OBLIČEJOVÁ ČÁST:

Tlama: Mírně delší než ploché čelo. Nosní hřbet rovný a rovnoběžný s horní linií lebky.

Nosní houba: Černá.

Pysky: Přilehlé a dobře pigmentované.

Čelisti/Zuby: Nůžkový skus, silný, pravidelný a kompletní.

Oči: Tmavé, střední velikosti. Mandlového tvaru, mírně šikmé. Oči by neměly být posazené příliš daleko od sebe a ne vystupující.

Uši: Střední velikosti. Při vzrušení vysoko nesené a vztyčené.

KRK: Ne příliš krátký, suchý, bez volné kůže, pozvolna přecházející do trupu.

TRUP: Pevný, ale ne těžký.

Horní linie: Hladký pozvolný přechod šíje do horní linie těla, hlava a krk přirozeně nesené.

Hřbet: Rovný a pevný.

Bedra: Pevná, ne dlouhá či úzká.

Zád: Mírně šikmá, ne krátká.

Spodní linie a břicho: Lehce vtažená.

Hrudník: Hluboký a dostatečně dlouhý, ne úzký, žebra mírně klenutá.

Předhrudí: Dobře vyvinuté.

OCAS: V klidu svěšený rovně dolů, nebo lehce prohnutý. Dosahuje ke hlezňům. V pohybu elegantně nesený vzhůru, nikdy stočený nebo nesený do strany.

KONČETINY:

HRUDNÍ KONČETINY: Silné, dobré délky, dobře osvalené. Kostí pevné, ale ne těžké. V zásadě rovné, ale s dostatečně pružnými nadprstími.

Lopatky: Dobře přiléhající k tělu a dostatečně šikmé.

Nadloktí: Přibližně stejně dlouhá jako lopatky a dobře zaúhlená s přiléhajícími kostmi.

Lokty: Dobře přiložené k tělu.

Přední tlapy: Oválné. Sevřené, prsty klenuté. Černé drápy a pružné černé polštářky.

PÁNEVNÍ KONČETINY: Pánevní končetiny jsou silné a dobře osvalené. Kostí pevné, ale nikdy ne těžké. Ne přehnaně zaúhlené.

Stehna a bérce: Přibližně stejné délky.

Hlezna: Kolmo pod sedacími hrboly.

Paspárky: Nejsou.

Zadní tlapy: Oválné. Sevřené, prsty klenuté. Černé drápy a pružné černé polštářky.

CHODY / POHYB: Holandský ovčák je klusák s volným, plynulým a pružným pohybem, bez přehnaně výrazného nakročení či délky chodu.

OSRSTĚNÍ:

SRST:

Krátká: Po celém těle poměrně tvrdá, pevně přilehlá, ne příliš krátká srst s bohatou podsadou. Límeček, kalhotky a delší srst na ocase jsou jasně patrné.

Dlouhá: Po celém těle dlouhá, rovná, přiléhavá, na omak hrubá srst bez kudrn a vln s bohatou podsadou. Zřetelný límeček a kalhotky. Ocas bohatě osrstěný.

Hlava, uši, tlapy a pánevní končetiny pod hlezny jsou kryté krátkou hustou srstí. Zadní strana hrudních končetin je silně osrstěná tzv. praporci, které se směrem k tlapkám zkracují. Uši bez třásní.

Hrubá: Po celém těle kromě hlavy hustá, tvrdá, rozčuchaná srst s měkkou hustou podsadou. Srst by měla být přilehlá. Horní a dolní pysk dobře kryté srstí, kníry a bradkou; nad očima dobře vyvinuté hrubé obočí, které je výrazné, ale ne přehnané. Na lebce a lících srst poněkud kratší. Při pohledu ze strany se hlava zdá být kvadratická. Ocas celý krytý srstí. Silně vyvinuté kalhotky jsou žádoucí.

Žíhané zbarvení může být díky rozčuchané srsti méně výrazné.

Hrubá srst by mohla být v průměru dvakrát ročně trimovaná.

BARVA:

Žíhaná. Základní barva je zlatá nebo stříbrná. Zlatá od světlé pískové až po kaštanovou. Žíhání je jasně zřetelné po celém těle, na límci, kalhotkách a ocasu. Příliš mnoho černé není žádoucí. Černé masce je dáována přednost.

Bílé znaky na hrudi a tlapkách nejsou žádoucí.

VÝŠKA A HMOTNOST:

<u>Výška v kohoutku:</u>	Psi:	57 – 62 cm
	Feny:	55 – 60 cm

VADY: Jakákoliv odchylka od výše uvedených znaků by měla být považovaná za vadu a vážnost, s níž je vada posuzována, by měla být v přímém poměru k jejímu stupni a jejímu vlivu na funkční zdraví a pohodu psa.

VYLUČUJÍCÍ VADY:

- Agresivita nebo přehnaná bázlivost.
- Každý jedinec jasně vykazující fyzické nebo psychické abnormality musí být diskvalifikován.
- Nedostatek plemenného typu.

Pozn.:

- Psi (samci) musejí mít dvě zjevně normálně vyvinutá varlata, plně sestouplá v šourku.
- Pouze funkčně a klinicky zdraví jedinci se znaky typickými pro plemeno mohou být použiti k chovu.

Příloha 2: Fotografie holandských ovčáků před a po ztrátě žihání s různou intenzitou.



Fena B'Onze Liefde Hollandse Ster ve věku 7 měsíců (vlevo) a 8 let (vpravo). Autor: Nikola Kratochvílová (první fotografie), Jana Hofferová (druhá fotografie)



Pes Achilles Kimjo Ambrasion ve věku 2 roky (vlevo) a 7 let (vpravo). Autor: Lenka Krejčová



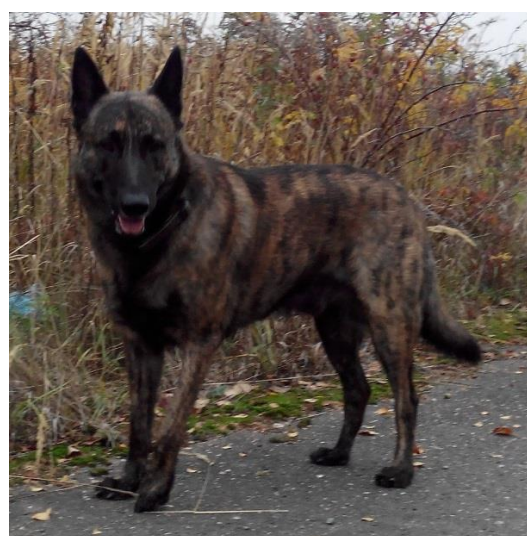
Fena Brita of Jenny's smile ve věku 1 rok (vlevo) a 3 roky (vpravo). Autor: Markéta Čerňanská



Pes Al Pacino Hollandse Ster ve věku 4 roky (vlevo) a 10 let (vpravo). Autor: Monika Erbenová



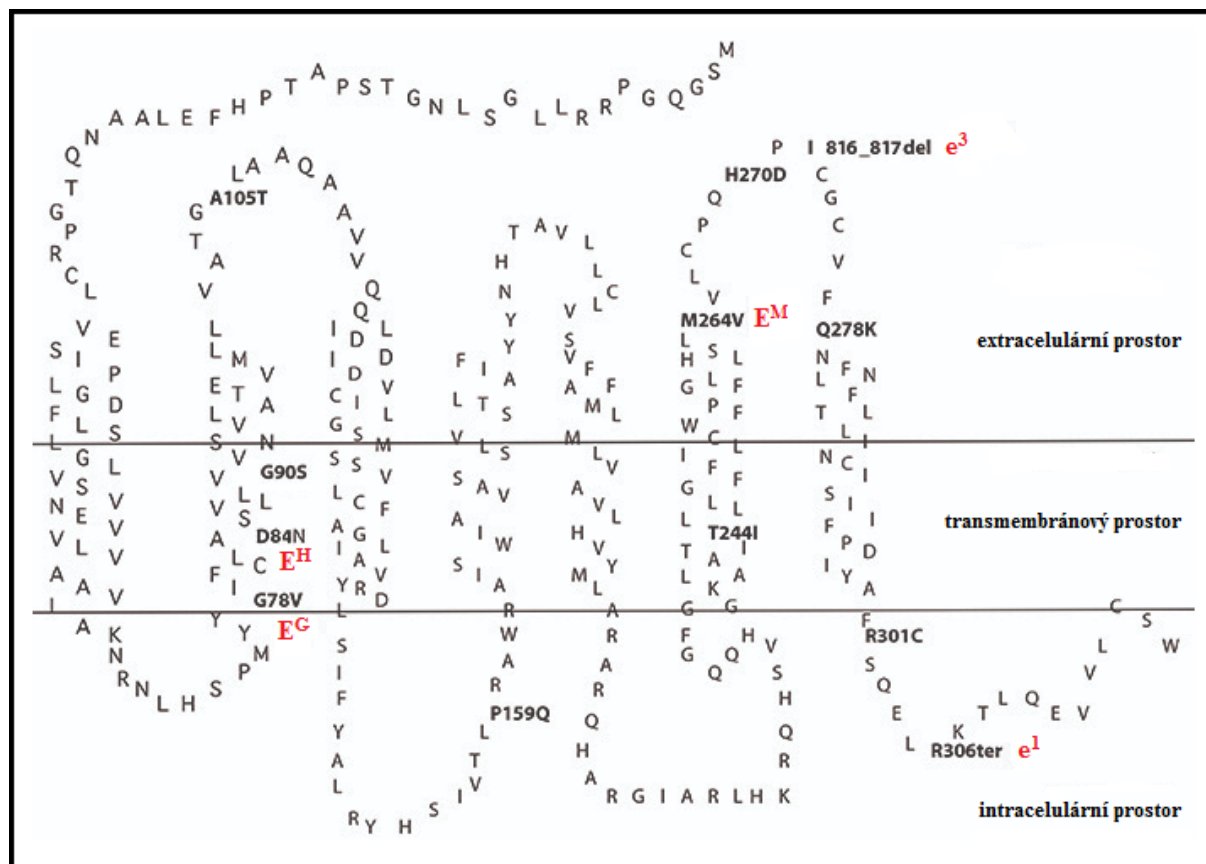
Fena Ally Axis of Jenny's smile ve věku 1 rok (vlevo) a 6 let (uprostřed a vpravo). Autor: Kamila Kudrnová (první fotografie), Jana Hofferová (další dvě fotografie)



Pes Bennua Garr Hollandse ster v věku 2 roky (vlevo) a 6 let (vpravo). Autor: Monika Erbenová

Příloha 3: Dvoudimenzionální struktura proteinu MC1R se znázorněnými mutacemi.

V obrázku jsou použity mezinárodní jednopísmenné zkratky aminokyselin (upraveno podle Schmutz (2018)).



Příloha 4: Návod k odběru DNA bukláním stěrem.

Postupujte prosím podle níže uvedených pokynů:

1. Před odběrem vzorků se ujistěte, že pes nejedl nic po dobu alespoň 30 minut. V opačném případě může být vzorek kontaminován částicemi potravy.
2. Vyjměte kartáček z obalu a umístíte ho mezi tvář a dásně psa a po dobu 30 sekund mírným tlakem na sliznici tváře kartáčkem otáčejte.
3. Vložte kartáček do obálky a zalepte ji. Je důležité, aby kartáček nebyl vložen zpět do původního obalu; vlhkost zachycená v plastovém obalu by mohla vést k růstu bakterií. Tento bakteriální růst může DNA degradovat.

Please follow the instructions below:

1. Prior to sample collection, please make sure that the dog has not eaten anything for at least 30 minutes. Otherwise, the sample can be contaminated with food particles.
2. Begin by removing the brush from the wrapper and placing it in the cheek of the dog and twist the brush between the dog's cheek and gums for about 30 seconds.
3. Place brush in the envelope and seal it. Do not place the brush back in its wrapper; moisture trapped within the plastic wrapper could lead to bacterial growth. This can disintegrate the DNA.

Příloha 6: Pozice primerů použitých k analýze SINE inserce v intronu 1 genu *ASIP*

Pozice primerů jsou označeny zelenou barvou. Symbol > nebo < ukazuje směr amplifikace. Modře je zvýrazněná sekvence SINE inserce (Ciampolini et al. 2012), která se vyskytuje u jedinců s alelou a^l nebo a , kdežto u jedinců s alelami a^w a a^y tato inserce chybí.

```

1 ATCTATGGAGGAATGTCTTTATTTTACTTTTGAAGGACAGTTTCACCGAATATAGGATT
61 CTCAGCTGATAGTTTTTTTCTTTTAGTACCTCAAATATATCTGCCTACTGTCTTCTGGCC
121 TTTAAAGTTTTCGATGAAAAATATGCTAATCATCTTGTGAGGATCCCTTGTATGTGATT
181 AGTAGCTTCTCTCTTGCTAATTTCAAGAACTACATTTGTCTTATCTTTTGCAAATTTGA
241 TTCATTTTTTTTTTTAATTTTATTTTTTTGATTTTTTATTTATGATAGTCACACACACACA
301 GAAAGAGAGGCAGAGACGCAGGCAGAGGGAGAAGCAGGCTCCATGCACCAGGAGCCCGAC
361 GTGGGATTCGATCCCAGGCTCCAGGATCGCGCCCTGGGCCAAAGGGCAGGCGCCAAACC
421 GCTGCGCCACCCAGGGATCCC TAATGTGTTTCTTACCTGACCATCTTCTGAAATTCTCT

```

Příloha 7: Pozice primerů použitých k analýze mutací v exonu 4 genu *ASIP*

Pozice primerů jsou označeny zelenou barvou. Symbol > nebo < ukazuje směr amplifikace. Kódující sekvence je označena šedou barvou. Mutace jsou zvýrazněné modrou barvou. Jelikož se v sekvenci vyskytují mutace c.244G>T a c.248G>A, má jedinec genotyp $a^y a^y$.

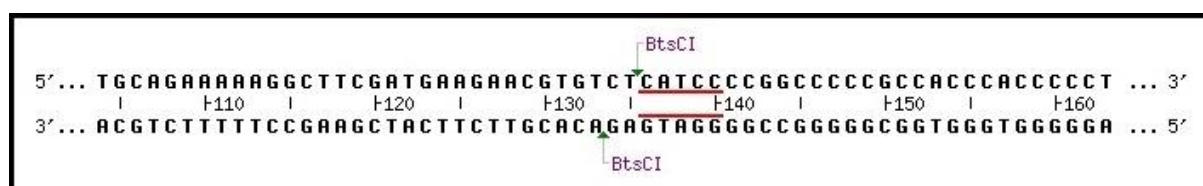
```

1 GGGTGGGGATGTCTGGTCTGGGGCTCCATGGACAGCCCAAGGAGTTCCGAGACAGACGT
61 GAGGACAGGTGGGGTGGACGTGGCCGGCTTGGGCAGCCCTGGCGTTTCCCTGCAGAAAAA
121 GGCTTCGATGAAGAACGTGTCCTCATCCCCGGCCCCCGCCACCCACCCCTGCGTGGCCAC
181 TCGCAACAGCTGCAAGTCCCCGGCGCCCGCTGCTGTGACCCCTGCGCCTCCTGCCAGTG
241 CCGCTTCTTCCGCAGCGCTGCACCTGCCCGGTTCTCAGTCCCAGATGCTGAGCGCGCCC

```

Příloha 8: Analýza štěpení enzymem BtsCI v exonu 4 genu *ASIP*

Na výstupu analýzy štěpení ze softwaru NEBcutter v2.0 (Vincze et al. 2003) je červeně podtržena rozpoznávaná sekvence enzymem BtsCI a zelenými šipkami jsou označena místa, ve kterých tento enzym štěpí amplifikovaný úsek exonu 4 genu *ASIP*. Ze sekvence vyplývá, že štěpení probíhá pouze u jedince s alelou a^y .



Příloha 9: Pozice primerů *CBD103_ex2* použitých k analýze alely k^y genu *CBD103*

Pozice primerů jsou označeny zelenou barvou. Symbol > nebo < ukazuje směr amplifikace. Kódující sekvence je označena šedou barvou. Trojice nukleotidů, která je typická pro alelu k^y , je zvýrazněná modrou barvou.

```
1 AGCTTTCGGGCACGTTCTGTTTTTTTTCTTTGCAGGAAATGGGGGAATTATAAAATACCCTG
61 CAGAGGTATTATTGCAGAATAAGGAGCGGTTCGGTGCGCCTTGCTGAGCTGCCTGCCAAAG
121 GAGGAGCAGATAGGCCGCTGTTCTTCCACTGGCCGAAAATGCTGCCGAAGAAAGAAAATAA
181 AAAAATCCAGAAATGGGATGGGAGCGTTGTAAAGTGTGAAAATGCCTCCTGGAAGTTTAT
```

Příloha 10: Pozice primerů *CBD103_ex2del* použitých k analýze alely K^B genu *CBD103*

Pozice primerů jsou označeny zelenou barvou. Symbol > nebo < ukazuje směr amplifikace. Kódující sekvence je označena šedou barvou. Pozice delece tří nukleotidů, díky níž vznikla alela K^B , je označena lomítkem a zvýrazněná modrou barvou.

```
1 AGCTTTCGGGCACGTTCTGTTTTTTTTCTTTGCAGGAAATGGG/ATTATAAAATACCCTGCA
61 GAGGTATTATTGCAGAATAAGGAGCGGTTCGGTGCGCCTTGCTGAGCTGCCTGCCAAAGGA
121 GGAGCAGATAGGCCGCTGTTCTTCCACTGGCCGAAAATGCTGCCGAAGAAAGAAAATAAAA
181 AAATCCAGAAATGGGATGGGAGCGTTGTAAAGTGTGAAAATGCCTCCTGGAAGTTTATAG
```

Příloha 11: Porovnání sekvence jedince č. 1 s referenční sekvencí pro gen *MC1R*

Výstup z programu BLAST ukazuje 100% shodu sekvencí a tedy vysokou kvalitu amplifikace.

MC1R

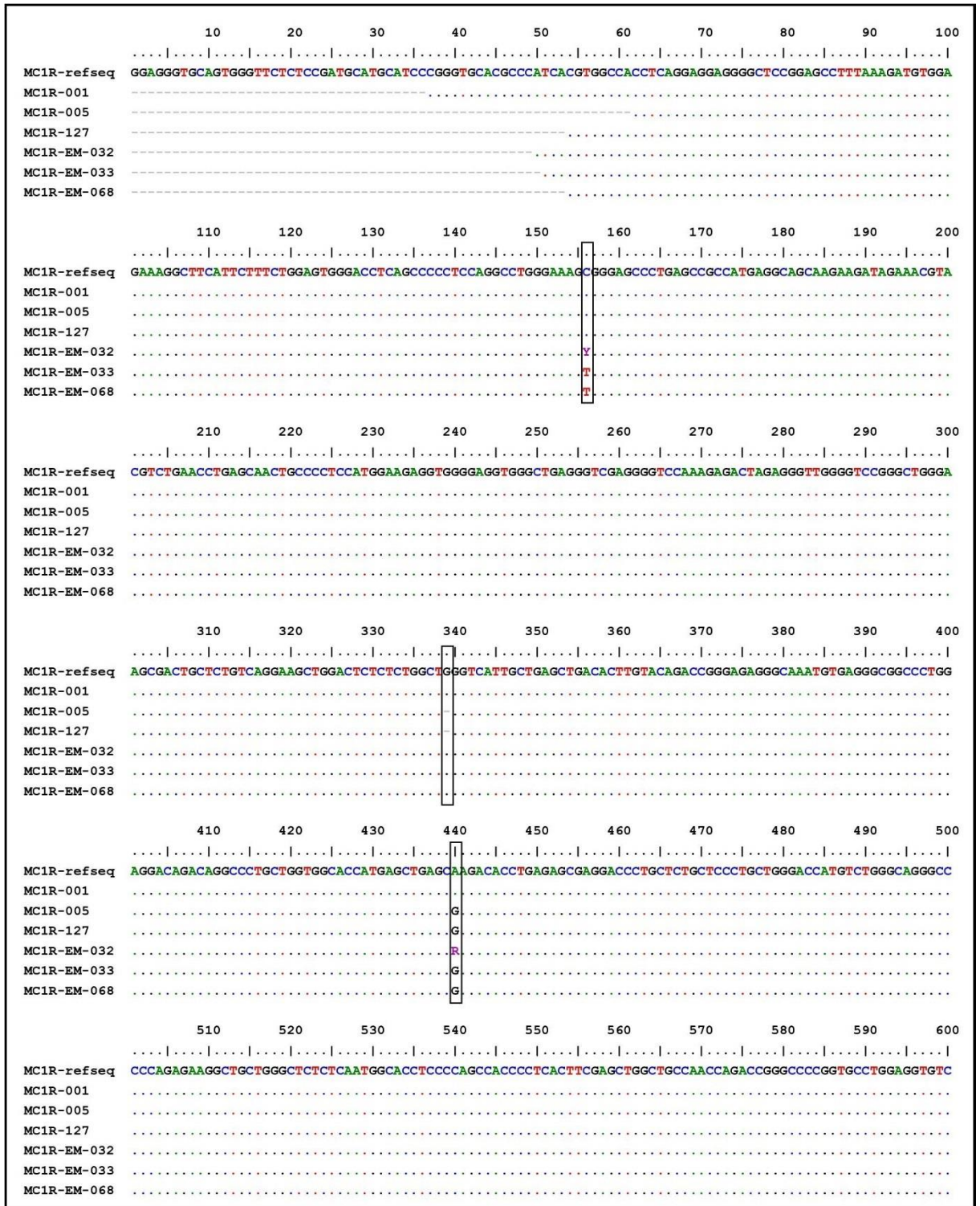
Range 1: 1 to 1426

Score	Identities	Gaps	Strand
2634 bits(1426)	1426/1426 (100%)	0/1426 (0%)	Plus/Plus
Query 37	CGGGTGCACGCCATCACGTGGCCACCTCAGGAGGAGGGGCTCCGGAGCCTTTAAAGATG		96
Sbjct 1	CGGGTGCACGCCATCACGTGGCCACCTCAGGAGGAGGGGCTCCGGAGCCTTTAAAGATG		60
Query 97	TGGAGAAAGGCTTCATTCTTTCTGGAGTGGGACCTCAGCCCCCTCCAGGCCTGGGAAAGC		156
Sbjct 61	TGGAGAAAGGCTTCATTCTTTCTGGAGTGGGACCTCAGCCCCCTCCAGGCCTGGGAAAGC		120
Query 157	GGGAGCCCTGAGCCGCCATGAGGCAGCAAGAAGATAGAAACGTACGTCTGAACCTGAGCA		216
Sbjct 121	GGGAGCCCTGAGCCGCCATGAGGCAGCAAGAAGATAGAAACGTACGTCTGAACCTGAGCA		180
Query 217	ACTGCCCCCTCCATGGAAGAGGTGGGGAGGTGGGCTGAGGGTTCGAGGGTCCAAAGAGACT		276
Sbjct 181	ACTGCCCCCTCCATGGAAGAGGTGGGGAGGTGGGCTGAGGGTTCGAGGGTCCAAAGAGACT		240
Query 277	AGAGGGTTGGGGTCCGGGCTGGGAAGCGACTGCTCTGTCAGGAAGCTGGACTCTCTCTGG		336
Sbjct 241	AGAGGGTTGGGGTCCGGGCTGGGAAGCGACTGCTCTGTCAGGAAGCTGGACTCTCTCTGG		300
Query 337	CTGGGTCATTGCTGAGCTGACACTTGTACAGACCGGGAGAGGGCAAATGTGAGGGCGGCC		396
Sbjct 301	CTGGGTCATTGCTGAGCTGACACTTGTACAGACCGGGAGAGGGCAAATGTGAGGGCGGCC		360

Query	397	CTGGAGGACAGACAGGCCCTGCTGGTGGCACCATGAGCTGAGCAAGACACCTGAGAGCGA	456
Sbjct	361	CTGGAGGACAGACAGGCCCTGCTGGTGGCACCATGAGCTGAGCAAGACACCTGAGAGCGA	420
Query	457	GGACCCTGCTCTGCTCCCTGCTGGGACCATGTCTGGGCAGGGCCCCAGAGAAGGCTGCT	516
Sbjct	421	GGACCCTGCTCTGCTCCCTGCTGGGACCATGTCTGGGCAGGGCCCCAGAGAAGGCTGCT	480
Query	517	GGGCTCTCTCAATGGCACCTCCCCAGCCACCCCTCACTTCGAGCTGGCTGCCAACCCAGAC	576
Sbjct	481	GGGCTCTCTCAATGGCACCTCCCCAGCCACCCCTCACTTCGAGCTGGCTGCCAACCCAGAC	540
Query	577	CGGGCCCCGGTGCTGGAGGTGTCCATTCCCGACGGGCTGTTCCTCAGCCTGGGGCTGGT	636
Sbjct	541	CGGGCCCCGGTGCTGGAGGTGTCCATTCCCGACGGGCTGTTCCTCAGCCTGGGGCTGGT	600
Query	637	GAGCGTGTGGAAAATGTGCTGGTGGTGGCCGCCATTGCCAAGAACC GCAACCTGCACTC	696
Sbjct	601	GAGCGTGTGGAAAATGTGCTGGTGGTGGCCGCCATTGCCAAGAACC GCAACCTGCACTC	660
Query	697	GCCCCATGTATTACTTCATCGGTTGCCTGGCTGTGTCCGACCTGCTGGTGAGCGTGAGCAA	756
Sbjct	661	GCCCCATGTATTACTTCATCGGTTGCCTGGCTGTGTCCGACCTGCTGGTGAGCGTGAGCAA	720
Query	757	TGTGCTGGAGACGGCCGTCATGCTGCTGGTGGCGGCAGGCCTTGGCTGCTCAGGCTGC	816
Sbjct	721	TGTGCTGGAGACGGCCGTCATGCTGCTGGTGGCGGCAGGCCTTGGCTGCTCAGGCTGC	780
Query	817	TGTGGTGCAGCAGCTGGACGACATCATTGACGTGCTCATCTGTGGTTCCATGGTATCCAG	876
Sbjct	781	TGTGGTGCAGCAGCTGGACGACATCATTGACGTGCTCATCTGTGGTTCCATGGTATCCAG	840
Query	877	CCTCTGCTTCCCTGGGCGCCATTGCCGTGGACCGCTACCTCTCCATCTTCTACGCGCTGCG	936
Sbjct	841	CCTCTGCTTCCCTGGGCGCCATTGCCGTGGACCGCTACCTCTCCATCTTCTACGCGCTGCG	900
Query	937	ATACCACAGCATCGTCACACTCCCGCGGGCGTGGCGGGCCATCTCCGCTATCTGGGTGGC	996
Sbjct	901	ATACCACAGCATCGTCACACTCCCGCGGGCGTGGCGGGCCATCTCCGCTATCTGGGTGGC	960
Query	997	TAGCGTCCTCTCCAGCAGCGCTCTTCATTGCCTACTACAATCACACGGCCGTCCTGCTTTG	1056
Sbjct	961	TAGCGTCCTCTCCAGCAGCGCTCTTCATTGCCTACTACAATCACACGGCCGTCCTGCTTTG	1020
Query	1057	TCTTGT CAGCTTCTTTGTAGCCATGCTGGTGCATGGCAGTGCTGTACGTCCACATGCT	1116
Sbjct	1021	TCTTGT CAGCTTCTTTGTAGCCATGCTGGTGCATGGCAGTGCTGTACGTCCACATGCT	1080
Query	1117	TGCCCGCGCCTGCCAGCAGCCCCGAGGTATTGCCCGGCTCCATAAGAGGCAGCACTTCAT	1176
Sbjct	1081	TGCCCGCGCCTGCCAGCAGCCCCGAGGTATTGCCCGGCTCCATAAGAGGCAGCACTTCAT	1140
Query	1177	CCCCAGGGCTTTGGCCTCAAGGGCGCTGCCACACTCACTATCCTGCTGGGCATTTTCTT	1236
Sbjct	1141	CCCCAGGGCTTTGGCCTCAAGGGCGCTGCCACACTCACTATCCTGCTGGGCATTTTCTT	1200
Query	1237	TCTCTGCTGGGGCCCTTCTTCTTGACCTCTCACTCGTGGTCTCTGCCCTCAACACCC	1296
Sbjct	1201	TCTCTGCTGGGGCCCTTCTTCTTGACCTCTCACTCGTGGTCTCTGCCCTCAACACCC	1260
Query	1297	CATCTGTGGCTGCGTCTTT CAGA AACTTCAACCTCTTCTCACCCCTCATCATCTGCAACTC	1356
Sbjct	1261	CATCTGTGGCTGCGTCTTT CAGA AACTTCAACCTCTTCTCACCCCTCATCATCTGCAACTC	1320
Query	1357	CATCAT TGACCCCTT CATCTACGCCTTCCG CAGCCAGGAGCTCCGAAAGACTCTCCAAGA	1416
Sbjct	1321	CATCAT TGACCCCTT CATCTACGCCTTCCG CAGCCAGGAGCTCCGAAAGACTCTCCAAGA	1380
Query	1417	GGTAGTGCTATGTTCTGGT GAGGCTGCAGGCTTGAGGCCAGGGTG	1462
Sbjct	1381	GGTAGTGCTATGTTCTGGT GAGGCTGCAGGCTTGAGGCCAGGGTG	1426

Příloha 12: Porovnání sekvencí jedinců č. 1, 5, 32, 33, 68 a 127 a referenční sekvence genu *MC1R*

V pozici 156 se nachází mutace c.-329C>T, v pozici 339 c.-146G>del, v pozici 440 c.-45A>G a v pozici 1274 se nachází mutace c.790A>G, která dává vzniknout alele E^M. Konce sekvencí nejsou identifikované, jelikož má amplicon délku 1500 bp a nebyl tak kvalitně osekvenován až na konec fragmentu.



	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
MC1R-refseq	TGTGGCTGCGTCTTT	CAGAAGTCAACCTCTT	CCCTCAACCTCATCATCTGCAACTCCATCATTGACCCCTTCATCTACGCCTTCCGAGCCAGGAGTCC							
MC1R-001
MC1R-005
MC1R-127
MC1R-EM-032
MC1R-EM-033
MC1R-EM-068
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
MC1R-refseq	GAAAGACTCTCCAAGAGGTAGTGCTATGTTCCCTGGTGAGGCTGCAGGCTTGAGGCCAGGGTGCTGGGCAGAGGGGGGTGGTGATTGATACCCATGTGACT									
MC1R-001
MC1R-005
MC1R-127
MC1R-EM-032
MC1R-EM-033
MC1R-EM-068

Příloha 13: Přehled genotypů v detekovaných mutacích genu *MC1R*

Celkem bylo hodnoceno 125 jedinců všech tří variet holandského ovčáka. Věk je uveden v letech a je aktuální k roku 2020. Ve sloupci fenotyp jsou dvě možnosti. Pes s žíhaným fenotypem má klasické černé žíhání, které lze dobře rozeznat. Jedinci s fenotypovou kategorií „bez žíhání“ jsou ti, u kterých je žíhání s časem méně zřetelné. Ve sloupcích s mutacemi je vypsán vždy genotyp jedince, například C C ve sloupci c.-329C>T znamená, že jedinec má v této pozici na obou chromozomech cytosin. Hodnota NA znamená, že u jedince nebyl genotyp dané alely identifikován. Symbol – odpovídá delecii v pozici mutace c.-146G>del.

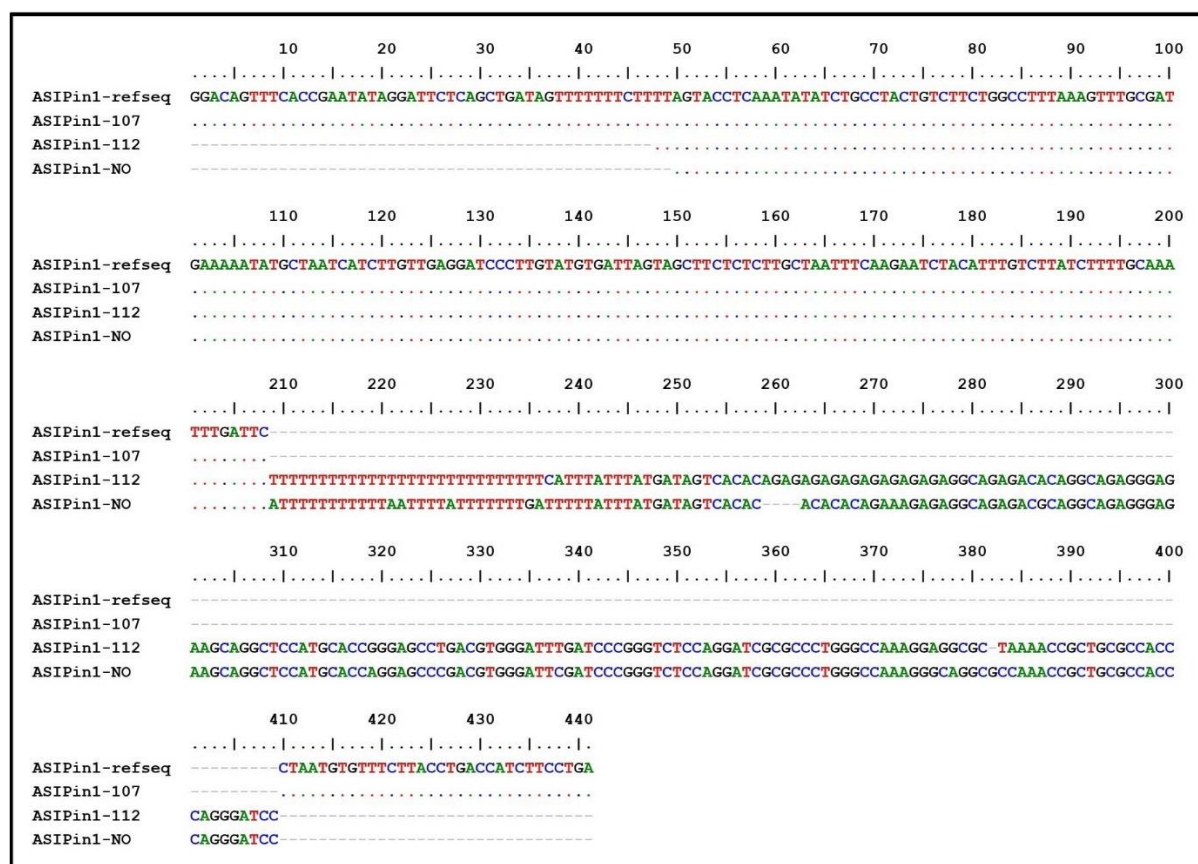
Vzorek	Pohlaví	Věk	Fenotyp	c.-329C>T	c.-146G>del	c.-45A>G	c.790A>G
1	fena	3	žíhaný	C C	G G	A A	G G
2	fena	3	žíhaný	C C	G G	G A	G G
3	pes	6	žíhaný	C C	G G	A A	G G
4	pes	3	žíhaný	C C	--	G G	G G
5	fena	9	bez žíhání	C C	--	G G	G G
6	fena	2	žíhaný	C C	G –	G A	G G
7	pes	6	žíhaný	C C	G –	G A	G G
8	fena	2	žíhaný	C C	--	G G	G G
9	fena	3	žíhaný	C C	G –	G A	G G
10	fena	8	žíhaný	C C	G –	G A	G G
11	fena	5	žíhaný	C C	G –	G G	G G
12	fena	6	žíhaný	C C	G G	A A	G G
13	fena	6	žíhaný	C C	G –	G A	G G
14	pes	14	žíhaný	NA	NA	NA	NA
15	fena	3	žíhaný	C C	G G	A A	G G
16	pes	4	žíhaný	C C	G –	G A	G G
17	fena	1	žíhaný	C C	G –	G A	G G
18	fena	3	žíhaný	C C	G –	G A	G G
19	fena	11	žíhaný	C C	G –	G A	G G
20	pes	12	žíhaný	C C	G G	A A	G G
21	fena	2	žíhaný	C C	--	G G	G G
22	fena	3	žíhaný	C C	G –	G A	G G
23	fena	2	žíhaný	C C	G –	G A	G G
24	fena	3	žíhaný	C C	G G	A A	G G
25	pes	14	bez žíhání	C C	--	G G	G G

Vzorek	Pohlaví	Věk	Fetotyp	c.-329C>T	c.-146G>del	c.-45A>G	c.790A>G
26	pes	11	žíhaný	C C	G –	G A	G G
27	fena	4	žíhaný	C C	G –	G A	G G
28	fena	12	žíhaný	C C	G G	A A	G G
29	pes	5	žíhaný	C C	--	G G	G G
30	fena	11	bez žíhání	C C	G –	G A	G G
31	fena	5	žíhaný	C C	G –	G A	G G
32	fena	14	žíhaný	C T	G G	G A	G A
33	pes	11	žíhaný	T T	G G	G G	A A
34	fena	11	žíhaný	C C	G –	G A	G G
35	fena	5	žíhaný	C C	G –	G A	G G
36	fena	8	žíhaný	C C	G –	G A	G G
37	pes	12	žíhaný	C C	G –	G A	G G
38	fena	9	žíhaný	C C	G –	G A	G G
39	fena	6	žíhaný	C C	G G	A A	G G
40	fena	6	žíhaný	C C	--	G G	G G
41	pes	9	žíhaný	C C	--	G G	G G
42	fena	3	žíhaný	C C	G G	A A	G G
43	pes	3	žíhaný	C C	G G	A A	G G
44	fena	10	bez žíhání	C C	G –	G A	G G
45	fena	5	žíhaný	C C	--	G G	G G
46	pes	10	bez žíhání	C C	--	G G	G G
47	fena	1	žíhaný	C C	--	G G	G G
48	fena	1	žíhaný	C C	G –	G A	G G
49	fena	1	žíhaný	C C	--	G G	G G
50	pes	1	žíhaný	C C	--	G G	G G
51	fena	5	žíhaný	C C	--	G G	G G
52	pes	2	žíhaný	C C	--	G G	G G
53	fena	8	žíhaný	C C	G –	G A	G G
54	fena	3	žíhaný	C C	G –	G A	G G
55	fena	10	žíhaný	C C	G G	A A	G G
56	fena	7	žíhaný	C C	G G	G A	G G
57	pes	1	žíhaný	C C	G G	G A	G G
58	fena	1	žíhaný	C C	G G	G A	G G
59	pes	1	žíhaný	NA	NA	NA	NA
60	fena	1	žíhaný	C C	G –	G A	G G
61	pes	1	žíhaný	C C	G –	G A	G G
62	pes	1	žíhaný	C C	G G	G A	G G
63	fena	6	žíhaný	C C	G G	A A	G G
64	pes	2	žíhaný	C C	G G	A A	G G
65	fena	8	žíhaný	C C	G –	G A	G G
66	fena	1	žíhaný	T T	G G	G G	A A
67	fena	3	žíhaný	C C	G G	A A	G G
68	pes	3	žíhaný	C C	G G	A A	G G
69	pes	6	žíhaný	C C	G –	G A	G G
70	pes	1	žíhaný	C C	G –	G A	G G
71	pes	1	žíhaný	C C	G –	G A	G G
72	fena	1	žíhaný	C C	G –	G A	G G
73	fena	1	žíhaný	C C	G –	G A	G G
74	fena	1	žíhaný	C C	G –	G A	G G
75	pes	1	žíhaný	C C	G –	G A	G G

Vzorek	Pohlaví	Věk	Fetotyp	c.-329C>T	c.-146G>del	c.-45A>G	c.790A>G
76	fena	1	žiháný	NA	NA	NA	NA
77	pes	6	žiháný	CC	G-	GA	GG
78	fena	10	bez žihání	CC	--	GG	GG
79	fena	9	bez žihání	CC	G-	GA	GG
80	pes	10	žiháný	CC	GG	AA	GG
81	pes	10	žiháný	CC	G-	GA	GG
82	fena	6	bez žihání	CC	G-	GA	GG
83	fena	8	bez žihání	CC	NA	NA	GG
84	fena	7	žiháný	CC	GG	AA	GG
85	fena	2	žiháný	CC	NA	NA	GG
86	fena	1	žiháný	CC	GG	AA	GG
87	pes	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
88	pes	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
89	pes	1	žiháný	CC	GG	AA	GG
90	pes	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
91	fena	3	bez žihání	CC	NA	NA	GG
92	fena	9	žiháný	CC	G-	GA	GG
93	fena	6	bez žihání	CC	GG	AA	GG
94	fena	13	bez žihání	CC	GG	AA	GG
95	pes	7	žiháný	CC	G-	GA	GG
96	pes	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
97	pes	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
98	pes	1	žiháný	CC	--	GG	GG
99	pes	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
100	fena	3	žiháný	CC	G-	GA	GG
101	pes	1	žiháný	CC	--	GG	GG
102	pes	1	žiháný	CC	--	GG	GG
103	pes	1	žiháný	CC	--	GG	GG
104	pes	1	žiháný	CC	G-	GG	GG
105	pes	1	žiháný	CC	G-	GG	GG
106	fena	1	žiháný	CC	--	GG	GG
107	pes	1	žiháný	CC	--	GG	GG
108	pes	1	žiháný	CC	G-	GG	GG
109	pes	1	žiháný	CC	GG	GA	GG
110	pes	1	žiháný	CC	G-	GG	GG
111	fena	1	žiháný	CC	GG	GA	GG
112	pes	1	žiháný	CC	--	GG	GG
113	pes	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
114	pes	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
115	pes	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
116	fena	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
117	fena	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
118	fena	1	žiháný	CC	G-	GA	GG
119	pes	10	bez žihání	CC	G-	GA	GG
120	pes	6	žiháný	CC	G-	GA	GG
121	fena	6	bez žihání	CC	G-	GA	GG
122	pes	7	bez žihání	CC	G-	GA	GG
123	fena	2	žiháný	CC	G-	GA	GG
124	pes	10	bez žihání	CC	GG	AA	GG
125	pes	9	bez žihání	CC	--	GG	GG

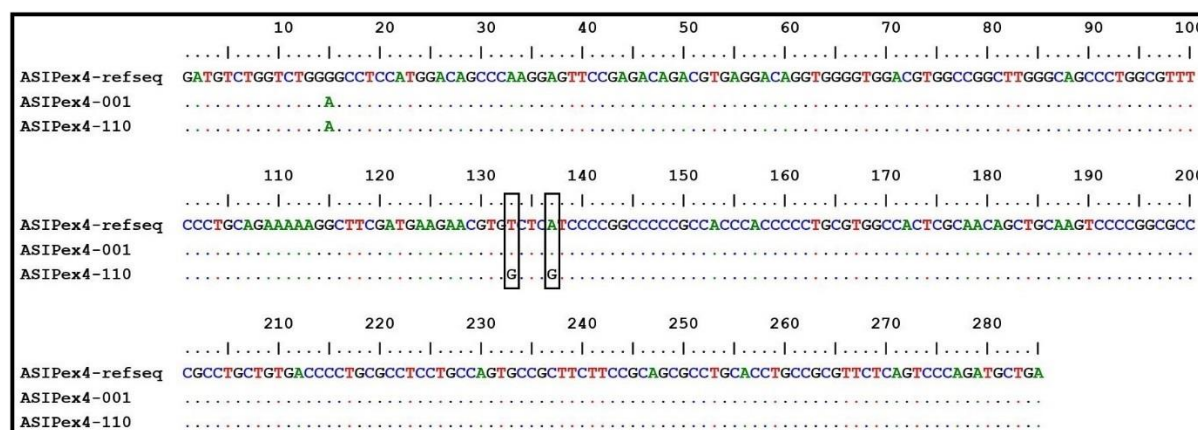
Příloha 14: Porovnání amplifikovaných sekvencí s referenční sekvencí genu *ASIP*.

Obrázek znázorňuje porovnání sekvencí jedinců č. 107 a 112 plemene holandský ovčák, černého německého ovčáka (NO) a referenční sekvence.



Příloha 15: Porovnání amplifikovaných sekvencí s referenční sekvencí genu *ASIP*.

Na obrázku jsou porovnány sekvence jedinců č. 1 a 110 s referenční sekvencí, která má v pozici 133 thymin a v pozici 136 adenin, což je typické pro alelu a^y . Stejné mutace obsahuje i sekvence jedince č. 1 oproti jedinci č. 110, který má na zmíněných pozicích guanin. V důsledku pozměnění sekvence primeru v jednom nukleotidu pro jeho lepší specifitu je u obou amplifikovaných vzorků č. 1 a 110 v pozici 15 adenin a ne guanin, který se v jejich DNA ve skutečnosti nachází.



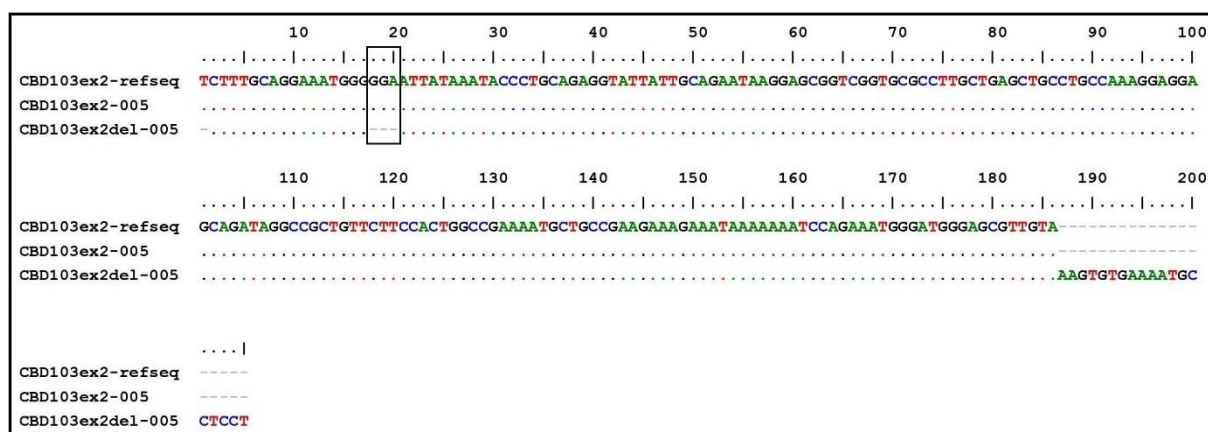
Příloha 16: Přehled genotypů v detekovaných mutacích a výsledných alel genu *ASIP*

V tabulce jsou uvedeni pouze jedinci, kteří byli testováni na výskyt SINE inserce a zároveň mutace g.248G>A. Mezi ně patří štěňata z vrhu, ve kterém se vyskytlo zbarvení žíhané pálení a jejich matka. U ostatních jedinců byl analyzován pouze výskyt SINE inserce. Důvod je vysvětlen v diskuzi. Každému jedinci je v tabulce přiřazeno číslo, uvedeno jeho pohlaví, věk a fenotyp. Fenotyp má dvě možnosti vztažené k projevu genu *ASIP*, žíhaný a pálené žíhání. Dále jsou v tabulce uvedeny genotypy jedinců pro jednotlivé sledované mutace vyjádřené pomocí nukleotidů, které se na dané pozici u daného jedince nachází nebo pomocí symbolů + pro SINE inserci a –, pokud nebyla u jedince detekována.

Vzorek	Pohlaví	Věk	Fenotyp	SINE inserce	c. 248G>A	výsledný genotyp
11	fena	5	žíhaný	+ –	G A	a ^y a ^t
103	pes	1	pálené žíhání	++	G G	a ^t a ^t
104	pes	1	pálené žíhání	++	G G	a ^t a ^t
105	pes	1	žíhaný	--	A A	a ^y a ^y
106	fena	1	pálené žíhání	++	G G	a ^t a ^t
107	pes	1	žíhaný	+–	G A	a ^y a ^t
108	pes	1	pálené žíhání	++	G G	a ^t a ^t
109	pes	1	žíhaný	+–	G A	a ^y a ^t
110	pes	1	pálené žíhání	++	G G	a ^t a ^t
111	fena	1	žíhaný	+–	G A	a ^y a ^t
112	pes	1	žíhaný	+–	G A	a ^y a ^t

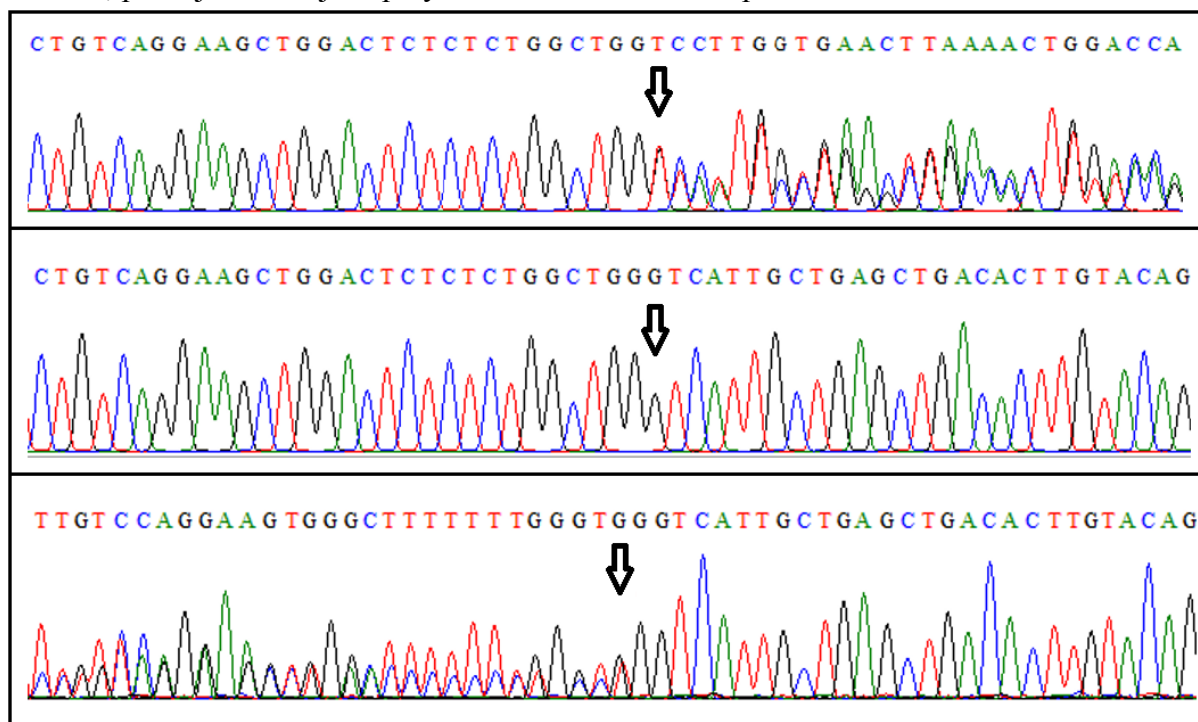
Příloha 17: Porovnání amplifikovaných sekvencí s referenční sekvencí genu *CBD103*.

Na obrázku jsou porovnány sekvence jedince č. 5 získané použitím různých dvojic primerů. Referenční sekvence obsahuje v pozici 18 – 20 trojici nukleotidů, jejíž výskyt je typický pro alelu k^y. Oproti tomu alela K^B je charakteristická delecí těchto tří nukleotidů.



Příloha 18: Porovnání hrubých dat sekvencí heterozygota (G –) s referenční sekvencí

V horní části je výsledek sekvenace heterozygota (G –) s primerem MC1R-F. Při porovnání s referenční sekvencí (uprostřed) lze vidět od pozice delece (označena šipkou) zdvojené píky. To samé platí pro sekvenaci s primerem MC1R_EB-R, kdy má výsledná sekvence (dole) od pozice delece také zdvojené píky. Tato sekvence byla pro názornost reversně komplementárně otočena, proto jsou zdvojené píky směrem doleva a ne doprava.



Příloha 19: Fotografie holandských ovčáků s nestandardním zbarvením žíhané pálení



Fena Amidala Stripespeed (vlevo) a její bratr Ace Ventura Stripespeed (vpravo), oba staří 1 rok
Zdroj: CHS Stripespeed