

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vývoj molekulárních markerů pro detekci kauzálních
mutací genů zodpovědných za nestandardní strukturu
a délku srsti u plemene československý vlčák**

Diplomová práce

**Bc. Barbora Karásková
Biotechnologie a šlechtění zvířat**

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vývoj molekulárních markerů pro detekci kauzálních mutací genů zodpovědných za nestandardní strukturu a délku srsti u plemene československý vlčák" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce doc. Dr. Ing Pavlu Vejlovi za jeho velkoryse věnový čas při realizaci mé diplomové práce, čehož si velice vážím. Ing. Daniele Čílové a Ing. Jakobovi Vaškovi, Ph.D. za cenné konzultace a za vřelou ochotu, které se mi dostávalo.

Vývoj molekulárních markerů pro detekci kauzálních mutací genů zodpovědných za nestandardní strukturu a délku srsti u plemene československý vlčák

Souhrn

V diplomové práci byla řešena kauzalita mutace genu *KRT71*, jejíž fenotypovým projevem je kadeřavá srst a kauzalita mutace genu *FGF5* s fenotypovým projevem dlouhé srsti u plemene československý vlčák. Byl sledován výskyt mutací obou těchto genů a jejich případná kumulace v genotypu jedince. Jako kauzální mutace dlouhé srsti u plemene československý vlčák byla identifikována substituční mutace genu *FGF5* c.284G>T.

Doposud byly popsány u *Canis lupus familiaris* napříč plemeny dvě kauzální mutace genu *KRT71* ve spojitosti s kadeřavou strukturou srsti. Mutace c.1266_1273delinsACA byla identifikována jako fixní pro plemeno curly coated retrívr. Substituční mutace c.451C>T byla pozorována u několika plemen s kadeřavou strukturou srsti. Kadeřavý fenotyp srsti je u československého vlčáka v jeho plemenném standardu definován jako vada vylučující jedince z chovu. Frekvence tohoto fenotypu je proto nízká, nicméně mutovaná alela má své zastoupení v heterozygotní sestavě. Testovaná populace československých vlčáků byla záměrně sestavena tak, aby obsahovala jedince s nestandardní strukturou srsti. U všech jedinců byla provedena izolace genomické DNA získaná bukalím stěrem. Byly navrženy dvojice primerů pro obě mutace genu *KRT71* a pro substituční mutaci genu *FGF5*. Amplikony byly separovány gelovou elektroforézou a následně sekvenovány. Sekvence potvrdila kauzalitu mutace c.451C>T genu *KRT71* u plemene československý vlčák. Neboť mutace c.451C>T způsobuje zánik restrikčního místa pro štěpení enzymem *AciI*, lze identifikovat genotyp jedinců metodou PCR-RFLP. Takto byly stanoveny genotypy a identifikováni jedinci nesoucí mutovanou alelu genu *KRT71*. I případě mutace c.284G>T genu *FGF5*, dochází ke ztrátě restrikčního místa, rozpoznávaného enzymem *PstI* a pro genotypizaci jedinců byla rovněž použita metoda PCR-RFLP.

Vyhodnocením získaných molekulárních dat byly vypočteny četnosti a frekvence genotypů i alel obou genů. U obou genů byla statisticky analyzována heterozygotnost pozorovaná a heterozygotnost očekávaná ve vztahu k Hardy-Weinbergově rovnováze, přičemž signifikance rozdílu byla zjištěna pouze u genu *KRT71*. Možnou příčinou signifikantního rozdílu byl výběr jedinců do hodnocené populace s očekávaným výskytem mutované alely v homozygotní či v heterozygotní sestavě.

Klíčová slova: *Canis lupus f. familiaris*, československý vlčák, nestandardní struktura a délka srsti, *KRT71*, *FGF5*, mutace

Development of molecular markers for the detection of causal gene mutations responsible for the non-standard structure and length of coat in the Czechoslovak wolfdog breed

Summary

In the diploma thesis, the causality of the mutation of the *KRT71* gene, whose phenotypic manifestation is curly fur, and the causality of the mutation of the *FGF5* gene with the phenotypic manifestation of long fur in the Czechoslovak wolfdog breed were observed. The occurrence of mutations of both these genes and their possible cumulation in the individual's genotype was monitored. A substitution mutation of the *FGF5* gene c.284G>T was identified as the causal mutation of the long coat in the Czechoslovak wolfdog. So far, two causal mutations of the *KRT71* gene have been described in *Canis lupus familiaris* across breeds with the curly coat structure. The mutation c.1266_1273delinsACA was identified as fixed for the curly coated retriever. The substitution mutation c.451C>T has been observed in several breeds with a curly coat structure. The curly hair phenotype of the Czechoslovak wolfdog is defined in its breeding standard as a defect excluding individuals from breeding. The frequency of this phenotype is therefore low. However, the mutated allele is represented in the heterozygous set. The tested population of Czechoslovak wolfdogs was deliberately assembled in such a way as to contain individuals with a non-standard coat structure. Isolation of genomic DNA obtained by buccal swab was performed in all individuals. Primer pairs were designed for both mutations of the *KRT71* gene and for the substitution mutation of the *FGF5* gene. Amplicons were separated by gel electrophoresis and subsequently sequenced. Sequencing confirmed the causality of the c.451C>T mutation of the *KRT71* gene in the Czechoslovak wolfdog. Because the c.451C>T mutation causes the disappearance of the restriction site for cleavage by the *AciI* enzyme, the genotype of individuals can be identified by the PCR-RFLP method. In this way, genotypes were determined and individuals carrying a mutated allele of the *KRT71* gene were identified. Even in the case of the c.284G>T mutation of the *FGF5* gene, the restriction site recognized by the *PstI* enzyme is lost, and the PCR-RFLP method was also used for the genotyping of individuals. By evaluating the obtained molecular data, frequencies and frequencies of genotypes and alleles of both genes were calculated. For both genes, the observed heterozygosity and the expected heterozygosity were statistically analyzed in relation to the Hardy-Weinberg equilibrium, while the significance of the difference was found only for

the *KRT71* gene. A possible cause of the significant difference was the selection of individuals in the evaluated population with the expected occurrence of the mutated allele in the homozygous or heterozygous set.

Keywords: *Canis lupus f. familiaris*, Czechoslovakian wolfdog, nonstandard structure and length of coat, *KRT71*, *FGF5*, mutation

Obsah

1 Úvod	11
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	12
3 Literární rešerše	13
3.1 Československý vlčák	13
3.1.1 Vznik vlčího hybrida	13
3.1.2 Plemenný standard.....	13
3.1.3 Linie.....	14
3.1.4 Genotyp.....	14
3.2 Variabilita typu osrstění u psů	15
3.2.1 Chlupový folikul	15
3.2.2 WNT/ β -katenin	16
3.2.3 EGF.....	17
3.2.4 FGF	18
3.2.5 Regulace růstu vlasového folikulu fibroblastovými růstovými faktory ...	19
3.2.6 Gen <i>FGF5</i> a jeho produkt.....	19
3.2.7 Determinace dlouhé srsti	20
3.2.8 <i>KTR71</i>	21
3.2.9 Kadeřavost	22
3.3 Molekulární detekce mutací	23
3.3.1 PCR.....	23
3.3.2 Post-PCR genotypizační techniky	24
3.3.3 Agarózová elektroforéza.....	25
3.3.4 Vývoj metod sekvenace	25
4 Metodika	28
4.1 Hodnocená zvířata	28
4.1.1 Ostatní plemena s variabilní strukturou a délkou srsti.....	28
4.1.2 Hodnocení jedince plemene Československý vlčák	28
4.2 Izolace DNA	32
4.3 Detekce kauzální mutace genu <i>FGF5</i> c.284G>T zodpovědné za dlouhou srst 32	
4.4 Detekce mutace c.1266_1273delinsACA	33
4.4.1 Bioinformatická analýza sekvence genomické DNA s výskytem mutace c.1266_1273delinsACA	33
4.4.2 PCR amplifikace fragmentu genu <i>KRT71</i> s výskytem mutace c.1266_1273delinsACA	34
4.4.3 Detekce mutace c.1266_1273delinsACA pomocí Sangerovy sekvenace	35
4.5 Detekce mutace c.451C>T	36

4.5.1	Bioinformatická analýza skevence genomické DNA s výskytem mutace c.451C>T	36
4.5.2	PCR amplifikace fragmentu genu <i>KRT71</i> s výskytem mutace c.451C>T	36
4.5.3	Detekce mutace c.451C>T pomocí Sangerovy sekvenace	37
4.5.4	Detekce mutace c.451C>T pomocí restrikčního štepení	37
4.6	Genealogická studie přenašečů mutované alely genu <i>KRT71</i> c.451C>T...	37
4.7	Statistické zpracování výsledků z hlediska populační genetiky.....	38
5	Výsledky.....	39
5.1	Hodnocení izolace genomické DNA.....	39
5.2	Genotypizace populace z hlediska výskytu alel genu <i>FGF5</i>.....	39
5.3	Výsledky bioinformatické analýzy a navržení primerů pro studium variability genu <i>KRT71</i>	40
5.3.1	Bioinformatická analýza	40
5.3.2	Výsledky navržení primerů pro amplifikaci mutace c.1266_1273delinsACA 42	
5.3.3	Výsledky navržení primerů pro amplifikaci mutace c.451C>T	42
5.3.4	Hodnocení specifity amplifikace nově navrženého markeru kauzální mutace c.451C>T pomocí melting analýzy a pomocí elektroforetické separace	43
5.4	Výsledky sekvenční analýzy nově navržených markerů dvou kauzálních mutací genu <i>KRT71</i>	44
5.4.1	Sekvenace ampliconu nově navrženého markeru mutace c.1266_1273delinsACA	44
5.4.2	Sekvenace ampliconu nově navrženého markeru mutace c.451C>T	46
5.5	Metoda PCR-RFLP a posouzení její vhodnosti pro detekci mutace c.451C>T genu <i>KRT71</i>.....	47
5.6	Genotypizace populace z hlediska výskytu mutace c.451C>T genu <i>KRT71</i>48	
5.7	Vyhodnocení absolutních a relativních četností genotypů a alel z pohledu populační genetiky	48
5.8	Vyhodnocení genealogické studie	55
6	Diskuze.....	57
6.1	Vhodnost zvolených subpopulací použitých pro identifikaci mutovaných alel genů <i>FGF5</i> a <i>KRT71</i>.....	57
6.2	Izolace genomické DNA vhodné pro genotypizaci	57
6.3	Navrhování nových primerů pro amplifikaci markerů kadeřavé srsti a bioinformatická analýza dat.....	58
6.4	Diskuze výsledků genotypizace u genu <i>FGF5</i>	58
6.5	Diskuze výsledků genotypizace u genu <i>KRT71</i> mutace c.1266_1273delinsACA 58	
6.6	Diskuze výsledků genotypizace u genu <i>KRT71</i> mutace c.451C>T.....	59
6.7	Diskuze mutace genu <i>KRT71</i> c.1266_1273delinsACA a folikulární dysplazie 60	
6.8	Diskuze genealogické studie	61
6.9	Diskuze výsledků statistických analýz	63

7 Závěr	64
8 Literatura	65
9 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Československý vlčák je plemeno vznikající v letech 1955 křížením německého ovčáka a vlka karpatského. V roce 1982 byl československý vlčák uznán tehdejší Federálním výborem chovatelských svazů ČSSR jako národní plemeno a v roce 1989 byl uznán Mezinárodní kynologickou federací (FCI), což proběhlo schválením standardu československého vlčáka. Po rozdělení České a Slovenské Federativní Republiky převzalo patronát nad plemenem vůči FCI Slovensko. Plemenným standardem jsou popsána požadovaná kritéria týkající se mimo jiné i srsti. Dodržení fenotypu, jenž vychází z podobnosti vlku, je vyžadováno pro zařazení do chovu. Za vylučující vady je považována otevřená, kadeřavá či dlouhá srst, odchylující se od plemenného standardu (Hartl & Jedlička 1996).

Genetickým markrem dlouhé srsti je mutace genu *FGF5*. Gen *FGF5* je lokalizován na chromozomu 32. Protein genu *FGF5* reguluje růst vlasového folikulu, a to tak, že inhibuje anagen iniciací telogenní fáze. Mutantní protein je zbaven této funkce. Dlouhá srst je autozomálně recesivně dědičná. V případě plemene československý vlčák se jedná o nežádoucí fenotyp. Identifikace přenašečů mutované alely pro dlouhou srst je proto z pohledu chovatele klíčová, a to především při sestavování rodičovského páru následující generace. V diplomové práci je testována přítomnost substituční mutace c.284G>T genu *FGF5*, kdy je v pozici 284 nukleotidu nahrazen guanin thyminem (Housley a Venta 2006; Dierks et al. 2013)

Gen *KRT71*, lokalizovaný na chromozomu 27, je kandidátním genem asociovaným s kudrnatým fenotypem. Produktem tohoto genu je keratin. Keratiny jsou hlavní strukturální složkou vlasových folikulů a přispívají k tvorbě cytoskeletárních komponent známých jako keratinová intermediární filamenta. Doposud byli popsány dvě kauzální mutace genu *KRT71*. První identifikovanou mutací byla mutace c.451C>T, která se nácházela napříč různými plemeny s kadeřavou srstí. Jedná se o mutaci substituční, kdy je v pozici 451 nukleotidu nahrazen cytosin thyminem, čímž je zapříčena změna trojice nukleotidů kódujících příslušnou aminokyselinu. Touto substitucí nukleotidu dochází ve výsledném proteinu KRT71 ke změně argininu za tryptofan (Candieu et al. 2009).

Druhou popsanou mutací genu *KRT71* je mutace c.1266_1273delinsACA. Při této mutaci dochází k delecí nukleotidů CCTGAAGC v pozici 1266 až 1273 a následné inzerci nukleotidů ACA. Výskyt této mutace byl mezi kadeřavými plemeny sporadický, ale mutace c.1266_1273delinsACA byla shledána fixní u plemene curly coated retrívr (Bauer et al. 2019; Salmela et al. 2019).

Byla vypracována literární rešerše, následně vlastní metodika melokulární detekce mutací genů *KRT71* a *FGF5* u kohorty různých čistokrevných plemen a testované populace 80 zástupců československého vlčáka. Navržení metodického postupu předcházela bioinformatická analýza celogenomické sekvence *Canis lupus familiaris* pod označením >NC_006609.4 (Lindblad-Toh et al. 2005) z volně dostupné mezinárodní genové databáze NCBI (Sayers et al. 2022).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je ověřit platnost následujících vědeckých hypotéz:

- Pokud je nestandardní kadeřavá srst u československý vlčáků způsobena mutací genu *KRT71*, potom lze s vyšší pravděpodobností očekávat výskyt kauzální mutace c.451C>T oproti mutaci c.1266_1273delins ACA, která je typická zejména pro plemeno curly coated retrívr.
- Nestandardní dlouhá srst je u československých vlčáků (mutace genu *FGF5* c.284G>T) stejně jako kadeřavá srst způsobena recesivní mutací. Fenotypové projevy dlouhé nebo kadeřavé srsti se v populaci československých vlčáků vyskytují s velmi nízkými frekvencemi. Lze tudíž předpokládat, že výskyt přenašečů se současnou přítomností mutovaných alel obou genů *KRT71* a *FGF5* bude v populaci československých vlčáků velmi vzácný nebo dokonce nulový.

Vlastním cílem práce je navržení a validace kodominantních molekulárních markerů pro detekci obou kauzálních mutací genu *KRT71*. Analyzovat výskyt těchto mutací u jedinců s fenotypovým projevem kadeřavé srsti a u jedinců s rodokmenovou vazbou na zvířata s kadeřavou srstí. Dalším cílem je vyhodnotit vzorovou populaci československých vlčáků z hlediska výskytu mutace genu *FGF5* (c.284G>T) zodpovědné za nestandardní dlouhou srst a určit, zdali se v populaci nacházejí jedinci, kteří jsou současní přenašeči mutovaných alel obou genů (*KRT71* a *FGF5*).

3 Literární rešerše

3.1 Československý vlčák

Jedná se o vlčí hybridní plemeno, které vzniklo křížením vlka obecný (*Canis lupus*) s domácím psem (*Canis lupus familiaris*) plemene německý ovčák. V současné době je uznáván jako jedno z nejpobulárnějších plemen s vlčím fenotypem na světě akceptovaných FCI (Fédération Cynologique Internationale).

3.1.1 Vznik vlčího hybrida

Vznik plemene byl zapříčiněn vědeckým pokusem v letech 1955-1963 pod vedením Ing. Karla Hartla, který potvrdil, že je možné odchovat potomky jak ze spojení psa a vlčice, tak i ze spojení vlka a feny. V roce 1958 byla získána první generace hybridů ze spojení vlčice Brity a německého ovčáka Cézara z Březového háje. Jejich výchova byla obtížná, ale zpětné křížení s německými ovčáky poskytlo méně agresivní a lépe cvičitelné křížence, nežli tomu bylo v F₁ a F₂ generacích. Oceněna byla zvířata, která si zachovala psí behaviorální rysy s vlčím fenotypem (Smetanová et al. 2015).

Kladné výsledky experimentu vyústily v ideu vyšlechtit nové pracovní plemeno pro vojenské účely, které by spojovalo vlastnosti plemen domácího psa s přidáním vlastností jejich divokého předka, jako vitality, vytrvalosti a smyslových schopností. Byl sestaven návrh standardu nového plemene psa, jehož základem by byli potomci křížení vlků se psy (Hartl & Jedlička 1996).

Československý vlčák byl poprvé uznán jako plemeno tehdeším Federálním výborem chovatelských svazů ČSSR na národní úrovni v roce 1982 a v roce 1999 byl registrován Mezinárodní kynologická federace (FCI) a zařazen do skupiny I. – Psi ovčáčtí a honáčtí (FCI-Standard N° 332 1999).

3.1.2 Plemenný standard

Na počátku bylo šlechtitelským cílem vytvoření pracovního psa vzniklého na hybridizaci vlka obecného a německého ovčáka pro vojenské účely k hlídkování pohraničí. Později byly pracovní schopnosti československého vlčáka v chovném záměru sníženy a nově byly chovné cíle přísně zaměřeny na vlčí morfologii, vlčí strukturu i barvu srsti a obličejovou část s vlčí maskou (Moravčíková et al. 2021).

Vzhled jedinců přijímaných do plemenitby je přesně stanoven plemenným standardem č. 332 Mezinárodní kynologické federace (FCI), schváleným v roce 1989. Příslušníci plemene vykazují pevnou konstituci a stavbou těla, osrstěním a zbarvením připomínají vlka.

Plemenným standardem je dána minimální výška, důležité proporce, vzhled hlavy, trupu, končetin, ocasu, kůže, mechanika pohybu a povaha a temperament. Srst má být rovná a uzavřená, v zimě tvořící mohutnou podsadu, která s vrchní krycí srstí vytváří husté osrstění celého těla. Srst pokrývá břicho, vnitřní část stehen, vnitřní část ucha a meziprstí. Krk je dobře osrstěný a jeho délka musí psu umožnit bez námahy dosáhnout čenichem na zem. Zbarvení je žlutošedé až stříbrošedé s charakteristickou světlou maskou. Světlá srst je rovněž na spodní části krku a přední hrudi. Příпустné je tmavošedé zbarvení s maskou.

Odchylky od uvedených bodů v plemenném standardu by se měly považovat za vady, přičemž je hodnocena závažnost odchylky a případně definovány vady vylučující. Mezi vylučující vady je řazena právě i otevřená a vlnitá srst (FCI-Standard N° 332 1999).

3.1.3 Linie

První linie československého vlčáka vzešla ze spojení vlčice Brity a německého ovčáka Cézara z Březového háje, která dala vzniknout čtyřem filiálními generacemi kříženců. Vlčice Brita pak dala ještě základ druhé linii s německým ovčákem Kurtem z Václavky. Jejich spojením vznikly dvě filiální generace kříženců. Třetí linie vznikla spojením vlka Arga s fenou německého ovčáka Astrou z SNB, která dala vzniknout dvěma filiálními generacemi kříženců.

Přilítí krve bylo uskutečněno nakrytím kříženky F₃ generace Xelou z Pohraniční stráže vlkem Šarikem. Ten později nakryl ještě fenu Urtu z Pohraniční stráže. Rep z Pohraniční stráže, potomek psa vzniklého ze spojení Šarika a Xely se stal nadlouho předlohou a prostředkem k vytvoření žádoucího typu československého vlčáka. Bylo po něm odchováno 77 % slovenských vrhů, čímž došlo k výraznému zvýšení inbredního koeficientu. Sám Rep byl produktem úzké příbuzenské plemnitby.

Pro udržení přirozené struktury populace bylo uskutečněno poslední přilítí krve krytím vlčice Lejdy německým ovčákem Bojarem von Schoterrhof. Z první filiální generace byl vybrán pes Kazan, který byl následně využit v plemnitbě československých vlčáků. Dále se již prováděla plemnitba v uzavřené populaci (Hartl & Jedlička 1996).

3.1.4 Genotyp

Studie Smetanové et al. (2015) charakterizovala genetické složení československého vlčáka ve vztahu k rodičovským populacím. Získaná DNA ze vzorků slin nebo stolice československého vlčáka, německého ovčáka a vlka obecného byla genotypizována sekvenováním genu kodujícího amelogenin pro určení pohlaví jedinců. Hypervariabilní částí mtDNA sloužila pro stanovení maternálních haplotypů. Čtyři pohlavně vázaných mikrosatelity byly použity k identifikaci otcovských haplotypů a 39 autozomálních mikrosatelitů pro rekonstrukci individuálních genetických profilů. U československých vlčáků byly nalezeny pouze dva haplotypy mtDNA a dva Y-vázané haplotypy. Oba haplotypy mtDNA byly původem psa domácího, přičemž pouze jeden z haplotypů Y-chromozomu byl sdílen s německými ovčáky a druhý pravděpodobně s vlkem.

Při vzniku plemene československý vlčák bylo použito opakovaného zpětného křížení. Umělá selekce s cílem zachovat fenotyp podobný vlkům, ale chování podobné psům vedla k výraznému genetickému odlišení plemene československého vlčáka od ostatních plemen. Smetanová et al. (2015) uvádí nízký pozorovaný koeficient příbuznosti, i přes malou efektivní velikost populace, stanovený na základě analýzy mikrosatelitů. Jenž je pravděpodobně zapříčiněn introgresí vlčích alel.

Na genotypu jedinců československého vlčáka se projevil především efekt úzkého hrdla, vyplývající z relativně nízkého počtu zakladatelů a genetický drift. Jak uvedla Moravčíkové et al. (2021), genom československého vlčáka nese alely, které se nenacházejí ani u vlků, ani u jiných plemen psů analyzovaných v této studii.

Odlišné výsledky přinesla analýza 143 593 jednonukleotidových polymorfismů (SNP) u 131 psů použitím mikročipu BeadChip, která odhalila v genomu československého vlčáka autozygotní alely, tedy alely identické původem, což vede k vyšší příbuznosti, než odhalí rodokmen (Moravčíková et al. 2021).

3.2 Variabilita typu osrstění u psů

Barva a typ srsti jsou znakem s vysokou variabilitou napříč všemi psími plemeny. Na základě celogenomové asociační studie (GWAS, Genome-wide association studies) byly identifikovány geny spojené s fenotypem psí srsti (Candieu et al. 2009).

3.2.1 Chlupový folikul

Srst se skládá z terminálně diferencovaných mrtvých keratinocytů (trichocytů), které jsou zhutněny do vlákna úžasné pevnosti v tahu, vlasového stvolu. Přítomnost srsti je charakteristická pro savce. Plní funkce jako mechanickou ochranu, tepelnou izolaci, maskování, rozptyl potu a kožního mazu, smyslové a hmatové funkce a sociální interakce. Chlupové stvoly jsou tvořeny chlupovým folikulem, komplexním miniorgánem kůže, ke kterému jsou přidružené struktury jako mazová žláza, apokrinní žláza a napřimovač chlupu (Schneider et al. 2009).

Chlupové folikuly se skládají z nejméně deseti různých typů epiteliálních a mezenchymálních buněk zaměřených na produkci chlupu. Během morfogeneze spolu epiteliální buňky a buňky mezenchymu komunikují. Regulační úlohu ve vývoji folikulu hrají tzv. morfogeny, extracelulární látky. Morfogeny mají zásadní vliv na specifikaci buněk, potažmo tkání. Různé buňky či tkáně vykazují na stejný morfogen odlišnou odpověď. S různou koncentrací morfogenu je vyvolávána kvalitativně i kvantitativně odlišná odpověď. K těmto látkám patří růstové faktory jako je epidermální růstový faktor (EGF - epidermal growth factor), transformující růstový faktor α (TGF α -transforming growth factor α), transformující růstový faktor β (TGF β - transforming growth factor β), fibroblastový růstový faktor (FGF - fibroblast growth factor) a nervový růstový faktor (NGF - nerve growth factor), dále buněčné adhezí molekuly (E-kadherin a P-kadherin, neurální buněčná adhezí molekula N-CAM, intercelulární buněčná adhezí molekula I-CAM) a další molekuly jako tenascin, beta-katenin, epimorfín, Shh (Sonic hedgehog) a Wnt (Wingless/ Int-1), LEF-1 (lymphoid-enhancer factor 1) a ectodysplasin (EDA), nedávno identifikovaný člen rodiny cytokinových receptorů TNF (tumor necrosis factor). Ve vývoji vlasových folikulů se dále uplatňují hormony, cytokiny, enzymy a retinoidy, společně s jejich receptory (Stenn et al. 1996; Gat et al. 1998).

V embryu začíná diferenciace vlasového folikulu vytvořením malého shluku mezodermálních buněk. Ty jsou zárodkem budoucí dermální papily, která je cevním spojením folikulu a vnitřní a vnější vlasové pochvy. Kmenové buňky ektodermální dávají vzniku všem epiteliálním složkám vlasového folikulu, včetně mazové žlázy a apokrinní žlázy. Progenitory melanocytů neuroektodermálního původu dávají vzniknout pigmentové jednotce vlasového folikulu. K tvorbě vlasových folikulů dochází převážně během fetálního a perinatálního vývoje kůže. Byla však pozorována tvorba nových vlasových folikulů po poranění kůže u myši a králíku stimulována Wnt proteiny (Ito et al. 2007). Z čehož vzešla myšlenka indukce tvorby vlasových folikulů de novo při ztrátě vlasů u člověka (Higgins et al. 2013).

Chlupový cyklus je rozdělen do fází: Anagen (fáze růstu), katagen (regresní fáze), telogen (fáze klidu), exogen (fáze uvolnění vlasu) a teloptóza (vypadnutí vlasu). V každém cyklu se zakládá nový chlupový stvol a starý chlup nakonec vypadává. Vytváření nového vlasového stvolu závisí na aktivaci specifických epiteliálních kmenových buněk, uložených v oblasti vyboulení epitelu vlasového folikulu. Cyklus je spojen s podstatnou reorganizací samotného vlasového folikulu. Postnatální chlupová morfogeneze vede k prodloužení folikulu a produkci chlupového vlákna, které vystupuje z kůže.

Fáze růstu je charakteristická proliferací a diferenciací buněk. Mitotická aktivita vede k vývoji nového chlupu a jeho obalů. Jakmile chlupový folikul dozraje, vstoupí do regresní fáze, během které je degradována spodní, cyklující část vlasového folikulu apoptózou buněk. Tento proces přivádí dermální papilu do těsné blízkosti výdutě, kde sídlí chlupové kmenové buňky (HSC). Molekulární interakce mezi HSC a dermální papilou je nezbytná pro vytvoření nového vlasového folikulu. Blízkost mezi vybouleninou a dermální papilou je udržována během telogenu, klidové fáze. Teprve když je dosaženo kritické koncentrace signálů aktivujících růst chlupů, vstupuje do anagenní fáze a znovu dorůstají nové chlupy. S progresí anagenní proliferace roste folikul směrem dolů (Panteleyev 2001).

3.2.2 WNT/ β -katenin

Morfogeneze a vývoj vlasového folikulu závisí na řadě signálních drah (Rishikaysh et al. 2014). Kánonická signální dráha Wnt/ β -kateninu je považována za hlavní regulátor během morfogeneze vlasového folikulu, protože ztráta funkce β -kateninu, základního přenašeče signálu v signální dráze Wnt, blokuje tvorbu vlasových folikulů během embryogeneze. Kromě toho delece β -kateninu po vytvoření vlasových folikulů vede k úplné ztrátě vlasů po prvním chlupovém cyklu, což naznačuje klíčovou roli Wnt signalizace při udržování postnatálního vlasového cyklu (Huelsen et al. 2001).

Ligandy Wnt jsou klasifikovány jako primární (Wnt 3, 4 a 6) a sekundární Wnt (Wnt 2, 7b, 10a a 10b) na základě současných funkčních důkazů. Primární Wnt jsou zásadními při iniciaci vzniku vlasových folikulů, zatímco sekundární Wnt se podílejí na vývoji vlasových folikulů (Rishikaysh et al. 2014; Andl et al. 2002).

Wnt signální protein se naváže na membránový receptor Frizzled, který prostřednictvím intracelulárního posla inhibuje degradační komplex, ubikvitinující β -katenin, jenž je poté rozeznán a degradován proteazomem. Jelikož jsou tyto proteiny inhibovány, β -katenin se hromadí, proniká do jádra, kde podmiňuje transkripci jako transkripční koaktivátor (Huelsen et al. 2001).

Byla identifikována mutace genu *RSPO2* ovlivňující fenotyp psí srsti. Gen *RSPO2* nacházející se na 13 chromozomu, byl vhodným kandidátem ovlivňujícím fenotyp srsti, neboť synergizuje s Wnt signální kaskádou v aktivaci β -kateninu, který je součinný na vývoji vlasového folikulu. Inzerce 167 bp v oblasti 3'-UTR (oblast mRNA nepřekládaná do proteinu) genu , který je součinný při Wnt signalizační kaskádě vedoucí k aktivaci β -kateninu, byla perfektně asociována s fenotypem drsné srsti a výrazného osrstění hlavy v oblasti obočí a čenichu. Psi s popsaným fenotypem byli homozygotní nebo heterozygotní v inzerci, jak je v souladu s dominantní dědičností. Tato mutace neovlivňuje oblast kódující protein, ale inzerce

je spojena s mírou exprese genu. Biopsií kůže z čenichu psů byl zjištěn nárůst transkriptů (Cadieu et al. 2009).

3.2.3 EGF

Epidermální růstový faktor (EGF) je polypeptid o velikosti 6kDa skládající se z 53 aminokyselin, který se podílí na regulaci buněčné proliferace. EGF uplatňuje své účinky v cílových buňkách vazbou na receptor EGF umístěný na plazmatické membráně. Receptor EGF je transmembránový protein tyrosin kináza. Vazba EGF na receptor způsobuje aktivaci kinázy a následně autofosforylaci receptoru. Autofosforylace je nezbytná pro interakci receptoru s jeho substráty (Boonstra et al. 1995).

Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) je nezbytný pro normální involuci vlasových folikulů po růstové fázi anagenu. Aktivace EGFR spouští katagen. K prozkoumání, jak aktivace EGFR spouští katagen, byly použity myši modely s deficitem EGFR.

V souladu s jinými modely deficitu EGFR vykazovaly myši s delecí EGFR ve folikulárních keratinocytech opožděný a asynchronní nástup katagenu, sníženou folikulární apoptózu a zvýšenou proliferaci. Transkripční profilování v době normálního katagenního nástupu odhalilo zvýšenou expresi mitotických regulátorů Rcc2 (regulátor kondenzace chromatinu) a Stathmin 1 ve vlasových folikulech postrádajících EGFR (Bichsel et al. 2016).

Zhang et al. (2016) ve své studii uvádí protichůdné účinky EGF. Byly izolovány a kultivovány *in vitro* chlupové folikuly norka v přítomnosti různých koncentrací EGF. Chlupové folikuly norka byly kultivovány v přítomnosti EGF v rozmezí koncentrací od 0,2 do 200 ng/ml. Byl zaznamenáván denní nárůst buněk vnější pochvy folikulu. Nízká koncentrace EGF (0,2 ng/ml) neovlivnila růst během šesti denní kultivace. Naproti tomu EGF 2 ng/ml a 20 ng/ml významně zvýšilo prodloužení vnější pochvy v prvních několika dnech a vedlo k výraznému celkovému růstu během kultivace. V této studii EGF indukoval jadernou translokaci β -kateninu a také zvýšil expresi β -kateninu a Wnt10b. (Zhang et al. 2016).

Podávání epidermálního růstového faktoru (EGF) novorozelým myším zpožďuje vývoj vlasových folikulů, snižuje rychlost růstu chlupů a zmenšuje průměr chlupu. Kromě toho má exogenní EGF za následek zahušťování, hyperkeratinizaci a hyperproliferační v epidermis. EGF a další ligandy EGFR jsou silnými mitogeny pro kultivované keratinocyty. U myších mutantů s částečně zrušenou signalizací přes EGFR byly charakterizovány defekty v normálním vývoji srsti (Hansen et al. 1997).

3.2.4 FGF

Fibroblastový růstový faktor byl poprvé izolován v roce 1974 z bovinní hypofýzy. Název vycházející z hlavního účinku prvně popsánoho FGF, který stimuloval růst 3T3 fibroblastů, dnes již tyto růstové faktory správně nedefinuje. Bylo prokázáno, že má mitogenní účinek na mnoho typů buněk (Gospodarowicz 1974). Prototypové ligandy FGF, kyselý FGF (aFGF nebo FGF-1) a bazický FGF (bFGF nebo FGF-2), byly poté purifikovány heparinovou afinitní chromatografií na počátku 80. let jako první silné mitogeny endoteliálních buněk (Thomas et al. 1984). Důležitost signalizace FGF v kosterních tkáních byla poprvé zdůrazněna analýzou genetických vazeb, která prokázala, že etiologie achondrodysplazie (jedna z nejběžnějších forem nanismu u lidí) byla způsobena aktivací bodových mutací receptoru FGFR3 (Ornitz & Marie 2002). Další formy skeletálních dysplazií pak byly spojeny s mutacemi receptorů FGFR1 a FGFR2 (Coutu & Galipeau 2011).

Fibroblastové růstové faktory (FGF) vytváří velkou rodinu polypeptidových růstových faktorů, které se nacházejí v organismech od hlístic po člověka. FGF regulují buněčné cykly přes specifické transmembránové tyrosin kinázové receptory. U obratlovců se molekulová hmotnost 22 členů rodiny FGF pohybuje od 17 do 34 kDa a sdílí 13-71 % identitu aminokyselin. Mezi druhy obratlovců jsou FGF vysoce konzervované, jak v genové struktuře, tak v aminokyselinové sekvenci. Během embryonálního vývoje mají FGF různé role v regulaci buněčné proliferace, migrace a diferenciaci. V dospělém organismu jsou FGF homeostatické faktory a fungují při opravě tkáně a reakci na poranění. Pokud jsou nevhodně exprimovány, mohou některé FGF přispívat k patogenezi rakoviny (Ornitz & Itoh 2001).

Krystalografické strukturální studie FGF identifikovala 12 β skládaných listů, v konzervativní oblasti proteinu, uspořádaných do trojúhelníkového pole (β trojlístek). Většina FGF má amino-terminální signální peptidy a jsou snadno secernovány z buněk. Nejlépe charakterizované FGF interagují se dvěma odlišnými extracelulárními receptory – transmembránovým tyrozinkinázovým receptorem FGF (FGFR) a proteoglykanem extracelulární matrix příbuzným heparansulfátu. Tyto složky tvoří komplex FGF-FGFR-proteoglykan, který aktivuje proces transdukce signálu zprostředkovaný FGF prostřednictvím dimerizace FGFR (Faham et al., 1998).

Rodina FGF tyrozinkinázových receptorů se v současnosti skládá z produktů čtyř genů, z nichž některé dávají vzniknout extrémně velkému počtu produktů kombinatorickým alternativním sestřihem při transkripci a případně posttranslační modifikací. Alternativní sestřih je regulován tkáňově specifickým způsobem a dramaticky ovlivňuje vazebnou specificitu ligand-receptor. Ligandy specifické pro tyto formy sestřihu receptoru jsou exprimovány v sousedních tkáních, což vede k směrové epiteliálně-mezenchymální signalizaci. Nejdelší produkt je tvořen z extracelulární domény obsahující tři disulfidové motivy podobné imunoglobulinu a sekvence vázající heparin. Za extracelulární doménou následuje transmembránová doména a intracelulární doména. Intracelulární doména se skládá ze dvou tyrosinkinázových subdomén, a to domény vázebného místa ATP a katalytické domény (McKeehan et al. 1997).

Studie odhalují možné terapeutické použití fibroblastových růstových faktorů. Jsou dobře známe angiogenní vlastnosti FGF. FGF1 a FGF2 hrají určitou fyziologickou roli při udržování vaskulárního tonu, protože podávání FGF1 a FGF2 snižuje krevní tlak u potkanů (Cuevas et al.

1991) a může obnovit aktivitu syntázy oxidu dusnatého u spontánně hypertenzních potkanů (Cuevas et al. 1996).

FGF1 je proliferativní faktor pro lidské preadipocyty a může být důležitý pro celkovou regulaci lidské adipogeneze (Hutley et al. 2004). Injekce plazmidu kódujícího FGF1 (NV1FGF) do nohy, zlepšila perfúzi konečného stádia ischemie dolních končetin (Comerota et al. 2002) a vedla k dvojnásobnému snížení potřeby amputace u pacientů s kritickou ischemií končetiny (Nikol et al. 2008). Exogenní FGF1 umožnil funkční regeneraci přerušovaných mích u potkanů (Cheng et al. 1996) a obnovil některé motorické funkce ochrnutých končetin u šesti měsíčního chlapce s avulzí brachiálního plexu (Lin et al. 2005). Byl pozorován kraniofaciální dysmorfologický fenotyp podobný Crouzonovu syndromu u myši s inzerční mutací v lokusu FGF3/FGF4 (Carlton et al. 1998). U FGF4 knockout myších embryí dochází k postimplantační letalitě, neboť je nezbytný pro proliferaci trofoblastů (Feldman et al. 1995). Defektní svalová regenerace s výrazně zvýšenou fibrózou u myši s knockoutovaným *FGF6* genem poukazuje na roly FGF6 při myogenezy (Floss et al. 1997). Zástupci FGF rodiny se podílí na regulování cyklu vlasového folikulu (Du Cros 1993).

3.2.5 Regulace růstu vlasového folikulu fibroblastovými růstovými faktory

Několik studií demonstruje roli FGF na růst folikulů. Lin et al. (2015) popsal u FGF10, FGF1 a FGF2 indukci anagenní fáze u telogenních vlasových folikulů. Populace zdravých C57BL6/N (inbrední kmen laboratorních myši) myši, se synchronizovanou telogenní fází, byla rozdělena a v jednotlivých skupinách byl sledován efekt injektovaného FGF na růst folikulů. K objasnění mechanismu indukce anagenní fáze byla použita imunohistochemická analýza, a to k detekci β -kateninu a Shh proteinu, neboť u těchto signálních molekul byl již dříve pozorován vliv na morfogenezy folikulu. Data naznačují, že FGF podporují rychlejší růst regulací β -kateninu a Shh proteinu.

3.2.6 Gen *FGF5* a jeho produkt

Gen *FGF5* je zkoumán jako kandidátní funkční gen pro variabilní délku srsti. Psí ortholog genu *FGF5* je tvořen třemi exony, avšak použitím reverzní transkriptázy na mRNA byly získány dva velikostně odlišné fragmenty cDNA. Vlivem alternativního sestřihu jsou z genu exprimovány dvě odlišné molekuly mRNA. Ota et al. (2002) prokázal, že FGF5 růstový faktor inhiboval růst chlupů, jelikož indukoval katagen blokováním aktivace buněk dermální papily u myši. Dermální papila je zdrojem signálů podporujících růst chlupů. FGF5 reguluje expresi mRNA anagenních udržovacích faktorů, jako je IGF-1 (inzulinový růstový faktor), versican, noggin a BMP4 (kostní morfogenetický protein), vylučovaných buňkami dermální papily (He et al. 2016).

Během anagenu je IGF-1 vysoce exprimován v dermální papile (Botchkarev & Kishimoto 2003) a funguje jako základní růstový faktor pro udržení růstu folikulů (Kamiya et al. 1998). Versican, chondroitin sulfátový proteoglykan s velkou molekulovou hmotností, se podílí na udržování růstu chlupů (du Cros et al. 1995; Soma et al. 2005). Expresí versican dosahuje svého maxima během anagenu a klesá na konci anagenu (Soma et al. 2005). Bylo zjištěno, že expresí IGF-1 a versican byla významně snížena v buňkách dermální papily nadměrnou expresí FGF5.

Signalizace BMP se podílí na regulaci apoptózou řízené involuce vlasových folikulů (Botchkarev a Sharov 2004). BMP4, člen rodiny BMP, je exprimován v dermální papile a několika složkách vlasového folikulu během pozdního anagenu a refrakterního telogenu (Plikus et al. 2008).

Produkt kratšího fragmentu, ve kterém byl vystřižen exon 2, je protein, označován jako FGF5S (Hattori et al. 1996). FGF5S se ukázal být antagonistou FGF5 a společně regulují cyklus vlasového folikulu. FGF5S působí jako inhibitor FGF5 při regulaci anagen-katagenního přechodu buněk dermální papily kašmírové kozy. He et al. (2016) uvádí možnost prodloužení délky kašmírového vlákna nadměrnou expresí FGF5S.

Jediný nalezený mutantní gen, který vede k nadměrně dlouhé srsti u jakéhokoli druhu, je ten, který kóduje FGF5. FGF5 inhibuje růst vlasů podporou progresu z anagenu, růstové fáze vlasového folikulu, do katagenu, regresní fáze vyvolané apoptózou (Housley & Venta 2006). K ověření biologické aktivity byly vytvořeny transgenní myši s knockoutovaným *FGF5*. Genový konstrukt s vloženým genem rezistence proti neomycinu narušil kódující oblast předčasnými terminačními kodony. Následně byl elektroporačně přenesen do embryonálních kmenových buněk. Přenos byl ověřen rezistencí a takto odhalené klony injektovány do blastocyst. Heterozygotní potomci chimér byli množeni se ziskem homozygotních myši s mutací *FGF5^{neo}*. Takoví jedinci měli výrazně delší srst, nežli heterozygoti a jedinci s původní alelou. U angorských myši, u kterých nebyla mRNA *FGF5* detekována, dochází ke zpoždění nástupu katagenu, což vede ke zvýšení délky vlasových vláken v důsledku prodloužené anagenní fáze (Hébert et al. 1994).

3.2.7 Determinace dlouhé srsti

Několik alelických variant v rámci genu *FGF5* korelovalo s dlouhosrstým fenotypem u koček (Drögemüller et al. 2007; Kehler et al. 2007), psů (Housley a Venta 2006; Dierks et al. 2013), koz (He et al. 2014), ovcí (Hu et al. 2017), křečků (Yoshizawa et al. 2015), oslů (Legrand et al. 2014), lam (Daverio et al. 2017) či alpák (Pallotti et al. 2018). Dlouhá srst je u velbloudů jednohřbých podmíněna mutací genu *FGF5* v homozygotní sestavě. Jedná se o substituční mutaci na pozici 779 nukleotidu exonu 3, kdy je cytosin substituován thyminem. Heterozygoti mají středně dlouhou srst. Přítomnost tří fenotypů délky srsti naznačuje vztah neúplné dominance mezi alelami znaku (Maraqa et al., 2021). Mutace genu *FGF5* je rovněž kauzativním faktorem lidské trichomegalie (Higgins et al. 2014)

Jedním z nejnápadnějších morfologických rozdílů mezi psy různých plemen je délka jejich srsti. Scott a Fuller (1965) demonstrovali recesivní alelu pro dlouhou srst na křížení plemen basenji a dlouhosrstý kokršpaněl. Oproti tomu kříženci dlouhosrstého pudla a krátkosrstými labradorskými retrívry, známí jako labradoodl, mají dlouhou srst, ačkoliv není tak dlouhá, jako je tomu u pudla. To poukazuje na existenci jiného lokusu pro dlouhou srst, dominantního nad krátkou srstí (Burns & Fraser 1966), jak již dříve uvádí Dawson (1937) dominantnost kadeřavé srsti.

Délka srsti je jedním ze znaků definovaných plemenným standardem. Občasný výskyt dlouhé srsti u krátkosrstých plemen je pro chovatele problémem, především jestliže je neslučitelná s původní funkcí plemene. Objev nukleotidových polymorfismů spojených

s konkrétními fenotypy umožňuje identifikaci přenašečů a na základě genetické analýzy rozhodnutí o zařazení jedine do chovu či naopak (Housley a Venta 2006).

Byla genotypizována DNA 218 psů osmi různých plemen s fixovanou krátkou srstí, tři plemena s fixovanou dlouhou srstí a 5 plemen segregujících. Sekvenační analýzou exonu 2 a 3 nebyli odhaleny žádné difference mezi krátkosrstými a dlouhosrstými psy. Nicméně v sekvenci exonu 1 se objevily dvě sekvenční difference mezi krátkou a dlouhou srstí. Prvním polymorfismem je 6 bp duplikace, kdy má delší alela dvě kopie motivu ACCAGC v pozici 145 až 156 nukleotidu. Translace takové alely v protein vede k duplikaci aminokyselin threoninu a serinu. Další pozorovanou odlišností byla transverse G>T v poloze 284 nukleotidy, která predikuje substituci cysteinu za fenylalanin. Tato bodová mutace (SNP, single nucleotide polymorphism) leží v konzervativní sekvenci proteinu a poškozuje oba produkty alternativního sestřihu (Dierks et al. 2013). Genotypizace polymorfismů u zástupců plemen s variabilní délkou srsti ukázala na fixaci SNP u dlouhosrstých psů, jakožto i u ostatních dlouhosrstých plemen se SNP nacházelo v homozygotní sestavě s haplotypem kratší alely čili bez duplikace. Přesto asociace kratší alely s dlouhosrstým fenotypem není tak signifikantní jako u SNP, neboť se objevil i krátkosrstý homozygot (Housley & Venta 2006).

Popsané mutace nevysvětlují fenotyp dlouhé srsti u několika plemen, což nabízelo existenci dalších kauzálních mutací. Resekvenace všech exonů a sousedících regionů detekovala tři nové mutace v kódující oblasti exonu 3 a jedna intronová mutace (splice site). Nukleotidová substitute T>A v intronu 1 vytvoří nové sestřihové místo 9 bází před exonem 2, čímž vzniká kratší transkript FGF5S. Mutace v exonu 3 se nacházely za stop kodonem pro kratší transkript, proto mají vliv pouze na delší variantu transkriptu. Delece v oblasti 556 až 571 nukleotidu má efekt na produkt genu, který je poškozen. Stejný efekt byl predikován i u duplikace motivu GG v oblasti 559 až 561 nukleotidu a transverze 578 nukleotidu C>T, kdy je 193 aminokyselin proteinu alanin nahrazena valinem (Dierks et al. 2013).

3.2.8 Gen *KTR71*

Gen *KRT71*, kódující keratin typu II., je exprimován ve vnitřní pochvě vlasového folikulu. Keratiny jsou hlavní strukturální složkou vlasových folikulů. Přispívají k tvorbě cytoskeletárních komponent známých jako keratinová intermediární filamenta prostřednictvím heterodimerizace mezi keratiny typu I a typu II (Moll et al. 2008).

Všechny keratinové proteiny sdílejí společnou strukturní organizaci složenou ze tří domén: centrální domény, N-terminální doména a C-terminální doména. N-konec a C-konec centrální IF domény, označovány jako iniciační motiv a terminační motiv, v tomto pořadí, jsou oblastmi vysoce konzervativními a kritickými pro heterodimerizaci (Coulombe & Omary 2002). Většina patogenních mutací keratinu byla lokalizována v těchto oblastech, neboť jak bylo prokázáno v kultivovaných buňkách, mutantní keratin vede k narušení tvorby keratinového intermediárního filamenta. Například nesynonymní mutace genu *KRT74* (p.Asn148Lys), způsobující hypotrichózu, leží v iniciačním motivu centrální oblasti (Shimomura et al. 2010).

Byla pozorována mutace genu *KRT71* c.422T>G na exonu 1, která vede ke změně aminokyselin ve vysoce konzervativní oblasti, čímž postihuje funkci proteinu. Folikulání

dysplazie způsobená substitucí byla pozorována u lidí s hypotrichózou v heterozygotní sestavě (Fujimoto et al. 2012).

3.2.9 Kadeřavost

K identifikaci genů způsobujících kadeřavost srsti byla použita GWAS plemene portugalský vodní pes, která ukázala napříč kadeřavými plemeny na asociaci jednonukleotidového polymorfismu (SNP, single-nucleotide polymorphism) na chromozomu 27. Relevantní SNP je lokalizován na genu *KRT71*. U jedinců plemen s kadeřavou nebo vlnitou srstí je přítomna kauzální mutace genu *KRT71* na exonu 2, kde je substituován cytosin thyminem v pozici 451 nukleotidu (c.451C>T). Substituce báze vede k změně 151 aminokyseliny argininu za tryptofan (p.Arg151Trp) ve výsledku translace mRNA do proteinu (Cadieu et al. 2009).

Popsaná mutace může ovlivnit proteinové domény, jejichž sekvenční změny by mohly ovlivnit správné sbalení proteinu po translaci, které vede k zaujmutí jeho biologicky aktivní struktury (Martin et al. 2004).

Tato mutace nebyla přítomna u několika testovaných jedinců plemene curly coated retrívr (CCR), proto se předpokládalo, že jejich kadeřavost je způsobena jinou alelickou variantou, fixovanou u tohoto plemene. Byl sekvenován genom CCR a porovnán s genomy jedinců různých plemen. Byly pozorovány varianty kandidátního genu *KRT71* se zaměřením na varianty měnící protein. Přítomnost homozygotní sestavy původní alely, mutace c.451C>T a homozygotní sestavy nově pozorované mutace potvrdila předpoklad fixace recesivního modelu u plemene curly coated retrívr. Nová mutace se u jiných plemen (až na některá individua) buď nevyskytovala nebo byla v heterozygotní sestavě.

Mutace je interpretována jako delece CCTGAAGC v oblasti 1266_1273 a následná inserce bází ACA (c.1266_1273delinsACA). Mutace vede k posunu čtecího rámce genetického kódu, čímž se mění primární struktura proteinu *KRT71*. Kožní biopsie prokázala expresi očekávaného transkriptu bez jakýchkoliv sestřihových změn. Mutace c.1266_1273delinsACA způsobila posun stop-kodonu a v porovnání s divokou alelou kódující protein dlouhý 525 aminokyselin, je mutovaný keratin tvořen 632 aminokyselinami (Bauer et al. 2019; Salmela et al. 2019).

Curly coated retrívr bylo jediné plemeno, u kterého byla mutována alela c.1266_1273delinsACA fixována, zatímco několik plemen segregovalo obě varianty mutace dvě plemena, flat coated retrívr a nova Scotia duck tolling retrívr, nenesla ani jednu z variant mutace. Kadeřavé plemeno lagotto romagnolo (Romaňolský vodní pes) segregovalo ve všech možných alelických kombinacích, vyskytovaly se tedy u něj oba typy mutací. Avšak testovaný soubor obsahoval jedince, který nesl obě alely nemutované. Tento lagotto byl potvrzen jako kudrnatý, což naznačuje přítomnost dalších alel pro kadeřavost (Salmela et al. 2019).

Vzhledem k tomu, že specifické varianty *KRT71*, krom kadeřavosti, mohou vést ke ztrátě vlasů u lidí a ztrátě srsti u myší, potkanů a koček, je možné předpokládat, že psí alela c.1266_1273delinsACA může představovat genetický rizikový faktor pro některé formy folikulární dysplazie u psů. V souboru testovaných psů Bauera et al. (2019) byli tři psi postiženi folikulární dysplazií diagnostikovou veterináři a všichni tři byli c.1266_1273delinsACA homozygotní. Kohorta dále obsahovala 5 psů plemene lagotto romagnolo s diagnostikovanou

nezářetlivou alopecii afektující trup v dospělosti, kteří byli c.451C>T homozygotní. Ostatní jedinci v souboru byli zdraví.

Vzhledem k nízké frekvenci alely u pudlů je velmi nápadné, že jediný identifikovaný homozygotní pudl c.1266_1273delinsACA byl alopetický. Podobně jako jediný pozorovaný homozygotní c.1266_1273delinsACA chesapeake bay retrívř byl diagnostikován s folikulární dysplazií. Na druhou stranu, napříč plemeny pouze relativně malá část homozygotních psů vykazovala ztrátu srsti. Je proto možné, že alela představuje predispoziční genetický rizikový faktor folikulární dysplazie, avšak pro manifestaci folikulární dysplazie budou vyžadovány další genetické anebo environmentální faktory.

Účinky dvou popsáných mutací se mohou mírně lišit, jak je vysvětlováno na příkladu porovnání genotypu a fenotypu curly coated retrívř a pudla. Plemenný standard curly coated retrívř s fixní alelou c.1266_1273delinsACA vyžaduje krátkou, hladkou a rovnou srst na čele a obličejí a ventrální části končetin. Pudlové, kteří mají kadeřavou srst po celém těle jsou téměř fixní na alelu c.451C>T (Bauer et al. 2019).

3.3 Molekulární detekce mutací

3.3.1 PCR

Principem polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) je amplifikace požadovaného úseku DNA. Jedná se defacto o simulaci buňčné replikace DNA, která ale probíhá v termocyklu. Templátová DNA je vytyčena navrženými primery, krátkými oligonukleotidy, které jsou k vláknům komplementární. Primer komplementární k počátku cílové sekvence je označován jako Forward primer, nasedá na vlákno 3'→5' a jeho sekvence se přímo nachází v analyzované sekvenci. Reverzní primer nasedá na vlákno 5'→3' a ohraničuje cílovou sekvenci z jejího opačného konce (Alberts et al. 2015).

Syntézu nového vlákna zajišťuje enzym DNA polymeráza, která je vystavována vysokým teplotám, proto je požadována její termostabilita. Nejčastěji používanou termostabilní DNA polymerázou je *Taq* DNA polymeráza, izolována z bakterie *Thermus aquaticus*, objevenou ve vřídlech v Yellowstonském národním parku. Polymeráza zabudovává volné deoxynukleosid trifosfáty (dNTP) na základě komplementarity templátového vlákna. Výsledkem reakce jsou syntetizované kopie původního fragmentu, amplikony. V dalších cyklech reakce slouží i nově nasyntetizované amplikony jako templát pro další syntézu. Opakovanou cyklickou amplifikací exponenciálně narůstají kopie původního fragmentu. Nezbytnými komponenty reakční směsi jsou pufrční rozotky chloridu draselného (KCl) a chloridu hořečnatého (MgCl₂) a bovinní sérový albumin (BSA) pro stabilizaci reakce. Izolovaná DNA je do reakční směsi přidávána v požadované koncentraci a může být v případě potřeby ředěna vodou (Newton & Graham 1997).

V případě, že je použita polymeráza s proteinovým protektantem je zapotřebí její iniciace, tzv. hot-start. Zvýšením teploty dojde k přerušení slabých vazeb mezi polymerázou a protektantem. PCR začíná s dvouřetězovou DNA, a proto na začátku každého cyklu je třeba od sebe oddělit oba řetězce. Vystavením dsDNA teplotě 95-98 °C na 20-30 vteřin jsou porušeny vodíkové můstky mezi bázemi komplementárních vláken a vzniká ssDNA. Další fází je annealing, kdy s denaturovanou DNA hybridizují primery. Annealing probíhá 20-40 vteřin

optimálně za teploty 50–60 °C. Z obou pramerů jsou prodlužována vlákna polymerázou za přítomnosti všech čtyř deoxyribonukleosidtrifosfátů. Fáze elongace trvá 1-2 minuty a probíhá při optimální teplotě uvedené u použité polymerázy, optimální teplota pro *Taq* polymerázu je 70-80 °C. Další cyklus je pak znovu zahájen denaturací zvýšenou teplotou, kdy dojde k oddělení nově nasyntetizovaných řetězců DNA. Obvykle se pro amplifikaci používá 20-30 cyklů. Po posledním cyklu se produkty ponechají po dobu 5-15 minut při teplotě 70-74 °C ke kompletnímu dosyntetizování fragmentů. Na závěr je termocykler zchlazen na konstantní teplotu 4-15 °C, při které lze produkty PCR krátkodobě uchovávat. Produkty amplifikace jsou poté dále zpracovávány (Clark & Pazdernik 2011).

Za použití reverzní transkriptázy může být templátem i RNA, přičemž je amplifikována cDNA. Díky své vysoké citlivosti umožňuje detekci jediné kopie DNA tím, že je namnožena do té míry, která umožní její elektroforetickou separaci na gelu. Především toho se využívá při detekci virové infekce již v počátečních stádiích. Své využití našla PCR také v soudním lékařství (Alberts et al. 2015).

3.3.2 Post-PCR genotypizační techniky

Po amplifikaci extrahované DNA se zacílením na konkrétní lokus existuje několik genotypizačních technik ke studiu fenotypové variability mezi analyzovanými jedinci a s ní související sekvenční variability nukleotidů (Hashim & Al-Shuhaib 2019).

DGGE, denaturační gradientová gelová elektroforéza, je založena na rychlosti denaturace závislé na počtu vodíkových můstku v gelu s lineárním gradientem denaturačních činidel. TGGE namísto denaturačních činidel probíhá na principu roustoucího teplotního gradientu ovlivňujícího denuraci. Obě separační metody jsou založeny na snížené elektroforetické pohyblivosti částečně denaturované DNA v gelech s lineárním gradientem. Pro amplifikaci předcházející těmto separačním technikám se používá primeru, který je na svém 5'konci značen tzv. CG svorkou, oligonukleotidem bohatým na cytosin a guanin. Tímto se předchází úplné denuraci dsDNA, neboť ssDNA by byla na gelu slabě detekovatelná (Muyzer & Smalla 1998).

Techniku jednovláknového konformačního polymorfismu, PCR-SSCP, původně použili Orita et al. (1989) k identifikaci možných bodových mutací v amplikonech PCR. Hlavní koncept PCR-SSCP je založen na počáteční denuraci (melting) dvouvláknové DNA teplem na jednovláknovou DNA. V denaturovaném stavu mají molekuly tendenci se skládat do trojrozměrné konformace podle jejich nukleotidové sekvence. Při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu tedy oddělené jednotlivé řetězce molekul DNA mající stejnou velikost, zaujímají odlišné trojrozměrné struktury s různou pohyblivostí. Takové strukturní konformace jsou ovlivněny primární strukturou čili konkrétní nukleotidovou pozicí a mutace může změnit fyzickou konformaci denaturované jednovláknové DNA. Tato změna často vede k mírně odlišným umístěním mutantních jednovláknových DNA vzhledem k jejich nemutovaným protějškům v neutrálních (nedenaturačních) polyakrylamidových gelech (Gasser et al. 2006).

Při metodě PCR-RFLP je na získaný amplikon štěpen restričním enzymem. Restriční enzymy DNA rozpoznávají specifické sekvence v DNA a katalyzují endonukleolytická štěpení za vzniku fragmentů definovaných délek. Restriční fragmenty mohou být zobrazeny

elektroforézou v agarózových gelech, přičemž jsou fragmenty separovány dle jejich molekulové velikosti. Vzhledem k principu této metody, je tímto způsobem detekovatelná pouze mutace ovlivňující rozpoznávací místo některého z restričních enzymů. S mutací může vznikat nebo naopak zanikat restriční místo oproti původní nemutované alele, což je detekovatelné při elektroforetické separaci jako odlišně dlouhé fragmenty (Botstein et al. 1980).

3.3.3 Agarózová elektroforéza

K separaci nukleových kyselin dochází na základě odlišně velikosti fragmentů. Elektroforéza využívá rozdílné pohyblivosti jednotlivých fragmentů danou právě jejich rozdílnou velikostí. Obvykle platí, že delší fragmenty migrují pomaleji než kratší. Menší molekuly lépe prostupují póry agarózového gelu a rychleji tak urazí delší vzdálenost, než molekuly větší za stejný čas. Agaróza je lineární sacharidový polymer D-galaktosidázy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranozy a je izolována z mořských řas rodů *Gelidium* a *Gracilaria*. Koncentrace gelu se volí v závislosti na velikosti separovaných fragmentů. S rostoucí koncentrací gelu jsou separovány fragmenty o kratší délce (Stellwagen 2009).

Nanášecí pufr, se kterým je roztok DNA před nanesením na gel smíchán, obsahuje bromfenolou a xylencyanolovou modř, která umožňuje kontrolu rychlosti migrace fragmentů v průběhu elektroforézy. Je využívána gelová elektroforéza, kdy se molekuly nukleových kyselin separují buď v agarózovém, či polyakrylamidovém gelu. Nukleová kyselina nese díky záporně nabitým fosfátům záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybuje od záporné katody ke kladné anodě. Hmotnostní standard je použit pro odhad velikosti separovaných fragmentů nukleových kyselin. Jedná se o soubor velikostně definovaných fragmentů. Nanáší se do jedné jamky v gelu paralelně k testovaným vzorkům (Gründemann & Schömig 1996).

Nejběžnějším způsobem vizualizace molekul nukleových kyselin po elektroforetické separaci je jejich obarvení fluorescenčními barvivy. Ethidium bromid (EtBr) je k vizualizaci nukleových kyselin využíván nejčastěji (Sharp et al. 1973). EtBr se váže na nukleové kyseliny a po prosvícení fluorescenční lampou v UV transiluminátoru umožňuje sledovat výsledky gelové elektroforézy, výsledkem je tzv. elektroforeogram. Z vazby EtBr na DNA plyne, že se jedná o látku mutagenní a potenciální karcinogen, a proto je třeba při manipulaci s agarózovými gely, které jej obsahují, postupovat opatrně. Kromě toho je EtBr považován za nebezpečný odpad a musí být vhodným způsobem zlikvidován (Lee et al. 2012).

3.3.4 Vývoj metod sekvenace

Sekvenováním DNA se rozumí stanovení primární struktury DNA, tedy pořadí neboli sekvence nukleotidů. Je nedílnou součástí široké škály výzkumných aplikací. V zásadě lze rozdělit metody sekvenování na klasické a sekvenování nové generace.

Sekvenační metodu založenou na chemické degradaci popsali již Maxam a Gilbert (1977). V této metodě jsou koncově značené fragmenty DNA podrobeny náhodnému štěpení v polohách adeninu, cytosinu, guaninu nebo thyminu za použití specifických chemických činidel. Štěpení jednotlivých typů bází probíhá v samostatných zkumavkách. V každé zkumavce jsou tedy získány fragmenty specificky zakončeny příslušnou bází. Chemický útok je založen na třech krocích: modifikace báze, odstranění modifikované báze a přerušení řetězce DNA v poloze odstraněné báze. Produkty těchto čtyř reakcí se poté oddělí pomocí elektroforézy na

polyakrylamidovém gelu. Sekvenci lze snadno přečíst ze čtyř paralelních drah v sekvenačním gelu (Maxam & Gilbert, 1977). Nevýhodou metody je čas potřebný pro chemické reakce a celkově použití nebezpečných chemikálií, které vyžadují zvláštní péči při manipulaci (França et al. 2002).

Sangerova metoda, založena na enzymatické polymeraci na principu replikace, obdobně jako je tomu u PCR, se stala průlomovou metodou sekvenování. Tato metoda byla zpočátku známá jako dideoxinukleotidová. Radioaktivně značený primer, krátký oligonukleotid o známé sekvenci, nasedá na komplementární oblast templátové DNA, což je v přítomnosti volných dNTP výchozím bodem pro syntézu. Vlákno je syntetizováno na principu komplementarity k templátové DNA, dokud enzym nezačlení modifikovaný nukleotid, dideoxynukleosidtrifosfát (ddNTP), označovaný také jako terminátor, do rostoucího řetězce. Dideoxynukleotidy (ddNTP) postrádají 3' hydroxylovou skupinu, která je nezbytná pro prodloužení řetězců DNA, a proto nemohou vytvořit vazbu s 5' fosfátem dalšího dNTP (Chidgeavadze et al. 1984).

V každé zkumavce probíhala reakce za přítomnosti jednoho ddNTP. Všechny vytvořené fragmenty mají stejný 5'-konec, zatímco zbytek na 3'-konci byl určen dideoxynukleotidem použitým v reakci. Po dokončení všech čtyř reakcí je směs různě velkých fragmentů DNA rozdělena elektroforézou na denaturačním polyakrylamidovém gelu ve čtyřech paralelních drahách (Sanger et al. 1977). Modifikací metody jsou fluorescenčně značené ddNTP, kdy má každá báze jiné barevné značení, to umožňuje provedení reakce v jedné zkumavce. Výsledek je analyzován v kapilární elektroforéze. Jedním z hlavních pokroků v technologii sekvenování je vývoj automatizovaných sekvenátorů DNA. Laserový paprsek excituje fluorescenční barviva, emitovaná fluorescence je sbírána detektory a informace analyzovány počítačem (Griffin & Griffin 1993).

Pyrosekvenace je založena na sérii enzymatických reakcích vedoucích k bioluminescenci. Do reakční směsi je přidáván roztok obsahující jeden typ nukleotidu. Při zabudování báze do syntetizovaného vlákna se uvolní pyrofosfát. Ten je využit k produkci ATP, a to za přítomnosti adenosin 5' fosfosulfátu pomocí ATP sulfurylázy. Vzniklé ATP je použito pro konverzi luciferinu na oxyluciferin, což vede k produkci světla. Vzniklé světlo je zachyceno detektorem. Odmytí roztoku od neinkorporovaných dNTP je zprostředkováno pomocí apyrázy (King & Scott-Horton 2008).

Sekvenování nové generace souhrně označují metody sekvenace vyvíjené od 90. let 20. století. Tyto metody umožňují rychlejší a levnější analýzu většiny množství dat. Jako metody druhé generace jsou označovány metody na principu fragmentace genomu a následovného masivního paralelního sekvenování. Je možné jejich členění na sekvenování druhé a třetí generace (Tucker et al. 2009).

Roche GS-FLX 454 Genome Sequencer používá principu pyrosekvenace. DNA je fragmentována a ligována na obou koncích s adaptéry komplementárními k oligonukleotidům na agarózové kuličce obsažené v kapce emulze pro amplifikaci. Tento proces je označován jako emulzní PCR. Po amplifikaci jsou kuličky umístěny do jamek, kam jsou spolu s polymerázou postupně přidávány nukleotidy. Vytvářená sekvence je monitorována generováním světla prostřednictvím enzymatické reakce spojené se syntézou DNA. Celý průběh reakce je zaznamenáván kamerou a následně vyhodnocen počítačovým softwarem (Tucker et al. 2009).

Illumina/Solexa využívá cyklu reverzních terminátorů a můstkové PCR. Schéma metody obnaší připojení dvou typů adaptérů na opačné konce vytvořených fragmentů templátové DNA.

Amplifikace probíhá v reakční komůrce s imobilizovanými oligonukleotidy, jenž jsou komplementární k navázaným adaptérům. Sekvence probíhá pomocí sekvenačních primerů, komplementárních k adapterům. Do reakce jsou přidány všechny čtyři nukleotidy najednou. Nukleotidy jsou značeny různými fluorochromy a mají chemicky inaktivovanou 3' – OH skupinou. Tím je ukončena syntéza po přidání právě jednoho nukleotidy. Po začlenění detektor zachytí signál příslušného fluorochromu. Zbývající dNTP, fluorochrom a inhibiční skupina jsou vymyty (Metzker 2010).

Applied Biosystems SOLiD Sequencer využívá dvoubázové fluorescenčně-kódované sondy, což má primární výhodu v ověření signálu, neboť je každá báze detekována dvakrát. Metoda zahrnuje emulzní PCR a polymeráza je nahrazena ligázou. Sondy jsou navrženy tak, aby zkoumaly první a druhou polohu sousedící s hybridizovaným primerem. Sondy obsahují inosinové báze pro snížení složitosti knihovny a fosforothiolátovou vazbu mezi pátým a šestým nukleotidem sekvence sondy, která je štěpena ionty stříbra. Díky těmto kombinacím je 16 dinukleotidů kódováno čtyřmi barvivy. Elongace primeru je několikrát resetována a nakonci jsou světelné signály zarovnávané k vyhodnocení finální sekvence (Metzker 2010).

Helicos BioSciences sekvenuje jednotlivé molekuly DNA bez předchozího kroku amplifikace, neboť je k dispozici vysoce citlivý fluorescenční detekční systém. DNA je fragmentována na délku 200-300 b a na její 3'konec je přidán poly-A primer fluorescenčně značený. Fragmenty jsou hybridizovány s oligo-T imobilizovanými v průtokové kyvetě. V každém sekvenačním cyklu se přidá polymeráza, a právě jeden fluorescenčně značený nukleotid (Milos 2010).

ION torrent je produktem Thermo Fisher Scientific. Jedná se o techniku sekvenování DNA založenou na detekci vodíkových iontů uvolňovaných při syntéze DNA během inkorporace nových nukleotidů (Ribani et al., 2018). Detekce probíhá v sekvenačních čípech a vodíkové inoty jsou rozpoznávány jako změny pH roztoku. Tento proces eliminuje potřebu světla, skenování a kamer pro monitorování procesu sekvenování syntézou (Goswami & Sanan-Mishra, 2022).

Třetí generace sekvenování představuje sekvenaci jedné molekuly DNA, které záměrně nepozastavuje syntézu vlákna po začlenění jedné báze.

SMRT (single-molecule real-time), jednomolekulové sekvenování v reálném čase, je sekvenátor vyvinutý společností Pacific Biosciences, který přímo pozoruje imobilizovanou molekulu DNA polymerázy při syntéze. Adice báze je měřena pomocí fluorescenční detekce gama-značených hexafosfonukleotidů. Po zabudování báze je odštepen linker s fluorescenčním barvivem a syntéza bez přerušení může pokračovat. Sekvenační platforma SMRT vyžaduje minimální množství reagentie a přípravy vzorku a nejsou zde žádné časově náročné kroky skenování a promývání, což umožňuje rychlejšího dosažení výsledku. Kromě toho sekvenování SMRT nevyžaduje rutinní PCR amplifikaci, kterou potřebuje většina systémů druhé generace, čímž se zabrání systematickému zkreslení amplifikace. Procesivita DNA polymerázy je plně využita (Schadt et al. 2010). Kromě sekvenování DNA technologie SMRT demonstrovala přímé pozorování ribozomu v reálném čase, když překládal mRNA (Uemura et al. 2010).

Oxford Nanopore je technologie nanopórového sekvenování, která spočívá v detekci změny napětí na membráně nanopóru. Vlákno DNA je vedeno skrz nanopór a charakteristikou změnou napětí lze identifikovat bázi, která právě nanopórem prošla. (Schadt et al. 2010).

4 Metodika

Hlavním cílem diplomové práce je ověřit, zdali je kadeřavost u československých vlčáků způsobena některou z doposud publikovaných kauzálních mutací genu *KRT71*. Z výzkumu Candieu et al. (2009) byla lokalizována kandidátní SNP mutace v exonu 2 genu *KRT71* na chromozomu 27. Relevantní SNP asociována s kadeřavou srstí způsobuje změnu kodonu a 151 aminokyselina arginin je nahrazena tryptofanem při translaci do proteinu *KRT71*. Ze studií Salmela et al. (2019) a Bauera et al. (2019) byla identifikována kauzální mutace fixována u kudrnatého retrívra. Popsaným polymorfismem je delece CCTGAAGC sekvence a následná inserce ACA na exonu 7, čímž je změněn čtecí rámec a dochází k posunu stop-kodonu translovaného proteinu.

Vzhledem k tomu, že u československého vlčáka nebyla doposud provedena žádná genetická analýza genu *KRT71*, nebylo možné v úvodu práce odhadnout, která z těchto dvou mutací by teoreticky mohla způsobovat kadeřavou srst u československých vlčáků, proto byl při řešení diplomové práce navržen metodický postup, který bude vhodný pro identifikaci obou mutací.

4.1 Hodnocená zvířata

4.1.1 Ostatní plemena s variabilní strukturou a délkou srsti

Pro optimalizaci molekulárních markerů byli vybráni zástupci následujících plemen s variabilní strukturou a délkou srsti: irský setr (dlouhá a rovná srst), samojed (dlouhá a rovná srst), Jack Russell teriér (krátká a rovná srst), stafordšírský bulteriér (krátká a rovná srst), australský ovčák (dlouhá a rovná až zvlněná srst), mops (krátká a rovná srst), ruská barevná bolonka (kadeřavá srst), kerry blue teriér (kadeřavá srst), curly coated retrívr (kadeřavá srst). U všech jedinců se jednalo o jedince s průkazem původu.

4.1.2 Hodnocení jedince plemene Československý vlčák

Cílem analýz bylo zjistit, zdali zvlněná srst u československých vlčáků je způsobena geneticky nebo zdali je to efekt působení negenetických faktorů. Proto byla populace hodnocených jedinců rozdělena na dvě části. Zvířata zařazená do genotypizované populace jsou označena zktratkou CSV. První část populace (A) představovala 30 jedinců, u kterých byla na základě fenotypu prokázána zvlněná srst nebo se jednalo o jedince, jež měli ve svém rodokmenu předky se zvlněnou srstí nebo jejich předci poskytovali potomstvo se zvlněnou srstí.

Tato část populace byla záměrně vybrána na základě konzultací s Ing. Danielou Čílovou, která je chovatelkou tohoto plemene, aktivně se účastní bonitací a svodů a má tedy velmi dobrý přehled o výskytu této atypické srsti u československých vlčáků.

Druhá část populace (B) představovala 50 jedinců, kteří mají standardní strukturu srsti a ani v jejich rodokmenu nebyla podchycena kadeřavá srst. V této subpopulaci se naopak vyskytovali jedinci, u kterých byla zjištěna dlouhá srst a teoreticky zde byli očekáváni i přenašeči kauzální mutace pro dlouhou srst.

Celková populace tudíž čítala 80 jedinců, kteří představovali 38 fen a 42 psů, narozených v letech 2005 až 2018. Do rodokmenové analýzy byla zařazena zvířata, která nebyla geneticky

analyzována, ale která představují důležité propojení mezi analyzovanými probandy. U některých z těchto zvířat, mnohdy již nežijících, je známy fenotypový projev struktury srsti. Tato zvířata jsou v práci označena zkratkou X s přiřazeným číslem.



Obrázek 1: Kadeřavá srst okolo hlavy a krku, <https://wolfdog.org/pt-pt/gallery/pic/144451/>



Obrázek 2: Viditelně kadeřavá srst na hřbetě, <https://wolfdog.org/gallery/pic/220359/>



Obrázek 3: Kadeřavý dospělý jedinec, <https://www.wolfdog.org/dl/g/14/144450.jpg>



Obrázek 4: Dlouhá srst u štěněte, <http://www.odneplachovickelipy.wbs.cz/>



Obrázek 5: Dlouhosrsté štěně <http://www.yzengrin.wbs.cz/Odchovy.html>



Obrázek 6: Jedná se o stejné zvíře jako na předchozím obrázku, zde již jako dospělý jedinec <http://www.yzengrin.wbs.cz/Odchovy.html>

4.2 Izolace DNA

U referenčních plemen i u zástupců československého vlčáka byla DNA izolována z epitelálních buněk odebraných bůkálním stěrem za použití sterilních cytologických kartáčků.

Následná izolace byla provedena dle protokolu NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel. Cytologické kartáčky se vzorky DNA byli odstříhnuty a vloženy do sterilních zkumavek o objemu 1,5 ml. Lýze buněk ve vzorku byla zajištěna přidáním pufru T1 a proteinázou K. Obsah zkumavky byl promíchán ve vibrační třepačce a ponechán 1-3 hodiny v termobloku při teplotě 56 °C. Po inkubaci byl do zkumavek přidán pufr B3 a obsah opět promíchán vibrační třepačkou a vložen do termobloku při teplotě 70 °C po dobu 10 minut. Poté byla přidána RNáza a objem ručně promíchán a ponechán 5 minut.

Následně byly ze zkumavek vyjmuty pinzetou odstřižené cytologické kartáčky a přidán absolutní ethanol a ručním překlápěním zkumavek byl jejich obsah promíchán. Vzorky byly přeneseny do zkumavek se silikátovými filtry, ve kterých byly vloženy do cetrifugy a ztočeny. Prve byly filtry promyty roztokem BW a poté B5, nakonec sušeny v odstředivce. Vysušené filtry byly přeneseny do čisté zkumavky a promyty 100 µl roztoku BE, zahřátým na teplotu 70 °C, za zisku čisté DNA. Kvantifikace izolovaných vzorků byla stanovena UV spektrofotometricky (NanoPhotometr Implen).

Teoreticky možná kontaminace izolované DNA různými organickými sloučeninami byla hodnocena na základě poměrů absorbcí A260/A280 a A230/280. Vzhledem k tomu, že cílem diplomové práce není hodnocení kvality ani kvantity izolované DNA, získaná data nebyla detailně statisticky zpracována.

4.3 Detekce kauzální mutace genu *FGF5* c.284G>T zodpovědné za dlouhou srst

Vzhledem k tomu, že cílem práce je ověřit, zdali u zástupců plemene československý vlčák může docházet ke kumulaci mutací zodpovědných za délku srsti a kadeřavost srsti u jednoho jedince, byla provedena analýza u všech zástupců plemene československý vlčák s cílem detekovat kauzální mutaci genu *FGF5* vedoucí k dlouhé srsti.

Pro experiment byly použity výsledky Housley & Venta (2006), kteří pozorovali substituční mutaci G>T v 284 nukleotidu exonu 1 genu *FGF5* lokalizovaného na chromozomu 32 vedoucí k záměně cysteinu za fenylalanin. Fenotypový výsledek této substituční mutace je dlouhá srst.

Pro experimenty byl použit optimalizovaný metodický postup, který publikovala Krausová (2018). V diplomové práci byla mutace detekovaná metodou PCR-RFLP. Pro amplifikaci PCR produktu byla použita dvojice primerů, která byla navržena při řešení diplomové práce Krausová (2018). Tato dvojice primerů ohraničuje sekvenci o délce 180 bp. Primer FGF5-284-F je oligonukleotid o délce 23 bp. Sekvence tohoto primeru je GTCTTCCTCTTCTTCCTCCGTCT ve směru do 5'konce k 3'konci. Primer FGF-284-R je oligonukleotid o délce 20 bp. Sekvence tohoto primeru je CTACCGTTTCAGTTACCGAG ve směru do 5'konce k 3'konci.

Složení polymerázové řetězové reakce bylo následující: 30 ng templátové genomické DNA v 12,5 µl, KCl pufr 1x, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, Primer FGF5-284-F 0,4 µM,

Primer FGF-284-R 0,4 μM , enhancer – oxalacetát (Top-Bio) 2 mM, BSA 5 ng \cdot 12,5 μl^{-1} a *Taq* polymeráza (Thermo SCIENTIFIC) 0,7 U \cdot 12,5 μl^{-1} .

Pro amplifikaci byl použit termocykler (C 1000 Thermal Cycler, BioRad) s následujícím program:

Iniciace při 95 °C po dobu 180 sekund, denaturace při 95 °C po dobu 30 sekund, annealing při 63 °C po dobu 20 sekund, elongace při 72 °C po dobu 30 sekund. Denaturace, annealing a elongace se opakovali v 34 cyklech. Finální elongace probíhala při 72 °C po 420 sekund. Fáze udržování byla nastavena na 12 °C.

Pro detekci mutace bylo použito restrikčního štepení enzymem *Pst*I (Thermo SCIENTIFIC). Restrikční štepení probíhalo dle následujícího schématu: K PCR amplikonu jednoho jedince o objemu 5 μl bylo přidáno 9 μl H₂O, 1 μl 10 \cdot Pufro O a 1 μl *Pst*I restrikčního enzymu. Restrikční směs byla inkubována v termocykleru (C 1000 Thermal Cycler, BioRad) po dobu 16 hodin při teplotě 37 °C. Enzym byl inaktivován zahřátím vzorku na 65 °C po dobu 20 minut. Produkty restrikčního štepení byly následně separovány v 4 % agarózovém gelu při konstantní hodnotě napětí 100 V a po dobu 60 minut. Získané produkty restrikčního štepení byly vizualizovány pomocí EtBr prostřednictvím UV Transiluminátoru (BioRad Gel Doc XR+ Documentation System) a následně digitalizovány pomocí digitalizačního systému QuantityOne GelDoc (BioRad).

Vlastní genotypizace byla provedena dle protokolu, který navrhla Krausová (2018). U jedinců s nemutovanou alelou v homozygotní sestavě (W/W) byly výsledkem restrikčního štepení 3 fragmenty o velikostech 125 bp, 25bp a 30 bp. U jedinců, kteří nesli obě alely mutované (M/M), byly produktem restrikčního štepení dva fragmenty o velikosti 150 bp a 30 bp, neboť vlivem mutace dochází ke ztrátě jednoho restrikčního místa, palindromu, rozeznávaného restrikčním enzymem *Pst*I. U heterozygotních jedinců (W/M) vznikaly čtyři fragmenty o velikostech 150 bp, 125 bp, 30 bp a 25 bp.

4.4 Detekce mutace c.1266_1273delinsACA

Mutace c.1266_1273delinsACA je způsobena delecí nukleotidů CCTGAAGC v pozici 1266 až 1273 a následnou inzercí nukleotidů ACA. Touto změnou sekvence dochází k změně čtecího rámce a posunu stop-konodu. Tím je zapříčena produkce odlišného proteinu jakožto výsledku translace.

4.4.1 Bioinformatická analýza sekvence genomické DNA s výskytem mutace c.1266_1273delinsACA

Metodicky se jednalo o bioinformatickou analýzu sekvence genu *KRT71*, při níž byla využita celogenomická sekvence psího genomu pod označením >NC_006609.4 (Lindblad-Toh et al. 2005). V mezinárodní databázi NCBI (Sayers et al. 2022) byla vyhledána pozice genu *KRT71* na chromozomu 27. V sekvenci genu *KRT71* byl identifikovaný 7 exon a v tomto exonu bylo lokalizováno mutační místo. Vzhledem k tomu, že referenční sekvence >NC_006609.4 v mezinárodní databázi NCBI představovala sekvenci získanou u plemene německý boxer, jednalo se o alelickou variantu odpovídající rovné srsti. Jinými slovy se u něj nenacházela popsaná delece sekvence CCTGAAGC a následná inzerce ACA.

Dalším krokem bioinformatické analýzy genu bylo navržení primerového páru, který bude lemovat tuto mutaci a který bude poskytovat PCR produkt vhodný pro následující Sangerovo sekvenování. Pro navržení primerů byl použit program Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000). Specifita navrženého primerového páru byla ověřena pomocí funkce Primer-BLAST (Ye et al. 2012), která je součástí online dostupného softwaru BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Vzhledem k tomu, že se jedná o inzerčně-deleční mutaci byly předpokládáné mutační polymorfismy detekovány pomocí Sangerovy sekvenace získaných PCR produktů

4.4.2 PCR amplifikace fragmentu genu *KRT71* s výskytem mutace c.1266_1273delinsACA

Pro amplifikaci byla použita dvojice primerů KRT71-DELINS-F a KRT71-DELINS-R, která byla navržena dle výše popsaného postupu. Neboť se jedná o delečně-inzerční mutaci, amplikony se v přítomnosti, či nepřítomnosti mutace lišily svou velikostí. Produkt amplifikace nemutované alely je 206 bp dlouhý amplikon. V případě mutované alely se jedná o 201 bp dlouhý amplikon. KRT71-DELINS-F je oligonukleotid o délce 22 nukleotidů, jehož sekvence je:

5'...GATGCTGCGCGAGTACCAGGAG...3'

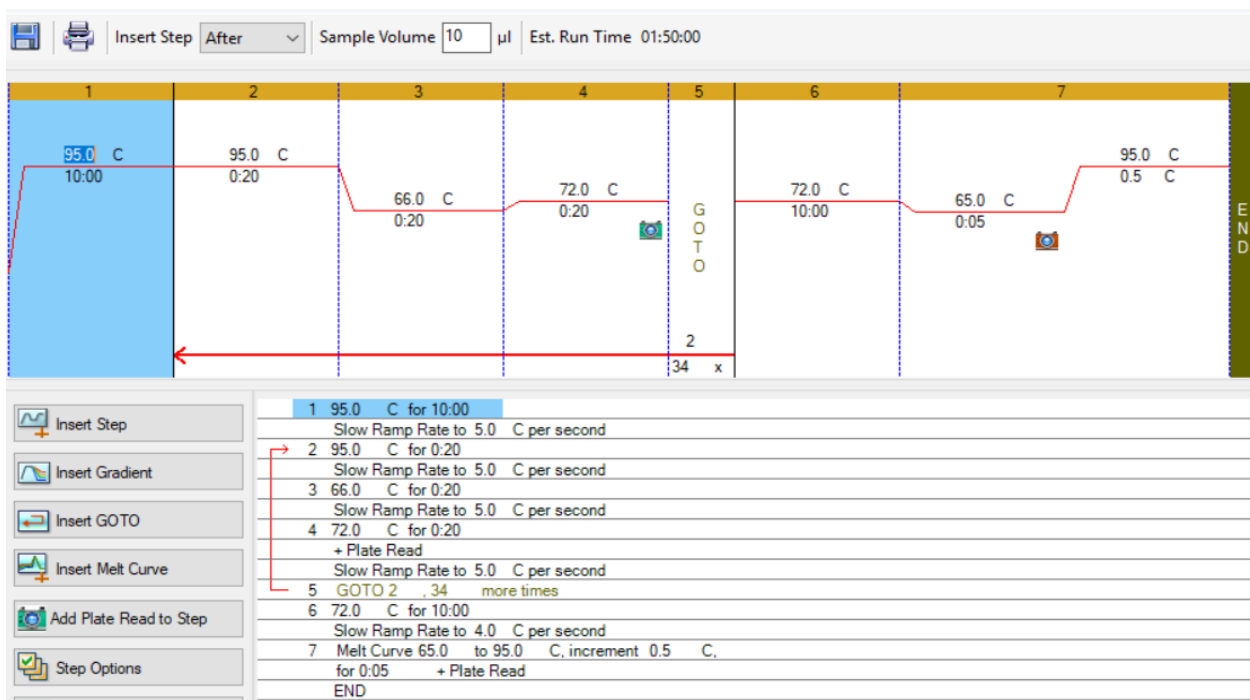
KRT71-DELINS-R je oligonukleotid o délce 24 nukleotidů, jehož sekvence je:

5'...CATCATCACCCAAGGATGCCCTT...3'

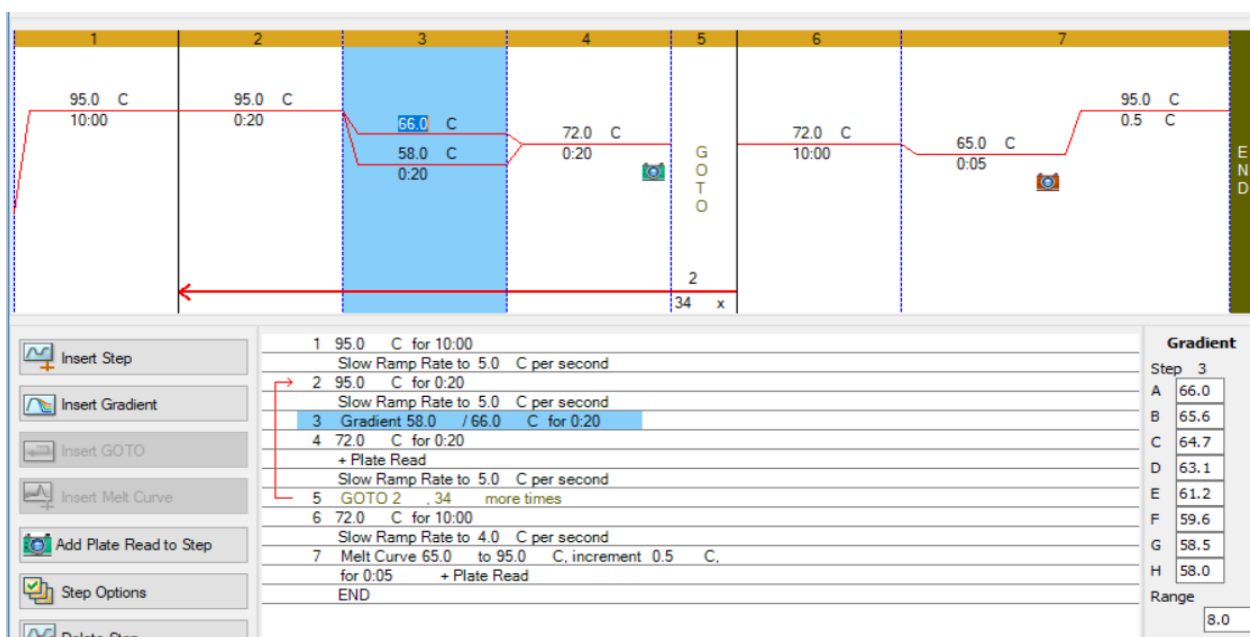
Pro amplifikaci byl použit amplifikační kit FAST START ESSENCIAL DNA GREEN MASTER (Roche). Amplifikační reakce o objemu 10 µl obsahovala 20 ng genomické DNA. Koncentrace každé z primerů byla 500 nM.

Vzhledem k tomu, že se jednalo o námi nově navržený primerový pár, bylo nutné stanovit optimální teplotu annealingu, hybridizace primerů s teplátovým vláknem DNA. Amplifikace probíhala v termocykleru (CFX Connect Real-Time PCR Detection System BioRad®). Profil amplifikace včetně použitého gradientu je uveden na následujících dvou obrázcích.

Z obrázku 7 vyplývá, že po amplifikaci PCR fragmentů následovala post-amplifikační analýza – melting analýza, jejímž cílem bylo vyhodnocení melting křivky, která podává informace o specifitě amplifikace. Pro amplifikaci i pro post-amplifikační analýzu byl použit CFX Maestro Software (BioRad).



Obrázek 7: Amplifikační profil PCR produktů, jak mutace c.1266_1273delinsACA, tak i mutace c.451C>T



Obrázek 8: Teplotní gradient pro stanovení optimální teploty annealingu navržených primerů

4.4.3 Detekce mutace c.1266_1273delinsACA pomocí Sangerovy sekvenace

PCR amplikony, připravené dle protokolu uvedeného v kapitole 4.4.2, byly nejprve separovány v 2,5 % agarózovém gelu. Jejich vizualizace byla provedena pomocí ethidium bromidu. Z agarózového gelu byly skalpelem vyříznuty bločky s požadovaným PCR amplikonem. Amplifikovaný fragment byl z gelu extrahován pomocí kitu GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo SCIENTIFIC). Pro extrakci byl dodržen metodický postup dodávaný výrobcem kitu.

Finálním krokem extrakce fragmentu z gelu byla eluce PCR amplikonu ze silikátového filtru 20 µl ddPCR H₂O (pH 8). Eluované fragmenty byly kvantifikovány shodným

postupem, jakým byla kvantifikována izolovaná genomická DNA. Získané amplikony byly sekvenovány vždy od KRT71-DELINS-F i KRT71-DELINS-R primerů. Sekvence byla provedena jako servis poskytovaný firmou Eurofins Genomics. Koncentrace primerů i koncentrace sekvenované DNA byla připravena dle požadavků, uvedených v protokolu firmy Eurofins Genomics (https://eurofinsgenomics.eu/media/1587670/eurofins-flyer-tubeseq_20221214_online.pdf). Vzorky určené k sekvenování byly označeny dle instruktážního protokolu, který prezentuje Eurofins Genomics na svých stránkách.

Získaná hrubá sekvenační data byla následně zpracována programem BioEdit (Hall 1999). Ze získaných hrubých dat byly sestaveny konsenzuální sekvence. Jejich porovnání bylo uskutečněno rovněž pomocí programu BioEdit (Hall 1999).

4.5 Detekce mutace c.451C>T

Substituční mutace v pozici 451 nukleotidu, kdy je deoxycytidinfosfát nahrazen deoxythymidinfosfátem, způsobuje změnu 151 aminokyseliny cysteinu za fenylalanin při proteosyntéze *KRT71*, čímž je ovlivněna struktura keratinových intermediárních filament vlasového stvolu a zapříčeneána jeho kadeřavá struktura.

4.5.1 Bioinformatická analýza sekvence genomické DNA s výskytem mutace c.451C>T

U kauzální mutace c.451C>T, způsobené substitucí byla provedena bioinformatická analýza obdobným způsobem jako tomu bylo u mutace c.1266_1273delinsACA. Vzhledem k tomu, že tato mutace je lokalizována na exonu 2, byla v celogenomické referenční sekvenci s označením >NC_006609.4 (Lindblad-Toh et al. 2005) identifikována mutační pozice genu *KRT71* v exonu 2. Referenční sekvence odpovídá genomu psa plemene německý boxer, plemeno s rovnou srstí, byla proto v pozici mutace identifikována C/C alelická sestava. Navržení primerů a posouzení jejich specifity bylo provedeno shodným způsobem jako u mutace c.1266_1273delinsACA.

4.5.2 PCR amplifikace fragmentu genu *KRT71* s výskytem mutace c.451C>T

Amplifikace byla provedena podle stejného protokolu jako u mutace c.1266_1273delinsACA. Pro výběr optimální teploty annealingu byl použit stejný gradient jako u mutace c.1266_1273delinsACA. Gradient i amplifikační profil je znázorněn na obrázcích 1 a 2.

Pro amplifikaci mutace c.451C>T byla navržena dvojice primerů KRT71-451-F a KRT71-451-R. Produktem amplifikace byl 127 bp dlouhý amplikon.

Primer KRT71-451-F je oligonukleotid o délce 24 nukleotidů, jehož sekvence je:

5'...GGGGCTCAACAGTTTCTGCACTTT...3'

Primer KRT71-451-R je oligonukleotid o délce rovněž 24 nukleotidů, jehož sekvence je:

5'...GCTCCAGGTTGTTCTTGCAGTTGT...3'

4.5.3 Detekce mutace c.451C>T pomocí Sangerovy sekvenace

Sekvenační analýza byla provedena podle stejného protokolu jako u mutace c.1266_1273delinsACA.

4.5.4 Detekce mutace c.451C>T pomocí restrikčního štepení

Substituční mutace c.451C>T je zodpovědná za ztrátu restrikčního místa u mutované alely pro enzym *AciI*. Proto bylo možné navrhnout a validovat metodu PCR-RFLP. Prvním krokem pro navržení této metody bylo určení, zdali nemutovaná alela (W) je odlišitelná od alely mutované (M). Pro tuto analýzu byla použita volně přístupná aplikace Webcutter (Heiman 1997). Nalezení vhodného restrikčního enzymu probíhalo následovně: Sekvence amplikonů, vymezená primery KRT71-451-F a KRT71-451-R, byla vložena do zadávacího okna softwaru Webcutter (Heiman 1997), a to nejprve pro alelu nemutovanou a následně pro alelu mutovanou. Program automaticky identifikuje palindromy a uvede přehled všech restrikčních enzymů, které jsou schopny štepit amplikon odpovídající nemutované i mutované alely. Získaný přehled enzymů byl porovnán a byl identifikován restrikční enzym, který je schopen štepit pouze jednu z alelických variant. V tomto případě se jednalo o enzym *AciI*, který štepí pouze alelu nemutovanou.

PCR-RFLP markery mají kodominantní charakter, a proto navržený způsob detekce odlišných alel bude schopen identifikovat jedince, kteří nesou obě alely nemutované (W/W), heterozygoty (W/M) a jedince s mutovanou alelou v homozygotní sestavě (M/M).

Výstupem programu Webcutter (Heiman 1997) byla i velikost restrikčních fragmentů, které působením enzymu *AciI* vznikají u mutované alely. Dle výsledku této analýzy by amplikon mutované alely o velikosti 127 bp měl být štepena na dva fragmenty, a to o velikostech 39 bp a 88 bp. Vlastní restrikční štepení u každého vzorku představovalo 5 µl PCR produktu, 9 µl H₂O, 1 µl 10 · Pufro O a 0,5 µl enzymu *AciI*. Štepení probíhalo v termocykleru (C 1000 Thermal Cycler, BioRad) při teplotě 39 °C po dobu 11 hodin. Enzymu byl inaktivován následným zahřátím vzorků na 65 °C po dobu 20 minut. Získané restrikční fragmenty byly separovány v 3,5 % agarózovém gelu po dobu 45 minut při konstantním napětí 120 V. Produkty restrikčního štepení byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu prostřednictvím UV Transiluminátoru (BioRad Gel Doc XR+ Documentation System) a následně digitalizovány pomocí digitalizačního systému QuantityOne GelDoc (BioRad).

4.6 Genealogická studie přenašečů mutované alely genu *KRT71* c.451C>T

Vzhledem k tomu, že předcházející části diplomové práce jednoznačně potvrdili, že mutace c.451C>T je skutečně kauzální mutací u plemene československý vlčák způsobující kadeřavou srst, bylo přistoupeno ke genealogické studii s cílem odhadnout, kteří jedinci mohli a mohou teoreticky tuto mutaci předávat. U jedinců použitých pro analýzu byla zachována anonymita, a proto nejsou zmíněna jména jedinců ani jiné identifikační údaje.

Pro genealogickou studii byla použita část populace záměrně vybraná ve spolupráci s Ing. Danielou Čílovou. Pro grafické zpracování genealogické studie byl použit program Gramps (Allingham 2001-2006). Jako vstupní data pro tento program byly použity kódy jednotlivých hodnocených zvířat. Jejich příbuzenské vztahy byly ověřeny prostřednictvím

databáze Wolfdog database (2013). Pokud byl daný jedinec genotypizován, pak u něj byl uveden detekovaný genotyp z pohledu kauzální mutace c.451C>T. Na základě konzultací s Ing. Danielou Čílovou byli u jedinců se známým fenotypem (standardní nebo kadeřavá srst) doplněny informace o struktuře srsti. Na základě porovnání genotypu probanda a na základě jeho fenotypového projevu byl proveden odhad, od kterého rodiče mohl teoreticky získat mutovanou alelu. To znamená, že na základě porovnání 30 rodokmenů byli identifikováni společní předci, kteří spojovali jedince s kadeřavou srstí a tyto jedince lze teoreticky považovat za donory mutací.

4.7 Statistické zpracování výsledků z hlediska populační genetiky

Analýza genomu studovaných jedinců poskytla data o segregaci dominantní a recesivní alely ve sledovaném znaku výběrového souboru (N) populace plemene československý vlčák. Na základě Hardy-Weinbergovy rovnováhy byly vypočteny absolutní (D, H, R) a relativní (d, h, r) frekvence genotypů.

$$N = D + H + R$$

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

Z takto dopočtených frekvencí genotypů byly poté získány absolutní (P, Q) a relativní (p, q) frekvence alel sledovaného znaku.

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

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad p = \frac{P}{2N} \quad q = \frac{R}{2N}$$

Rozdíly v počtech jedinců s danými genotypy či alelami mezi populacemi i mezi geny byly hodnoceny pomocí Pearsnova χ^2 testu se simulací p-hodnoty softwarem R (R Core Team 2022).

Na základě získaných informací byla provedena analýza z pohledu populační genetiky. Byla vypočtena pozorovaná heterozygotnost (H_o) a heterozygotnost očekávaná (H_e). Pro výpočet těchto základních populačních parametrů byl použit program Cervus (Kalinowski et al. 2007).

5 Výsledky

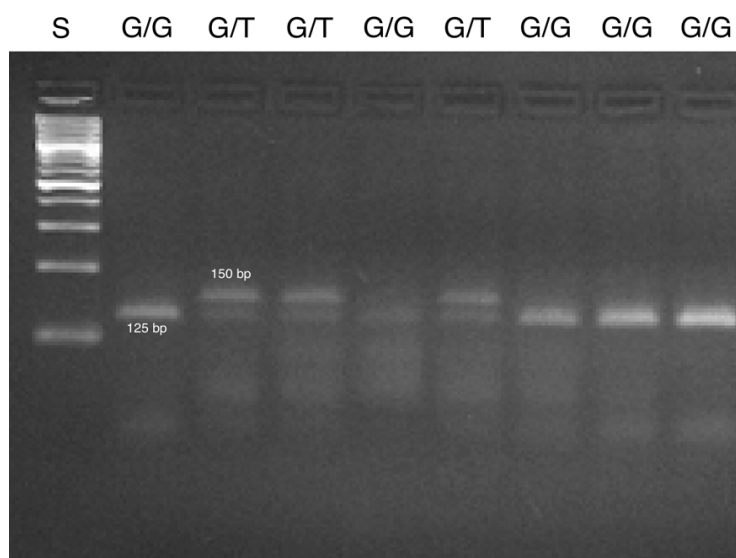
5.1 Hodnocení izolace genomické DNA

Kvalita a kvantita extrahované DNA je velice důležitá pro následující PCR analýzy. O tom, že zvolený metodický postup vedl k získání kvalitní vysokomelukární DNA s odpovídající čistotou svědčí následující parametry: z jednoho bukální stěru bylo získáno průměrně 11 µg DNA (variační koeficient je roven 8 %). Průměrná hodnota poměru A260/A280 byla 1,89 (variační koeficient je roven 5,3 %) a průměrná hodnota poměru A260/A230 byla 1,96 (variační koeficient je roven 7,5 %).

5.2 Genotypizace populace z hlediska výskytu alel genu *FGF5*

V diplomové práci jsem ověřila, že metodický postup, který navrhla Krausová (2018) spolehlivě fungoval i u dalších reprezentantů plemene československý vlčák. Navržená dvojice primerů FGF5-284-F a FGF5-248-R spolehlivě amplifikovala produkt o velikosti 180. Rovněž produkty restriktivního štepení odpovídaly velikostem uvedeným v kapitole 4.3.

Na následujícím obrázku je uveden elektroforeogram, ve kterém jsou patrné kombinace nemutované alely W a mutované alely M genu *FGF5*. V celkové populaci hodnocených československých vlčáků bylo detekováno 65 jedinců s genotypem W/W, 13 jedinců s genotypem W/M a 2 homozygoti M/M.



Obrázek 9: Elektroforeogram s výsledky štepení endonukleázou *PstI*

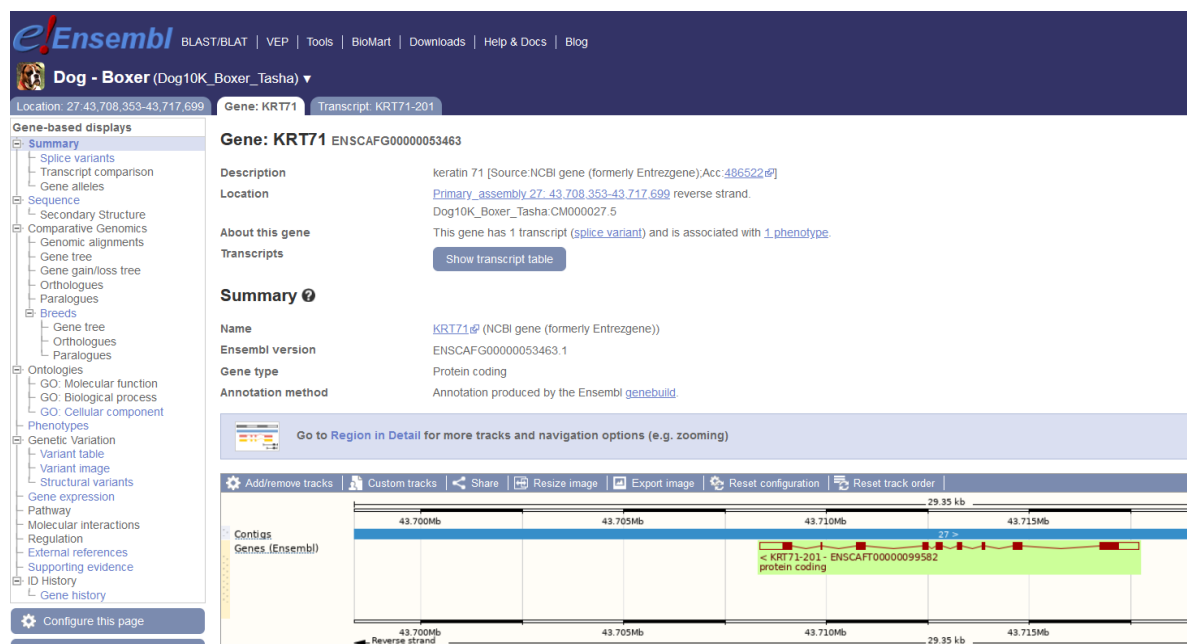
S - GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo SCIENTIFIC)

Bližší vyhodnocení z hlediska populační analýzy je součástí výsledkové kapitoly 5.7. Detailní výsledky genotypizace u všech zástupců plemene československého vlčáka jsou součástí přílohy 15 diplomové práce.

5.3 Výsledky bioinformatické analýzy a navržení primerů pro studium variability genu *KRT71*

5.3.1 Bioinformatická analýza

Z výsledku bioinformatické analýzy provedené v Ensembl (Cunningham et al. 2022), je patrné, že gen *KRT71* je lokalizovaný na 27 chromozomu a má pouze jednu variantu sestříhu. Struktura exonu a intronu tohoto genu je znázorněna na obrázku 10.



Obrázek 10: Struktura genu *KRT71*

Na dalším obrázku je uveden výstup bioinformatické analýzy, kde jsou detailně popsány exony genu *KRT71*. Mutace c.451C>T je lokalizovaná v exonu 2 a mutační místo je na obrázku znázorněno červeným kroužkem. Druhá mutace c.1266_1273delinsACA se nachází na exonu 7. Sekvence uvedená na obrázku 11. představuje DNA německého boxera s krátkou srstí, a proto se zde popsaná delece nenechází. Potenciální místo delece je označeno červeným rámečkem.

No.	Exon / Intron	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence
<p>Exons/ Introns Translated sequence Flanking sequence Intron sequence UTR</p> <p>Variants 3 prime UTR 5 prime UTR Missense Synonymous</p> <p>Markup loaded</p>							
	Intron 1-2	<u>43,716,745</u>	<u>43,714,816</u>			1,900	AAUAAAGCTCTGACCTGCGGCTGCAGACGCCCAATGCCAAGCACAATAGAGAGGGTGG CGTCCAGCTCTACTGCACTCTCAGACGCCCTGTAGGATTTGGCCCTCCGCTCCAG CATCGAATCTCTCCACACACAGAGCCGCCAAATTCCTCTGCAAGTGGGAGCT GCCTCCAAAGGGGGGCTCAGCCGCTCTGGCAGTCTCCGGGGGCACTCATCTCTC TACCCTCAGAGGGGCAAGAGGCTCAGAGAGGTTTGGAGAGCCGAGCCTCTCAGAGCTG GGAGCATCTGGAACTCTCTTTAAGTGGCCAGCAGAGGGGAAAGAGAGAGGATAT GGTTTGGTGCAGCGGGCCAGTGGCTTTCTGGAGCATTTTGGAGTGGTGGCTTG GGCTCGTGGCTGGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG AGCTCTGGCCCTCTCAGCTGGAGCTGGAGCCCGGAGATCCAGAAATGAGAGCCAG GACGGAGCAGATCAAGGGCTGAAACAAAGTTGCTCTCTCTCATCAGAG
2	ENSCAFE0000468645	<u>43,714,815</u>	<u>43,714,601</u>	0	2	215	GTCTGCTTGGAGCAGCAGACAGAGTGTGGAGCAAGTGGAGCTGGAGCTGGAGCAG CTGATCTGAACTCGAAGAACCTGGAGCCCTCTCGAGGCTCATCTCGAGGCTCATCAGAAC CTCGGAGCAGCTGAGAGCTGTCTGGAGAGGGTGGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAG AGCTGGGGACCTGTGGAGACTACAGAGG
	Intron 2-3	<u>43,714,600</u>	<u>43,713,904</u>			697	gtgagcgggaaggggtctccgcg.....cgacggagccctggctattggcag
3	ENSCAFE0000447251	<u>43,713,903</u>	<u>43,713,843</u>	2	0	61	GTACAGAGGAAGAAATCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG G
	Intron 3-4	<u>43,713,842</u>	<u>43,713,323</u>			520	gtgaggggaaggaagctcag.....gagggagctgggggaactttcag
4	ENSCAFE0000460309	<u>43,713,322</u>	<u>43,713,227</u>	0	0	96	GAGTGGAGGGGCTTAGTGCATAAGGTGGAGCTGGAGAGCAATGGATCTCATGGAC CAGAGATCAAAATCTTCACTGTCTCTATGAGCC
	Intron 4-5	<u>43,713,226</u>	<u>43,712,862</u>			365	gtaaqctctcttaaccgccccc.....gagaccagccctgtcccactctag
5	ENSCAFE0000427318	<u>43,712,861</u>	<u>43,712,697</u>	0	0	165	GAGATGCTCAGATCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAG AAACGGAGCTGACTGGAGAGCATCTGAGAGAGCTGGAGAGCTGGAGAGCTGGAGAGATC GCCCTGAAGAGCAGGCCAGGCCAGGGCTGTATCAGAGCAG
	Intron 5-6	<u>43,712,696</u>	<u>43,712,496</u>			201	gtgagcgggctgagcaggaccag.....tggtctgtgcttgggttggctcccag
6	ENSCAFE0000482896	<u>43,712,495</u>	<u>43,712,370</u>	0	0	126	TTCAGAGCTGAGCTGGAGCCGGCCGGCCGGCCGGCCGGCCGGCCGGCCGGCCGGCCGGCC GAGATCCGGAGCTCACCCGGCTCATCCAGAGATCCGCTCAGAGATTCAGAGATTCAGAG AAGCAG
	Intron 6-7	<u>43,712,369</u>	<u>43,710,949</u>			1,421	gtgaggggaccggtgcccctggc.....ccagctctctgtgctccctctgca
7	ENSCAFE0000475708	<u>43,710,948</u>	<u>43,710,728</u>	0	2	221	GCATCCAGCTGGAGAGGGCATGCGCGATGCCGAGCAGCGGGGTGAAAGTGCCTTGAG GAGCCCGAGCCAGCTGGAGAGCTGGAGAGCCCGCCCGCCAGCCAGCCAGAGAGACTG GCCGGATCTGGCGAGTACAGAGCTGTGACCTGAGAGCTGGAGAGCTGGAGAGCTGGAG ATCCGCCACTACCGCAGAGCTGTGGAGAGAGAGAGAGAG
	Intron 7-8	<u>43,710,727</u>	<u>43,709,890</u>			838	gtggggggctgggggggtctctgc.....ctattttttttttttcccaaacag

Obrázek 11: Sekvence exonů a intronů genu KRT71 s vyznačením kauzálních mutac

5.3.2 Výsledky návržení primerů pro amplifikaci mutace c.1266_1273delinsACA

Na obrázku 12 jsou uvedeny sekvence primerů KRT71-DELINS-F a KRT71-DELINS-R, včetně jejich charakteristik. Tento obrázek představuje výstup programu Primer-BLAST (Ye et al. 2012). Z obrázku 12 je patré, že bioinformatickou analýzou bylo zjištěno, že navržená dvojice primerů je specifická a v celogenomické sekvenci psa by měla nasedat pouze v jediném místě, keré je rovněž na obrázku vyznačeno.

Primer-BLAST » JOB ID:pqx4ngtqBslh_AP5Dpkny3SCNviZkS3kWA

Primer-BLAST Results ?

Input PCR template: none

Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Canis lupus familiaris Dog10K_Boxer_Tasha [GCF_000002285.5] chromosomes plus unplaced and unlocalized scaffolds

Other reports: [Search Summary](#)

— Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GATGCTGCGCGAGTACCAGGAG	22	65.46	63.64	4.00	0.00
Reverse primer	CATCATCACCCAAGGATGCCCTTT	24	63.25	50.00	4.00	2.00

Products on target templates
 >NC_006609.4 Canis lupus familiaris isolate Tasha breed boxer chromosome 27, alternate assembly Dog10K_Boxer_Tasha

product length = 206
 Features associated with this product:
 keratin, type ii cytoskeletal 71

Forward primer 1 GATGCTGCGCGAGTACCAGGAG 22
 Template 43710823 43710802

Reverse primer 1 CATCATCACCCAAGGATGCCCTTT 24
 Template 43710618 43710641

Obrázek 12: Sekvence primerů KRT71-DELINS-F a KRT71-DELINS-R

5.3.3 Výsledky návržení primerů pro amplifikaci mutace c.451C>T

Na obrázku 13 jsou uvedeny sekvence primerů KRT71-451-F a KRT71-451-R, včetně jejich charakteristik. Tento obrázek představuje výstup programu Primer-BLAST (Ye et al. 2012). Z obrázku 13 je patré, že bioinformatickou analýzou bylo zjištěno, že navržená dvojice primerů je specifická a v celogenomické sekvenci psa by měla nasedat pouze v jediném místě, keré je rovněž na obrázku vyznačeno.

Primer-BLAST » JOB ID:7-Ux10NrTsNp_Uv4RphvyjyDfvgRkGXIEA

Primer-BLAST Results ?

Input PCR template: none

Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Canis lupus familiaris Dog10K_Boxer_Tasha [GCF_000002285.5] chromosomes plus unplaced and unlocalized scaffolds

Other reports: [Search Summary](#)

— Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGGGCTCAACAGTTTCTGCACCTTT	24	64.04	50.00	5.00	1.00
Reverse primer	GCTCCAGTTGTTCTTGCAGTTGT	24	64.02	50.00	4.00	0.00

Products on target templates
 >NC_006609.4 Canis lupus familiaris isolate Tasha breed boxer chromosome 27, alternate assembly Dog10K_Boxer_Tasha

product length = 127
 Features associated with this product:
 keratin, type ii cytoskeletal 71

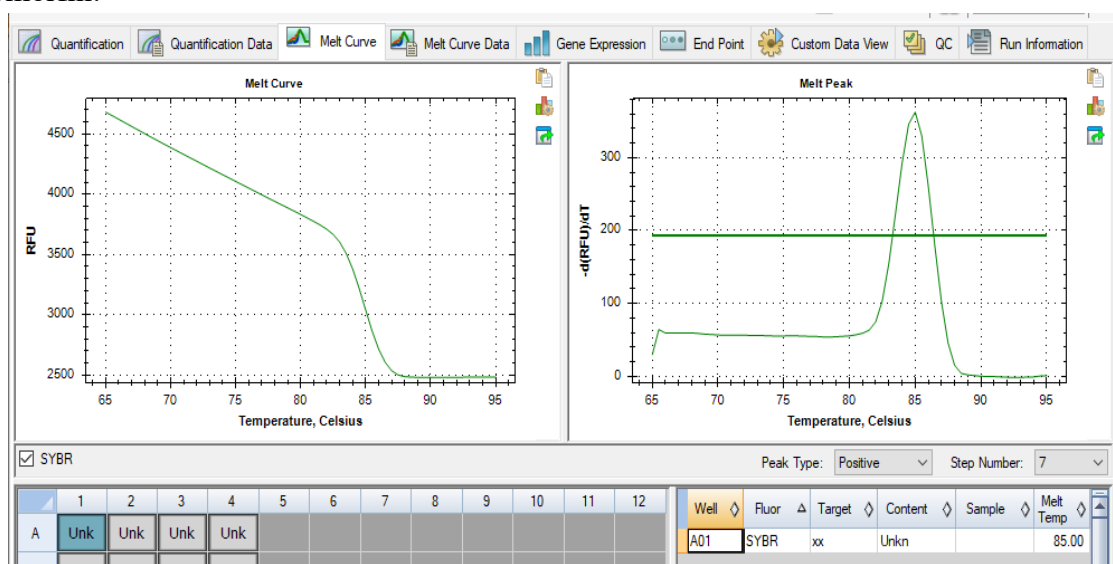
Forward primer 1 GGGGCTCAACAGTTTCTGCACCTTT 24
 Template 43714848 43714825

Reverse primer 1 GCTCCAGTTGTTCTTGCAGTTGT 24
 Template 43714722 43714745

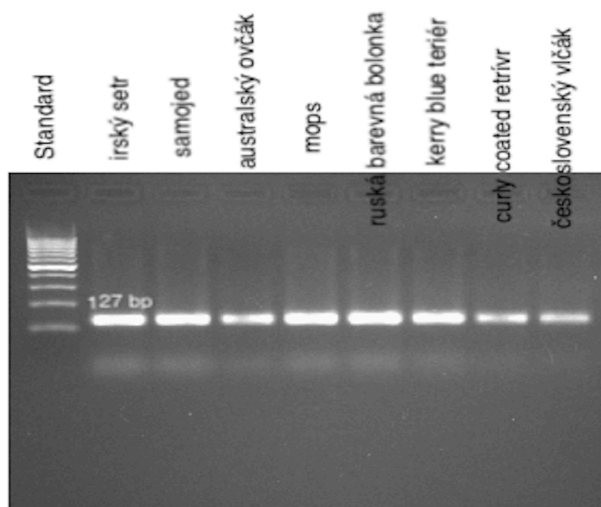
Obrázek 13: Sekvence primerů KRT71-451-F a KRT71-451-R

5.3.4 Hodnocení specifity amplifikace nově navrženého markeru kauzální mutace c.451C>T pomocí melting analýzy a pomocí elektroforetické separace

Amplifikace s použitím výše uvedeného primerového páru skutečně poskytovala jediný amplikon. Jeho velikost byla v souladu s bioinformatickou analýzou odhadnuta elektroforetickou separací na 127 bp. Z metodické části práce je patrné, že pro amplifikaci byla použita metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-PCR či qPCR), jejichž součástí je i melting (melting teplota, T_m) analýza. Výsledky melting analýzy, které byly zpracovány v programu CFX Maestro (BioRad) jsou znázorněny na obrázku 14. Z obrázku 14 je patrné, že melting křivka vytváří jeden osově-symetrický peak. Tímto způsobem charakterizovaný amplikon, je typický pro vysoce specifickou polymerázovou řetězovou reakci, kdy amplifikací vzniká pouze jeden produkt. Skutečná specifita amplifikace byla potvrzena rovněž elektroforetickou separací – obrázek 15. Na obrázku jsou znázorněny PCR produkty různých plemen. Elektroforeogram podává důkaz o tom, že amplikon je monomorfní.



Obrázek 14: Melting analýza amplifikace substituční mutace

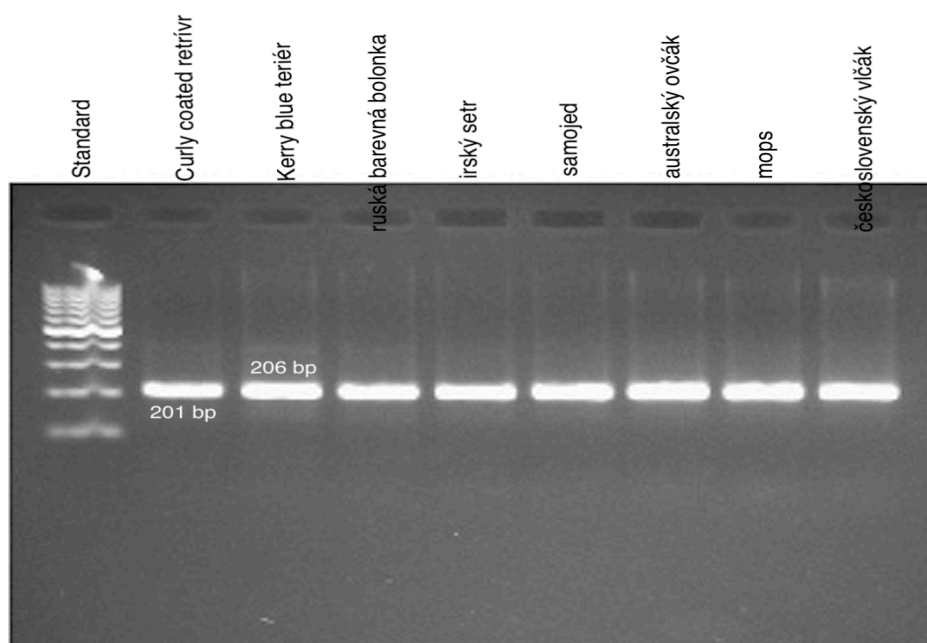


Obrázek 15: Elektroforeogram monomorfního amplikonu mutace c.451C>T
S- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo SCIENTIFIC)

5.4 Výsledky sekvenační analýzy nově navržených markerů dvou kauzálních mutací genu *KRT71*

5.4.1 Sekvence ampliconu nově navrženého markeru mutace c.1266_1273delinsACA

Pro sekvenační analýzu byla použita kolekce referenčních plemen s variabilní strukturou srsti, která jsou uvedena v kapitole 4.1.1. Současně byla provedena sekvence dvou zástupců plemene československý vlčák s kadeřavou srstí a dvou zástupců se standardním typem osrstění. Na obrázku 16 je znázorněný elektroforeogram těchto PCR produktů. Z obrázku 16 je patrné, že u všech hodnocených jedinců docházelo k amplifikaci PCR produktu. Mezi amplicony na obrázku 16 je rovněž amplicon plemene curly coated retrívr, u kterého je produkt velký 201 bp. U zbývajících plemen je produkt dlouhý 206 bp. Z obrázku je patrné, že agarózová gelová elektroforéza není schopna detekovat tuto deleční mutaci. Proto byla provedena sekvence ampliconu.

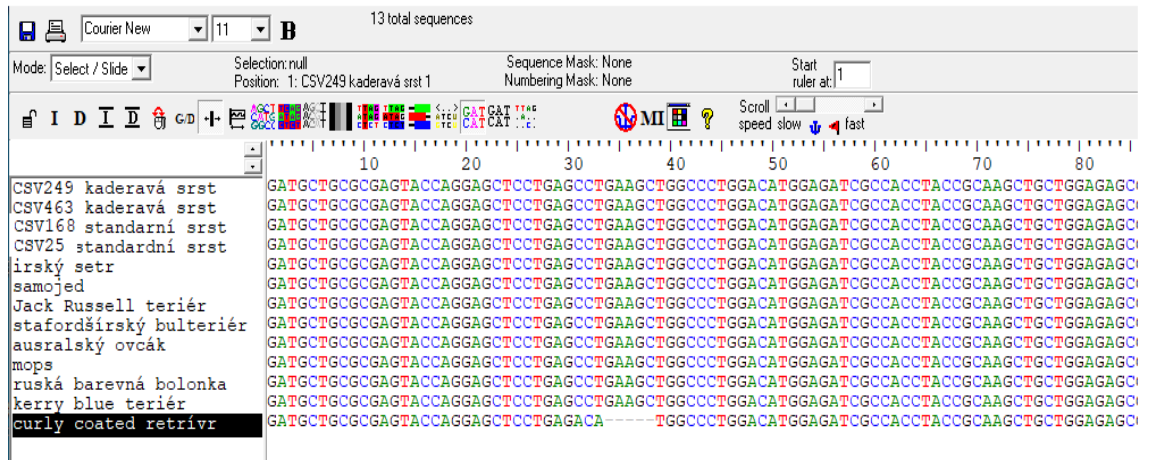


Obrázek 16: Elektroforeogram ampliconů mutace c.1266_1273delinsACA

S - GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo SCIENTIFIC)

Získaná sekvenační data byla zpracována v programu BioEdit (Hall 1999), ve kterém byly porovnány sekvence tohoto markeru u různých psích plemen. Výsledky srovnávací analýzy jsou uvedeny na následujícím obrázku 17. Pro větší přehlednost zde není znázorněna celá sekvence, ale pouze oblast, kde se nachází delečně inzerční polymorfismus. Jak je signifikantní na obrázku, mutace c.1266_1273delinsACA se nacházela pouze u zástupce plemene curly coated retrívr. Tento výsledek je v souladu s literárními prameny. Vzhledem k tomu, že v diplomové práci byli hodnoceni pouze dva zástupci plemene československý vlčák s kadeřavou srstí, u kterých byla sekvenací vyloučena přítomnost mutace c.1266_1273delinsACA, vyvodila jsem závěr, že s vysokou pravděpodobností mutace c.1266_1273delinsACA nebude příčinou mutací kadeřavosti u plemene československý vlčák.

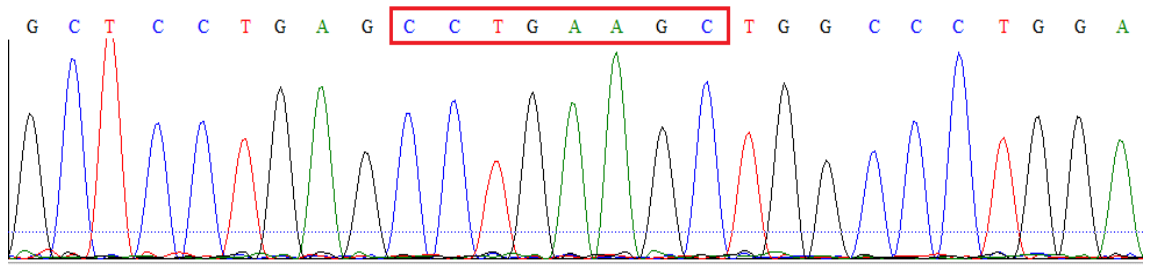
Proto jsem se dále v diplomové práci zaměřila na druhou mutaci, tedy mutaci substituční c.451C>T.



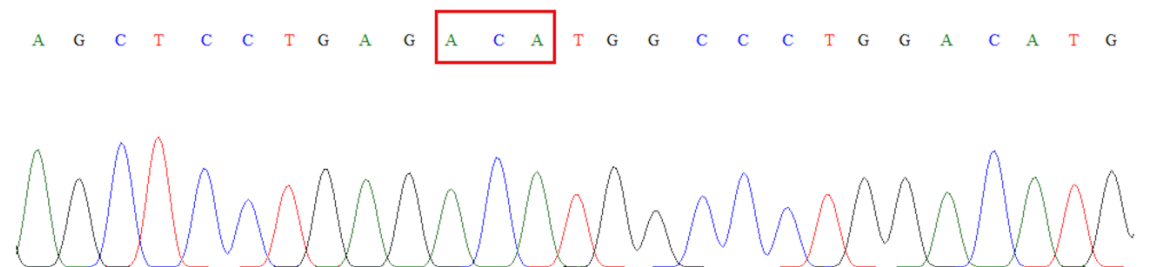
Obrázek 17: Porovnání sekvencí mutačního místa u různých psích plemen

Na obrázcích 18 a 19 jsou uvedena hrubá sekvenační data. Přičemž obrázek 18 znázorňuje obrázek československého vlčáka se standardní srstí (W/W). Červeným rámečkem je na tomto obrázku znázorněno 8 nukleotidů, které jsou v případě mutované alely (M) deletovány.

Na obrázku 19 jsou znázorněna hrubá sekvenační data u plemene curly coated retrievr. Toto plemeno bylo jediné hodnocené plemeno v kolekci referenčních plemen, u nějž je delece fixována. Na tomto obrázku je červeným obdélníčkem označené místo, kde došlo k deleci a následné inserci nukleotidů ACA.



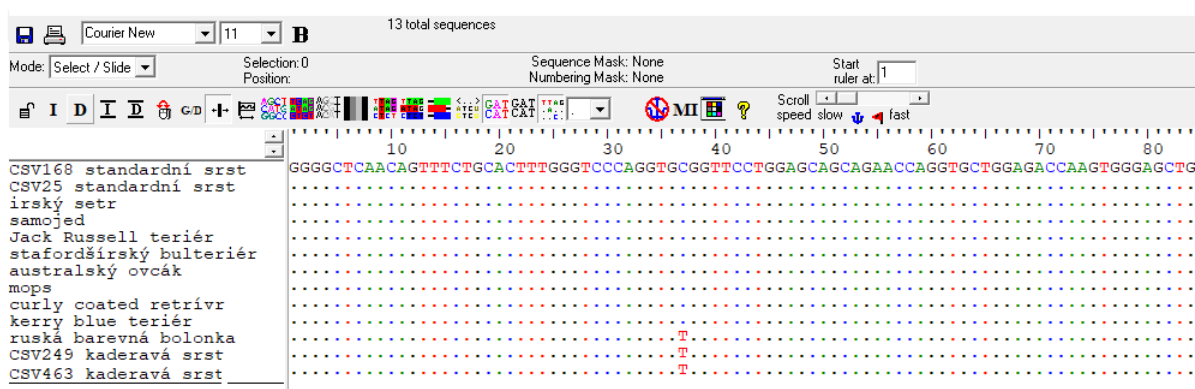
Obrázek 18: Sekvence alely u československého vlčáka se standardní strukturou srsti



Obrázek 19: Sekvence mutované alely c.1266_1273delinsACA u plemene curly coated retrievr

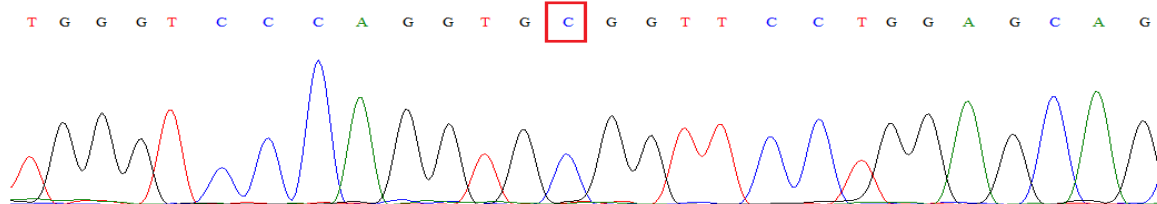
5.4.2 Sekvenace amplikonu nově navrženého markeru mutace c.451C>T

Pro sekvenační analýzu byla použita stejná plemena jako v případě mutace c.1266_1273delinsACA, viz. kapitola 5.4.1. Získané výsledky jsou prezentovány rovněž jako výstup programu BioEdit (Hall 1999). Z porovnání sekvencí na obrázku 20 je jasně patrné, že substituční mutace c.451C>T byla, kromě plemen s typickou kadeřavou srstí, nalezena i u obou kadeřavých zástupců plemene československý vlčák. Tento výsledek byl pro řešení práce velice důležitý, protože konkrétní typ mutace vedoucí ke kadeřavosti byl takto poprvé u tohoto plemene jednoznačně potvrzen. Tudíž jsem mohla vyslovit hypotézu, že v populaci československého vlčáka se budou rovněž nacházet heterozygoti, přenašeči této exteriérové vady. Proto jsem se v další části práce mohla zaměřit na vývoj a validaci metody PCR-RFLP, která bude použitelná pro rychlou a snadnou detekci mutace c.451C>T.



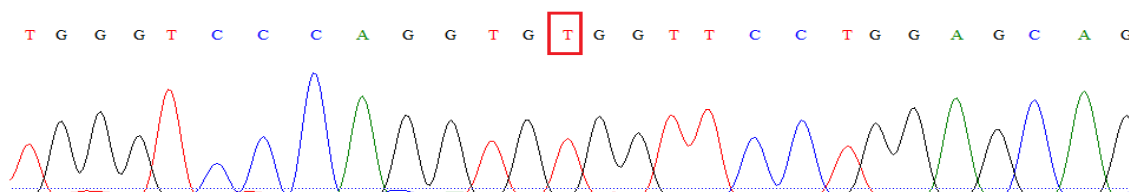
Obrázek 20: Porovnání sekvencí alely mutace c.451C>T u různých psích plemen

Na obrázku 21 jsou uvedena hrubá sekvenační data u československého vlčáka se standardní srstí (W/W). Červeným rámečkem je v této sekvenci označen nukleotid C, který je u mutované alely substituován nukleotidem T.



Obrázek 21: Sekvence nemutované alely u československého vlčáka se standardní srstí

Na obrázku 22 jsou uvedena hrubá sekvenační data u československého vlčáka s kadeřavou srstí (M/M). Substituovaný nukleotid T je označen červeným rámečkem.



Obrázek 22: Sekvence mutované alely u československého vlčáka s kadeřavou srstí

V této kapitole je uveden výstup z BioEdit (Hall 1999), ve kterém je zvýrazněna substituce C>T. Z obrázku 20 je patrné, že oba zástupci plemene československý vlčák s kadeřavou srstí byli homozygotní z hlediska substituční mutace.

5.5 Metoda PCR-RFLP a posouzení její vhodnosti pro detekci mutace c.451C>T genu *KRT71*

Cílem práce bylo mimo jiné navrhnout metodický postup detekce kauzální mutace c.451C>T, který by byl rychlejší oproti Sangerovu sekvenování. Vědecká hypotéza pro tento cíl práce předpokládá, že metoda PCR-RFLP je použitelná tehdy, jeli přítomností či absencí substituční mutace ovlivněn palindrom některého z restrikčních enzymů. Na obrázcích 23 a 24 je uvedena část restrikčních endonukleáz, které štěpí PCR amplicon vytvořený s pomocí primerů KRT71-451-F a KRT71-451-R u nemutované a mutované alely. Jedná se o výstup programu Webcutter (Heiman 1997).

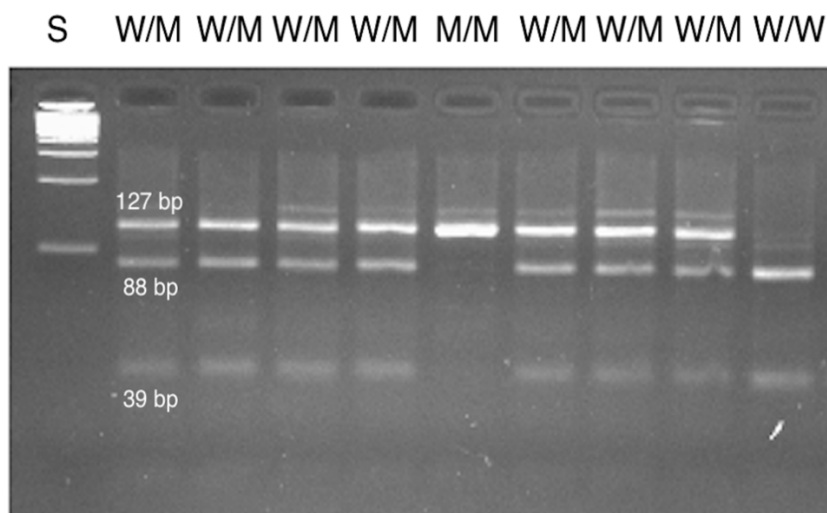
Webcutter wild amplicon			
Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
AccB7I	1	63	ccannnn/ntgg
AciI	1	39	ccgc
AclWI	1	100	ggatc
AluI	2	81 93	ag/ct
Alw26I	1	71	gtctc
AlwI	1	100	ggatc
AlwNI	3	15 63 93	cagnnn/ctg
AspS9I	1	26	g/gncc
AsuI	1	26	g/gncc
AvaII	1	26	g/gwcc
BanII	1	6	grgcy/c
BbvI	3	52 85 91	gcagc
Bme18I	1	26	g/gwcc
BmyI	1	6	gdgch/c
BpmI	3	48 69 126	ctggag
BsaI	1	72	ggtctc
BsaJI	1	29	c/cnngg
Bsc4I	2	34 62	ccnnnn/nnngg

Obrázek 23: Restrikční endonukleazy štěpící amplicon nemutované alely

Webcutter mutant amplicon			
Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
AccB7I	1	63	ccannnn/ntgg
AclWI	1	100	ggatc
AluI	2	81 93	ag/ct
Alw26I	1	71	gtctc
AlwI	1	100	ggatc
AlwNI	3	15 63 93	cagnnn/ctg
AspS9I	1	26	g/gncc
AsuI	1	26	g/gncc
AvaII	1	26	g/gwcc
BanII	1	6	grgcy/c
BbvI	3	52 85 91	gcagc
Bme18I	1	26	g/gwcc
BmyI	1	6	gdgch/c
BpmI	3	48 69 126	ctggag
BsaI	1	72	ggtctc
BsaJI	1	29	c/cnngg
Bsc4I	2	34 62	ccnnnn/nnngg
BseDI	1	29	c/cnngg
BsgI	1	21	gtgcag

Obrázek 24: Restrikční endonukleazy štěpící amplicon mutované alely

Z níže uvedeného elektroforeogramu je viditelné působení restričních endonukleáz na produkty amplifikace u vybraných zástupců plemene československý vlčák. U jedinců s genotypem W/W vznikaly dva fragmenty o velikostech 39 bp a 88 bp. Vzhledem k tomu, že u homozygotních jedinců s genotypem M/M se nenacházel palindrom rozpoznávaný příslušnou restriční endonukleázou, štěpení neprobíhalo a výsledkem je fragment o velikosti 127 bp. Restričním štěpením u heterozygotu vznikaly tři fragmenty o velikostech 39 bp, 88 bp a 127 bp.



Obrázek 25: Elektroforeogram restričního štěpení enzymem *AciI*, *S*- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo SCIENTIFIC)

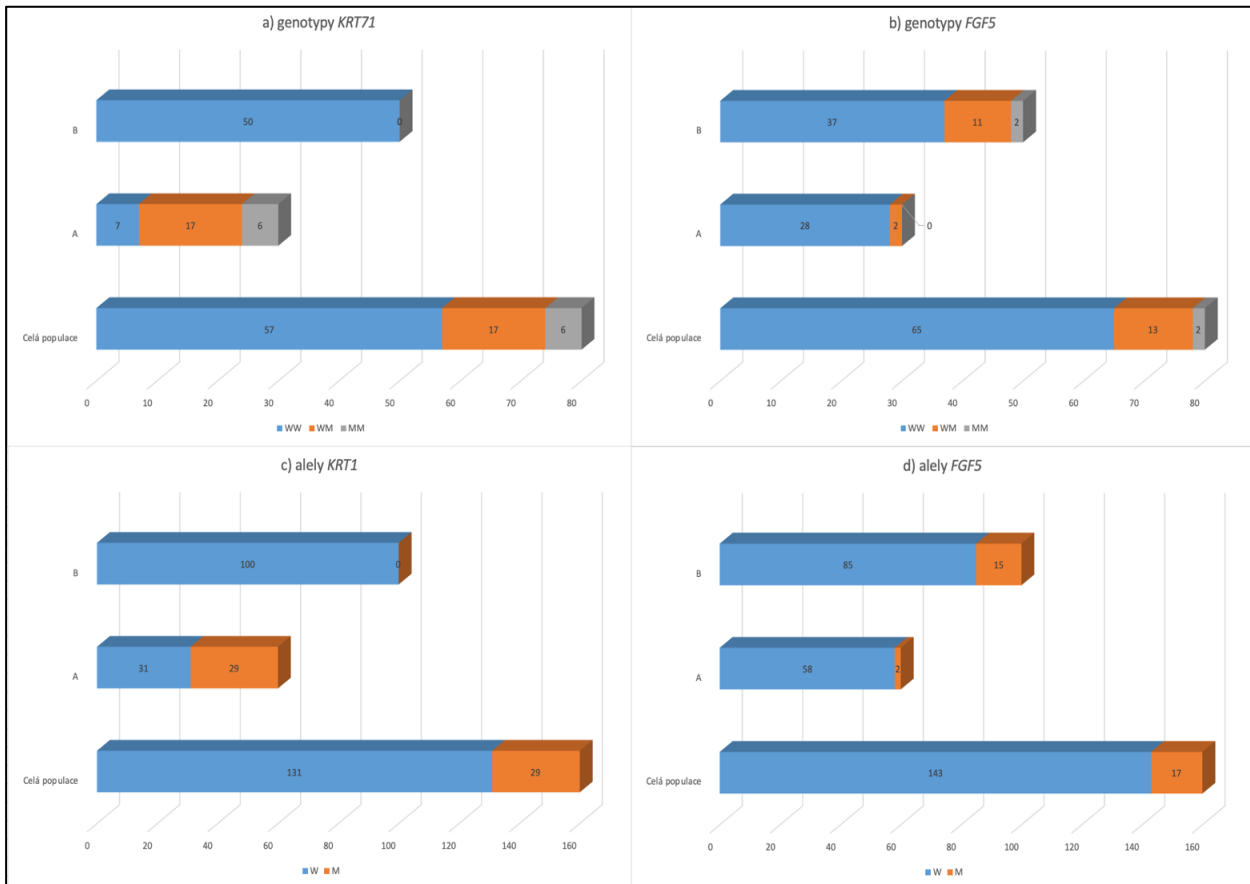
5.6 Genotypizace populace z hlediska výskytu mutace c.451C>T genu *KRT71*

Stejně, jako tomu bylo u genu *FGF5*, byla celá populace podrobena genotypizaci pomocí PCR-RFLP markeru, popsáno v předcházejících kapitolách. V populaci byly zjištěny všechny možné alelické kombinace tohoto markeru. 57 jedinců vykazovalo genotyp W/W, 17 jedinců genotyp W/M a 6 jedinců genotyp M/M. Detailní přehled všech detekovaných genotypů je uveden v příloze. Podrobné statistické vyhodnocení získaných dat je zpracováno v kapitole 5.7.

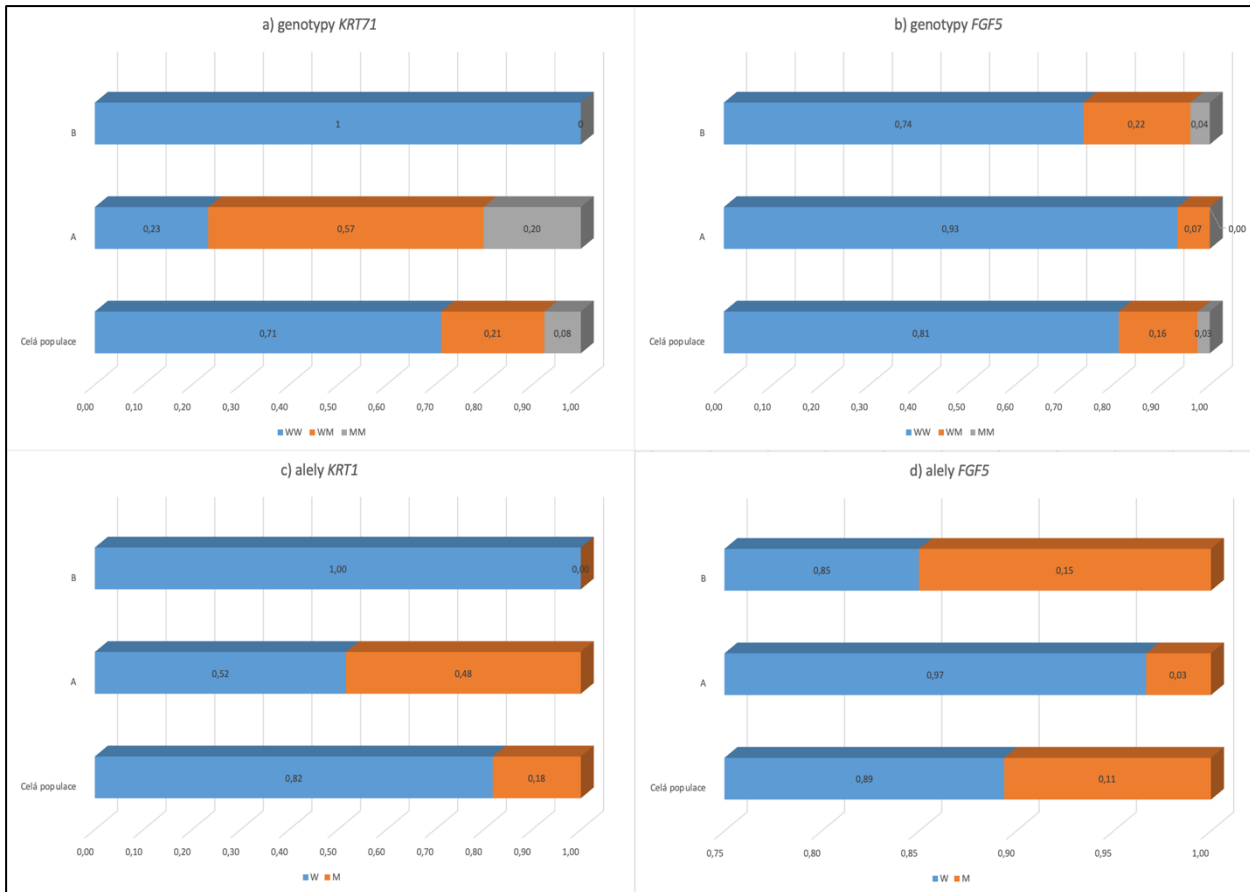
5.7 Vyhodnocení absolutních a relativních četností genotypů a alel z pohledu populační genetiky

Vzhledem k tomu, že předchozími analýzami jsme vyloučili kauzalitu mutace c.1266_1273delinsACA ve spojitosti s kadeřavou srstí u československého vlčáka bylo výsledné statistické zpracování dat zaměřeno pouze na vyhodnocování substitučních mutací genu *KRT71* a *FGF5*. Jedna z vědeckých hypotéz diplomové práce předpokládala, že vzhledem k nízké frekvenci mutovaných alel, bude velice málo pravděpodobné, že u jednoho jedince dojde ke kumulaci kauzálních mutací obou genů. Z dat prezentovaných v příloze je však patrné, že k této kumulaci skutečně došlo, a to u dvou jedinců. Jedinec CSV132 je v genu *KRT71* mutovaný homozygot (M/M) a v genu *FGF5* je heterozygot (W/M). Ke kumulaci došlo rovněž u jedince CSV97, který je v genu *KRT71* heterozygot (W/M) a rovněž v genu *FGF5* má heterozygotní genotyp (W/M).

Celková genotypizační data prezentovaná v příloze byla sumarizována formou grafů na obrázcích 26 až 27 a to jak na úrovni absolutních četností, tak na úrovni relativních četností detekovaných genotypů a alel.



Obrázek 26: Absolutní četnosti



Obrázek 27: Relativní četnosti

Počty jedinců s alelickými kombinacemi genů *KRT71* a *FGF5* byly vzájemně porovnány, jak mezi jednotlivými subpopulacemi, tak jednotlivými geny pomocí Pearsnova χ^2 testu. Charakteristika subpopulací A a B je uvedena v kapitole 4.1.2. Pro statistické výpočty byla použita simulace p hodnoty, výpočty mohly být zatíženy chybou zapříčiněnou nízkými počty jedinců nebo alel v jednotlivých kategoriích. Algoritmus výpočtu v programu R (R Core Team 2022) nepracuje přímo s distribucí χ^2 kvadrát funkce, ale se simulovanou distribucí. Výsledky tohoto statistického hodnocení jsou prezentovány v následujících tabulkách 1, 2 a 3.

Tabulka 1: Pearsonův χ^2 test pro alelické kombinace genu *KRT71* pro jednotlivé kategorie populací

Genotypy <i>KRT71</i> mezi populacemi		
A subpopulace	$\chi^2 = 20,589$	
	p hodnota = $5,4 \times 10^{-5}$	
B subpopulace	$\chi^2 = 17,465$	$\chi^2 = 53,801$
	p hodnota = $4,1 \times 10^{-5}$	p hodnota = 1×10^{-6}
Celková populace		A subpopulace

Byla stanovena nulová hypotéze, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi poměry genotypů u genu *KRT71* v jednotlivých subpopulacích.

Vypočtené hodnoty χ^2 testu pro poměry genotypů genu *KRT71* v jednotlivých populacích byly porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou χ^2 testu při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a při stupních volnosti $N = n - 1 = 2$, jež je rovna 5,99. Vypočtené hodnoty jsou vyšší než hodnota kritická a rovněž hladina významnosti α je vyšší nežli p hodnota. Existuje statisticky významný rozdíl mezi poměry genotypů genu *KRT71* mezi jednotlivými subpopulacemi.

Tabulka 2: Pearsonův χ^2 test pro alelické kombinace genu *FGF5* pro jednotlivé kategorie populací

Genotypy <i>FGF5</i> mezi populacemi		
A subpopulace	$\chi^2 = 2,5962$	
	p hodnota = 0,2373	
B subpopulace	$\chi^2 = 0,98217$	$\chi^2 = 4,7754$
	p hodnota = 0,591	p hodnota = 0,08447
Celková populace		A subpopulace

Byla stanovena nulová hypotéze, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi poměry genotypů genu *FGF5* v jednotlivých subpopulacích.

Vypočtené hodnoty χ^2 testu pro poměry genotypů genu *FGF5* v jednotlivých populacích byly porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou χ^2 testu při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a při stupních volnosti $N = n - 1 = 2$, jež je rovna 5,99. Vypočtené hodnoty χ^2 testu jsou nižší než hodnota kritická a rovněž hladina významnosti α je nižší nežli p hodnota, proto nelze vyloučit nulovou hypotézu. Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi poměry genotypů u genu *FGF5* mezi jednotlivými subpopulacemi.

Byla stanovena nulová hypotéze, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi poměry genotypů u genů *KRT71* a *FGF5* napříč subpopulacemi.

Tabulka 3: Pearsonův χ^2 test pro alelické kombinace genů *KRT71* a *FGF5* napříč subpopulacemi

Genotypy <i>KRT71</i> a <i>FGF5</i> mezi populacemi			
<i>FGF5</i> v celkové populaci	$\chi^2 = 3,0579$		
	p hodnota = 0,2171		
<i>FGF5</i> v A subpopulaci		$\chi^2 = 30,442$	
		p hodnota = 1×10^{-6}	
<i>FGF5</i> v B subpopulaci			$\chi^2 = 14,943$
			p hodnota = 11×10^{-5}
	<i>KRT71</i> v celkové populaci	<i>KRT71</i> v A subpopulaci	<i>KRT71</i> v B subpopulaci

Vypočtené hodnoty χ^2 testu pro poměry genotypů obou genů v jednotlivých populacích byly porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou χ^2 testu při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a při stupních volnosti $N = n - 1 = 2$, jež je rovna 5,99. V případě celkové populace jsou vypočtené hodnoty χ^2 testu nižší než hodnota kritická a rovněž hladina významnosti α je nižší nežli p hodnota, proto nelze vyloučit nulovou hypotézu. Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi poměry genotypů genů *KRT71* a *FGF5* v celkové populaci.

V případě subpopulací A a B jsou vypočtené hodnoty χ^2 testu vyšší než hodnota kritická a rovněž hladina významnosti α je vyšší nežli p hodnota, lze tedy zamítnout nulovou hypotézu. Existuje statisticky významný rozdíl mezi poměry genotypů genů *KRT71* a *FGF5* v obou subpopulacích.

Obdobná statistická analýza pomocí χ^2 testu byla použita i pro vyhodnocení vstupních dat na alelické úrovni. Jejich výsledky jsou rovněž uvedeny v tabulkách (4, 5 a 6).

Tabulka 4: Pearsonův χ^2 test segregace alel genu *KRT71* pro jednotlivé subpopulace

Alely genu <i>KRT71</i> mezi populacemi		
A subpopulace	$\chi^2 = 20,512$	
	p hodnota = $1,1 \times 10^{-5}$	
B subpopulace	$\chi^2 = 20,4$	$\chi^2 = 59,033$
	p hodnota = 4×10^{-6}	p hodnota = 1×10^{-6}
	Celková populace	A subpopulace

Byla stanovena nulová hypotéze, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi poměry mutovaných a nemutovaných alel genu *KRT71* mezi jednotlivými subpopulacemi.

Vypočtené hodnoty χ^2 testu pro poměry mutovaných a nemutovaných alel genu *KRT71* v jednotlivých populacích byly porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou χ^2 testu při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a při stupních volnosti $N = n - 1 = 2$, jež je rovna 5,99. Vypočtené hodnoty χ^2 testu jsou vyšší než hodnota kritická a rovněž hladina významnosti α je vyšší nežli p hodnota, lze tedy zamítnout nulovou hypotézu. Existuje statisticky významný rozdíl mezi poměry alel genu *KRT71* mezi jednotlivými subpopulacemi.

Tabulka 5: Pearsonův χ^2 test segregace alel genu *FGF5* pro jednotlivé subpopulace

Alely genu <i>FGF5</i> mezi populacemi		
A subpopulace	$\chi^2 = 2,9403$	
	p hodnota = 0,1081	
B subpopulace	$\chi^2 = 1,0914$	$\chi^2 = 5,375$
	p hodnota = 0,3338	p hodnota = 0,03095
	Celková populace	A subpopulace

Byla stanovena nulová hypotéze, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi poměry mutovaných a nemutovaných alel genu *FGF5* mezi jednotlivými subpopulacemi.

Vypočtené hodnoty χ^2 testu pro poměry mutovaných a nemutovaných alel genu *FGF5* v jednotlivých populacích byly porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou χ^2 testu při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a při stupních volnosti $N = n - 1 = 2$, jež je rovna 5,99. V případě porovnání subpopulace A a subpopulace B k celkové populaci byly vypočtené hodnoty χ^2 testu nižší než hodnota kritická a hladina významnosti α je nižší nežli p hodnota.

V případě srovnání subpopulace A a B výpočet χ^2 testu z algoritmu výpočtu, který pracuje se simulovanou distribucí a simulovanou p hodnotou. Proto na základě p hodnoty lze zamítnout nulovou hypotézu. Existuje tudíž statisticky významný rozdíl mezi poměry alel genu *FGF5* mezi jednotlivými subpopulacemi.

Tabulka 6: Pearsonův χ^2 test segregace alel genů *KRT71* a *FGF5* napříč populacemi

Alely genů <i>KRT71</i> a <i>FGF5</i> mezi populacemi			
<i>FGF5</i> v celkové populaci	$\chi^2 = 3,656$		
	p hodnota = 0,07873		
<i>FGF5</i> v A subpopulaci		$\chi^2 = 31,707$	
		p hodnota = 1×10^{-6}	
<i>FGF5</i> v B subpopulaci			$\chi^2 = 16,216$
			p hodnota = $2,7 \times 10^{-5}$
	<i>KRT71</i> v celkové populaci	<i>KRT71</i> v A subpopulaci	<i>KRT71</i> v B subpopulaci

Byla stanovena nulová hypotéze, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi poměry alel genů *KRT71* a *FGF5* napříč subpopulacemi. Vypočtené hodnoty χ^2 testu pro poměry alel obou genů v jednotlivých populacích byly porovnány s tabulkovou kritickou hodnotou χ^2 testu při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a při stupních volnosti $N = n - 1 = 2$, jež je rovna 5,99. V případě celkové populace jsou vypočtené hodnoty χ^2 testu nižší než hodnota kritická a rovněž hladina významnosti α je nižší nežli p hodnota, proto nelze vyloučit nulovou hypotézu. Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi poměry mutovaných a nemutovaných alel genů *KRT71* a *FGF5* v celkové populaci.

V případě subpopulací A a B jsou vypočtené hodnoty χ^2 testu vyšší než hodnota kritická a rovněž hladina významnosti α je vyšší nežli p hodnota, lze tedy zamítnout nulovou hypotézu.

Existuje statisticky významný rozdíl mezi poměry alel genů *KRT71* a *FGF5* v obou subpopulacích.

Parametry populační genetiky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Testování Hardy-Weinbergovy rovnováhy

	H _{obs}	H _{exp}	Test HW rovnováhy	Signifikantnost odchylky od HW
<i>KRT71</i>	0,2125	0,2987	$\chi^2 = 5.2729$ p hodnota = 0.0217	5 %
<i>FGF5</i>	0,1635	0,1911	$\chi^2 = 0.7018$ p hodnota = 0.4022	nesignifikantí

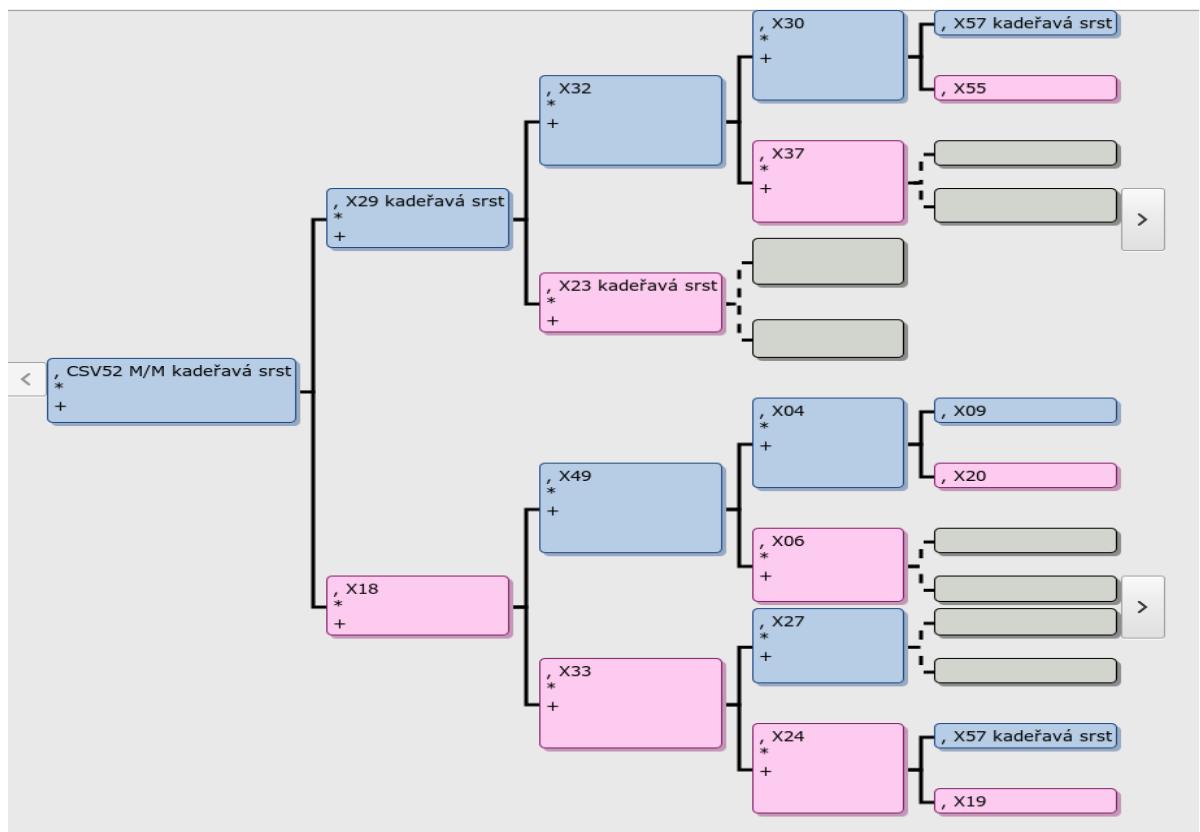
Byla stanovena nulová hypotéza, že neexistuje statisticky významný rozdíl v heterozygotnosti pozorované a heterozygotnosti očekávané. Vypočtená hodnota χ^2 testu pro gen *KRT71* byla porovnána s tabulkovou kritickou hodnotou χ^2 testu při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a při stupních volnosti $N = n - 1 = 1$, jež je rovna 3,84. Vypočtená hodnota je vyšší nežli hodnota kritická a rovněž hladina významnosti α je vyšší nežli p hodnota. Existuje statisticky významný rozdíl mezi heterozygotností pozorovanou a heterozygotností očekávanou v případě genu *KRT71* a neplatí tedy Hardy-Weinbergova rovnováha.

V případě genu *FGF5*, kdy vypočtená hodnota χ^2 testu nepřevýšila hodnotu kritickou, byla odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy hodnocena jako nesignifikantní.

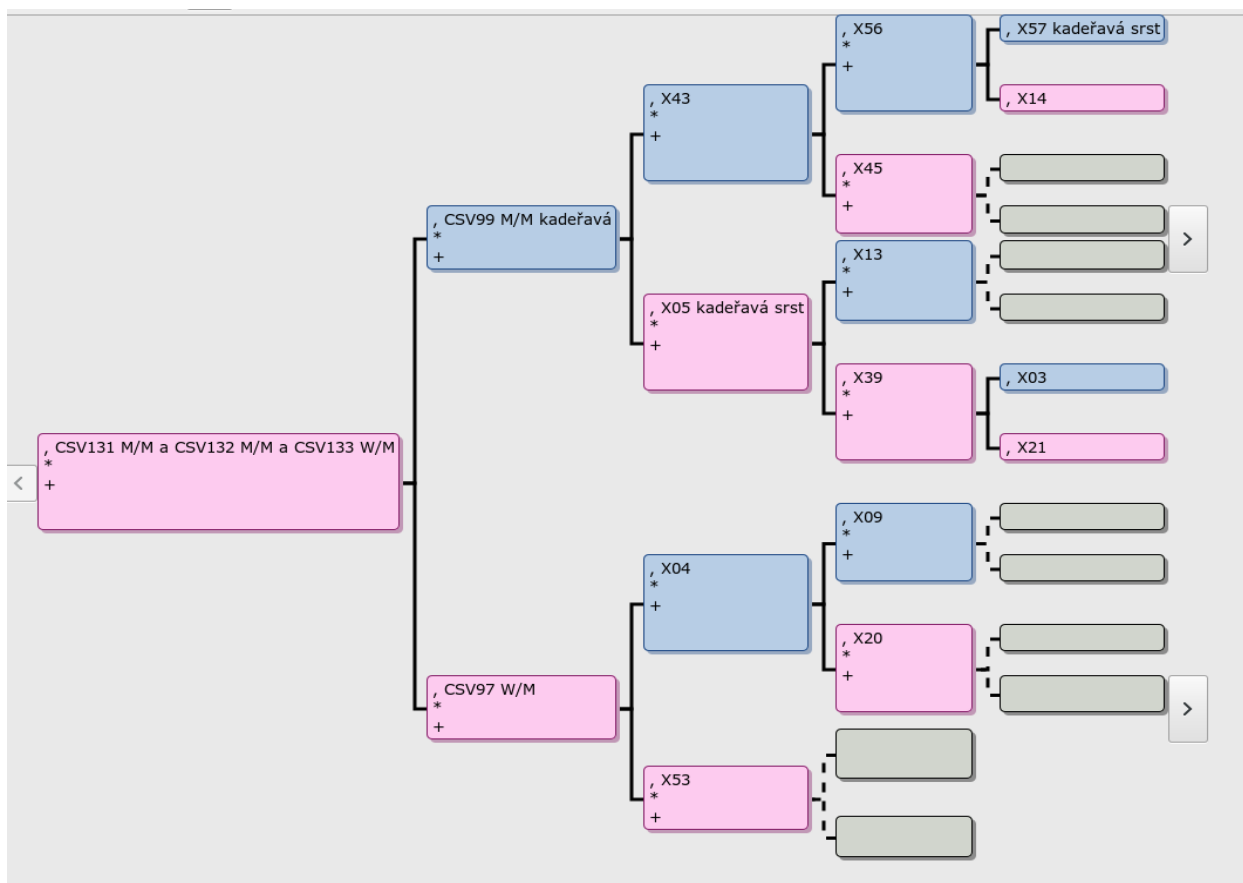
5.8 Vyhodnocení genealogické studie

Molekulární genetická analýza potvrdila, že kadeřavost je skutečně podmíněna u československého vlčáka geneticky. Jedná se o znak monogonně řízený substituční mutací c.451C>T genu *KRT71*. Sekvenační metoda a technika PCR-RFLP odhalila, že v populaci československých vlčáků se skutečně nacházejí všechny tři možné alelicí kombinace. Z grafů uvedených na obrázcích 8 a 9 je patrné, že kauzální mutace genu *KRT71* byla identifikována pouze v subpopulaci A, která byla záměrně vybrána a jedince v této subpopulaci spojovala přítomnost kadeřavé srsti nebo podezření, že nově odhalenou alelu genu *KRT71* budou tyto jedinci nést v heterozygotní podobě. Logická je potom výrazně vyšší frekvence mutované alely genu *KRT71* v subpopulaci A se srovnáním frekvence v subpopulaci B, respektive v subpopulaci B nebyla prokázána u žádného z testovaných jedinců.

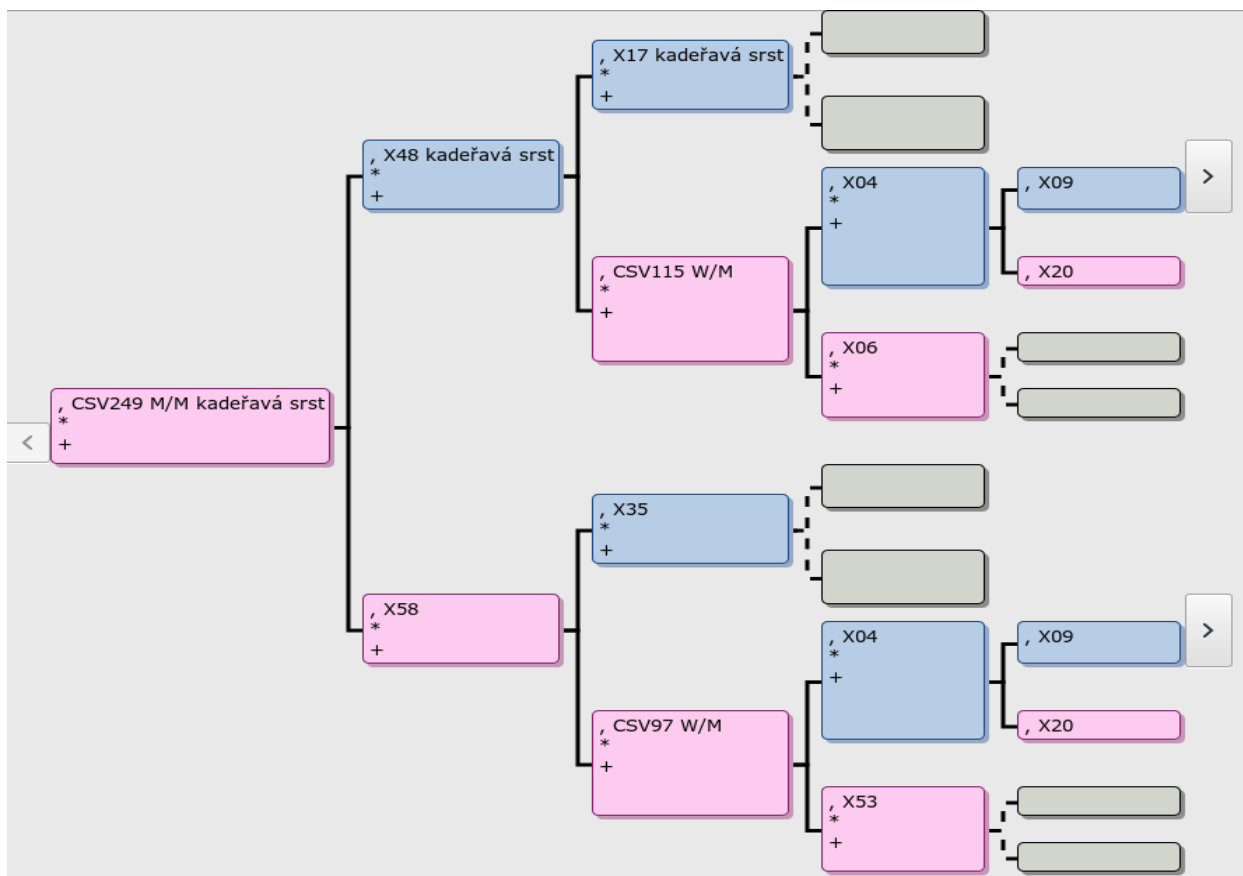
Vzhledem k těmto výsledkům jsem mohla zpracovat pomocí programu Gramps (Allingham 2001-2006) rodokmeny jedinců ze subpopulace A. Celkem bylo vytvořeno 30 rodokmenů. Pro větší přehlednost byla většina vytvořených rodokmenů zahrnuta do příloh 1 až 14 diplomové práce. V kapitole výsledky záměrně uvádím vybrané rodokmeny jedinců, kteří nesli obě mutované alely genu *KRT71*. Důvodem pro tento způsob prezentování výsledků je, že právě u těchto jedinců můžeme sledovat, jak byla mutace předána současně ze strany matky i ze strany otce. Vybrané rodokmeny jsou prezentovány na obrázcích 10, 11 a 12.



Obrázek 28: Rodokmen mutovaného jedince CSV52



Obrázek 29: Společný rodokmen jedinců CSV131, CSV132 a CSV133, současně obsažen vzhledem k příbuzenským vztahům i rodokmen jedince CSV99 a CSV97



Obrázek 30: Rodokmen mutantního jedince CSV249

6 Diskuze

6.1 Vhodnost zvolených subpopulací použitých pro identifikaci mutovaných alel genů *FGF5* a *KRT71*

Již Krausová (2018) odhalila kauzalitu substituční mutace c.284G>T genu *FGF5* pro fenotyp dlouhé srsti u plemene československý vlčák, která byla obecně charakterizována u dlouhosrstých plemen psů autory Housley a Venta (2006), Cadieu et al. (2009) a Dierks et al. (2013). Z těchto důvodů byli pro mou diplomovou práci použiti rovněž zástupci populace s fenotypovým projevem dlouhé srsti či jedinci, kteří ve svém rodokmenu měli dlouhosrsté jedince a dalo se tedy u nich předpokládat, že ponese mutovanou alelu genu *FGF5*. Z výsledků je patrné, že v testované populaci skutečně byli podchyceni jedinci nesoucí tuto mutaci i v heterozygotní sestavě. Současně byla prokázána funkčnost navrženého metodického postupu pomocí PCR-RFLP markeru, který navrhla Krausová (2018), jímž byla odhalena mutace i u hodnocených jedinců v této diplomové práci. Ráda bych podotkla, že populace, kterou použila Krausová (2018) se pouze částečně překrývala s jedinci hodnocenými v této diplomové práci.

V metodické části práce uvádím, že hlavním cílem práce bylo podchytit dědičnost potenciální kauzální mutace genu *KRT71* zodpovědné za kadeřavou srst, a proto výběr jedinců do subpopulace A nebyl náhodný, nýbrž tyto jedinci byli zařazeni do testované populace záměrně, a to na základě fenotypového projevu, popřípadě do ní byli zařazeni jedinci s rodokmenovými vazbami na jedince s kadeřavou srstí. Předpoklad záměrného výběru testovaných jedinců byl ověřen geneticky. Předpoklad se ukázal jako správný, neboť na základě konzultací s Ing. Danielou Čílovou byli vybráni jedinci, kteří nejenom mají fenotypový projev mutace genu *KRT71*, ale byla zachycena i celá řada přenašečů mutované alely, kteří jsou rodokmenově vázání na jedince s kadeřavou strukturou srsti. V případě, že by fenotypový projev kadeřavé srsti byl způsoben negenetickými faktory, pak by nebyla nalezena souvislost mezi kadeřavým fenotypem a rodokmenovou studií hodnocených zvířat.

6.2 Izolace genomické DNA vhodné pro genotypizaci

Pro izolaci DNA byl použit protokol NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel. Metoda byla zvolena z důvodů zaručení stability podmínek pro izolaci, která se odráží i v stabilních parametrech jako je výtěžnost izolované DNA a její čistota a kvalita vyjádřená na základě poměrů absorbancí A260/A280 a A230/280. Získané výsledky svědčí o vhodnosti metody pro extrakci DNA. Ve všech případech byla získána vysokomolekulární DNA, která bez jakýchkoliv problémů amplifikovala fragmenty u všech použitých molekulárních markerů. V současné době je izolace DNA pomocí kitu považována za standardní a extrakci DNA pomocí kitu používá celá řada autorů, kteří se věnují molekulárním genetickým analýzám u psů (Rincon et al. 2011; Štikarová et al. 2019). Obdobnou zkušenost přinesla i práce Krausové (2018), což bylo též klíčovým důvodem pro výběr tohoto metodického postupu izolace DNA pro mou diplomovou práci, neboť cílem mé práce bylo i porovnání výsledků, které přinesly obě tyto práce.

6.3 Navrhování nových primerů pro amplifikaci markerů kadeřavé srsti a bioinformatická analýza dat

Na začátku řešení diplomové práce jsem vyšla z nutného předpokladu, že v databázi NCBI jsou uvedené skutečné pravdivé celogenomické sekvence psů. Pro navržení primerů byla vybrána sekvence německého boxera s označením >NC_006609.4 (Lindblad-Toh et al. 2005). U vybrané sekvence bylo předpokládáno, že se jedná o sekvenci plemene psa s krátkou a rovnou srstí a nebudou se tudíž v celogenomické sekvenci nacházet mutované alely genů *KRT71* a *FGF5*. Pro navržení primerů byl použit software Primer-BLAST (Ye et al. 2012). Ve výsledkové části diplomové práce bylo potvrzeno, že navržené primery vykazují vysokou specifitu. Specifita primerů byla analýzou in silico, neboť byla založena na virtuálním porovnání primerů s celogenomickou sekvencí německého boxera s označením >NC_006609.4 (Lindblad-Toh et al. 2005). Virtuální výsledek byl prakticky ověřen amplifikací a následnou elektroforetickou separací byla potvrzena amplifikace jednoho fragmentu tak, jak bylo předpokládáno. Specifita byla ověřena i melting analýzou (viz. Obrázek 14) a především sekvenací amplikonu, která potvrdila, že získané sekvence u psů s rovnou srstí odpovídají celogenomické sekvenci s označením >NC_006609.4 (Lindblad-Toh et al. 2005)

6.4 Diskuze výsledků genotypizace u genu *FGF5*

Metodický postup detekce mutace c.284G>T genu *FGF5* na principu PCR-RFLP, který navrhla Krausová (2018), se ukázal jako vhodný pro detekci mutace. Tento marker dokázal rozlišit všechny tři alelické kombinace (W/W, W/M, M/M). U jedinců s dlouhou srstí byla jednoznačně prokázána homozygotní sestava mutované alely genu *FGF5*. Tím pádem byly potvrzeny závěry několika studií. Tudíž výsledky mé diplomové práce potvrdily závěry diplomové práce Krausové (2018), že u plemene československý vlčák existuje jediná kauzální mutace zodpovědná za délku srsti. Československý vlčák z pohledu dlouhosrstosti není odlišný od ostatních dlouhosrstých plemen, u kterých shodnou mutaci potvrdili Housley a Venta (2006), Cadieu et al. (2009) a Dierks et al. (2013).

6.5 Diskuze výsledků genotypizace u genu *KRT71* mutace c.1266_1273delinsACA

Na začátku řešení diplomové práce byl stanoven předpoklad, že kadeřavost u československého vlčáka by mohly teoreticky způsobit dvě dopsud popsané kauzální mutace genu *KRT71* (Cadieu et al. 2009; Salmela et al. 2019; Bauer et al. 2019). Jednou z těchto mutací je mutace c.1266_1273delinsACA, u níž autoři Salmela et al. (2019) a Bauer et al. (2019) předpokládají výskyt napříč plemeny sporadický a její fixaci u kadeřavého plemene curly coated retrívr. Z tohoto důvodu nebyla příliš předpokládána její kauzalita u plemene československý vlčák. Přesto nebylo možné přítomnost mutace vyvrátit, a proto bylo nutné provést experimentální ověření. Navržená dvojice primerů KRT71-DELINS-F a KRT71-DELINS-R byla aplikována na genotypizace modelové populace různých plemen mezi něž byli zařazeni dva jedinci československého vlčáka se standardní srstí a dva zástupci plemene československý vlčák se srstí kadeřavou. Dvojice primerů amplifikovala produkt dle očekávání a dle výsledků bioinformatické analýzy, ale pro jednoznačné potvrzení alelické varianty bylo

nutné provést Sangerovo sekvenování. Sekvence potvrdila výskyt mutace c.1266_1273delinsACA skutečně pouze u zástupce plemene curly coated retrivr. U jedinců plemene československý vlčák bez ohledu na to, zdali měli standardní či kadeřavou srst tato mutace nebyla prokázána. Jinými slovy, zástupci jedinců československého vlčáka mají z hlediska mutace c.1266_1273delinsACA genotyp W/W.

Mutace c.1266_1273delinsACA podle autorů Salmela et al. (2019) a Bauer et al. (2019) se u testovaného vzorku československých vlčáku nevyskytovala. Vzhledem k časové a zejména finanční náročnosti sekvenačních analýz jsem přistoupila k závěru, že se tato mutace nebude u československých vlčáků vyskytovat a proto jsem se zaměřila zejména na druhou kauzální mutaci c.451C>T genu *KRT71*.

6.6 Diskuze výsledků genotypizace u genu *KRT71* mutace c.451C>T

Autoři Cadieu et al. (2009), Salmela et al. (2019) a Bauer et al. (2019) předpokládají, že tato mutace je rozšířena u celé řady kadeřavých plemen a lze tedy předpokládat, že se jedná o mutaci evolučně starší, která zřejmě vznikla u společného předka většiny plemen s kadeřavou srstí. Tudíž jsem mohla teoreticky předpokládat vyšší pravděpodobnost jejího výskytu u kadeřavých jedinců plemene československý vlčák. Předpokládala jsem, že donorem této mutace musel být přenašeč plemene německý ovčák, a to z důvodů, že neexistují dostupné informace o v populaci volně žijících vlků s kadeřavou srstí. O německém ovčáku, jakožto donoru mutace může svědčit i existence několika ovčáckých plemen, kteří skutečně kadeřavou srst mají, jako například plemena puli, pumi, mudi, belgický ovčák Laekenois (FCI-Standard N° 15 2002) a jiné. Vzhledem k tomu, že německý ovčák i výše uvedená kadeřavá plemena vznikla procesem domestikace, lze tudíž předpokládat, že genetická příbuznost mezi německým ovčákem a kadeřavými ovčáckými plemeny je výrazně vyšší než příbuznost německého ovčáka a vlka. Proto jsem vyslovila pracovní hypotézu, že možným donorem mutované alely pro kadeřavou srst byl zřejmě některý z německých ovčáků použitých pro vyšlechtění československého vlčáka. Jelikož se jedná o recesivní mutaci, lze teoreticky předpokládat, že některý z německých ovčáků přítomný u zrodu plemene československý vlčák mohl být přenašečem a vnést do populace tuto recesivní mutaci. Defakto jde o stejný původ recesivní mutace, jako je odhadován u mutace genu *FGF5* (Camatta 2017).

Navržená dvojice primerů KRT71-451-F a KRT71-451-R byla aplikována na genotypizaci modelové populace různých plemen mezi něž byli zařazeni dva jedinci československého vlčáka se standardní srstí a dva zástupci plemene československý vlčák se srstí kadeřavou. Dvojice primerů amplifikovala produkt dle očekávání a dle výsledků bioinformatické analýzy, ale pro jednoznačné potvrzení alelické varianty bylo nutné provést Sangerovo sekvenování.

Za klíčové zjištění diplomové práce považuji odhalení genetické příčiny kadeřavé srsti u československých vlčáků, která je způsobena bodovou mutací (SNP) c.451C>T. Sekvenační analýzy jednoznačně potvrdily, že československý vlčák má geneticky determinovanou kadeřavou srst, stejně jako další kadeřavá plemena v této práci (ruská barevná bolonka) či kadeřavá plemena, jako barbet, bišon, puli, mudi, pudl, portugalský vodní pes a další ve studiích Cadieu et al. (2009), Salmela et al. (2019) a Bauer et al. (2019).

Z obrázků 1, 2 a 3 je patrné, jak se fenotypově projevuje efekt této mutace. Úroveň exprese (úroveň stupně kadeřavosti srsti) je zcela jistě plemenná záležitost (Candieu et al. 2009), což je patrné například na porovnání kadeřavosti u plemene pudl, u něž se rovněž tato mutace vyskytuje a který má jemně kadeřavou srst po celém těle, v porovnání s československým vlčákem, u kterých se kadeřavost vyskytuje pouze na některých částech těla, zejména okolo hlavy a na hřbetu (viz. Obrázky 1, 2 a 3).

Dalším originálním výsledkem diplomové práce je výsledek genotypizace jedince plemene kerry blue teriér, který má standardně drátovitou kadeřavou srst (FCI-Standard N° 3 2005). Byl očekáván výskyt mutace c.451C>T, ale sekvenční analýza jednoznačně potvrdila, že toto plemeno nenese ani jednu z doposud popsanych mutací. Lze tedy předpokládat fixaci jiné kauzální mutace buď genu *KRT71* nebo jiných genů ovlivňujících strukturu srsti u tohoto plemene. V testované populaci Salmela et al. (2019) byl jedinec kadeřavého plemene lagotto romagnolo, jenž nenesl žádnou z dvou zmíněných mutací, přesto, že byl potvrzen jako kadeřavý.

6.7 Diskuze mutace genu *KRT71* c.1266_1273delinsACA a folikulární dysplazie

Před vlastní sekvenací ampliconů byl navržen metodický postup pro obě analyzované mutace genu *KRT71*. Mutace c.1266_1273delinsACA, která se později neprokázala jako kauzální mutace kadeřavosti u československých vlčáků, byla potvrzena jako fixní pro plemeno curly coated retrívr. Při bioinformatické analýze deleční mutace byl navržen metodický postup a byl identifikován restriční enzym *Eco57I*, který rozpoznává palindrom o sekvenci CTGAAG. Toto restriční místo v případě mutace c.1266_1273delinsACA zaniká. Lze tedy předpokládat detekci mutované alely metodou PCR-RFLP. U mutovaného jedince s genotypem M/M by byl na elektroforeogramu viditelný jeden fragment o velikosti 201 bp, u jedince s genotypem W/W by výsledkem štepni byly dva fragmenty o velikostech 37 bp a 169 bp a v případě heterozygota by vznikaly tři fragmenty o velikostech 201 bp, 169 bp a 37 bp.

Plemeno curly coated retrívr bývá častěji afektováno folikulární dysplazií, s podobnými projevy jako u chesapeake bay retrívrů (Bond et al. 2016). Jedinci plemene chesapeake bay retrívr byli ve studiích Salmela et al. (2019) a Bauer et al. (2019) genotypizováni a byla u nich zjištěna segregace alel obou mutací. Jeden zástupce tohoto plemene v testované populaci Bauer et al. (2019), jenž měl obě alely mutované varianty c.1266_1273delinsACA, trpěl folikulární dysplazií diagnostikovanou veterinárním lékařem. Byli zde další dva jedinci jiných plemen, též mutantní homozygoti varianty c.1266_1273delinsACA postižení folikulární dysplazií. Je možné, že je tato mutace asociována s genetickou predispozicí k folikulární dysplazii. Navržený metodický postup by byl vhodný pro identifikaci mutace c.1266_1273delinsACA například při vědeckém výzkumu signifikantnosti této mutace právě s výskytem folikulární dysplazie u psů.

Pro plemeno československý vlčák není alopecie typická, respektive není známý výskyt folikulární dysplazie. Což defakto koreluje a potvrzuje výsledky získané v diplomové práci a to, že u československých vlčáků se nenachází mutace c.1266_1273delinsACA.

6.8 Diskuze genealogické studie

Vzhledem k tomu, že je diplomová práce originální v potvrzení kauzality mutace c.451C>T genu *KRT71* způsobující kadeřavou srst, nebylo možné získané výsledky diskutovat s jinými autory. Neexistuje žádný dostupný literární zdroj, který by hodnotil dědičnost kadeřavé srsti u československých vlčáků. Nicméně cílem diplomové práce bylo se pokusit odhadnout původ mutované alely c.451C>T genu *KRT71* u hodnocených zvířat. I to bylo důvodem záměrně vybírané subpopulace, u které bude teoreticky možné pozorovat rodokmenové vztahy mezi hodnocenými zvířaty. Tím jsou myšleni jedinci, kteří mají fenotypový projev mutované alely, respektive byli kadeřaví s příslušným genotypem. Další skupinou byli jedinci, kteří nemohli být genotypizováni, neboť se jedná o již nežijící jedince, ale přesto na základě konzultací s Ing. Danielou Čílovou byly získány informace o tom, že se u nich vyskytoval fenotypový projev.

Další kategorií zvířat byli jedinci, o kterých je známo, že byli rodiči jedinců s kadeřavou srstí. Když nyní bezpečně víme, že kadeřavá srst je podmíněna geneticky, respektive je podmíněna bodovou mutací c.451C>T genu *KRT71* s recesivní dědičností je jasné, že se muselo jednat o přenašeče mutace. Na základě těchto informací byla vypracována genealogická studie. Při genealogické studii jsem se inspirovala výsledky práce Camatta (2017), který se pokusil predikovat původ mutované alely genu *FGF5* zodpovědné za dlouhou srst a identifikoval jako teoretického donora mutace německého ovčáka. Mohla jsem se opřít o výsledky studie Camatta (2017), neboť dlouhá srst je obdobně jako kadeřavost řízena jedním genem a jedná se o recesivní mutaci. Camatta (2017) rovněž vyslovil hypotézu, že dlouhosrstost se nevyskytuje v populacích volně žijících vlků, naopak existuje jako jedna z variant německého ovčáka. Předpokládal tedy hypoteticky vzdáleného předka německého ovčáka, jakožto donora mutace. Což mohou teoreticky potvrzovat výsledky studie Cadieu et al. (2009), kde nebyla nalezena žádná z popsání mutací genů *KRT71* a *FGF5* v populaci testovaných vlků.

Dlouhosrstost je znak, který je mnohem lépe fenotypově podchytitelný oproti kadeřavosti. Jinými slovy, chovatelé československých vlčáků spíše identifikovali, že se jedná o jedince s dlouhou srstí (viz. Obrázek 4, 5 a 6). Naopak kadeřavá srst není tak markantním znakem a jedinci s kadeřavou srstí se tak významně neodlišují od standardních jedinců. Fenotypový projev kadeřavosti může být u nich dán konkrétní kondicí, stádiem línání, věkem a částečně i cílenou úpravou srsti, například na bonitaci či výstavu. Z toho důvodu, v řadě případů, jedinci s kadeřavou srstí mohli úspěšně projít bonitací a být připuštěni k chovu, což může vysvětlovat vnesení nežádoucí mutace do populace československých vlčáků. Domnívám se, že takoví jedinci nebyli identifikováni jako geneticky defektní, ale jejich stav srsti byl vysvětlován negenetickými faktory.

Vzhledem k tomu, že kadeřavá srst nemusela být vždy identifikována, tak v historických záznamech o odchovech není jisté správné určení fenotypu. Toto zásadně komplikovalo genealogickou analýzu ve srovnání se studií dlouhé srsti od Camatta (2017). Nebylo možné získat informace až k vzniku plemene v 50. – 60. letech, mohli jsme se držet informací o relativně mladších jedincích ve srovnání s informacemi o jedincích, které měl k dispozici Camatta (2017). Vzhledem k tomu, že kadeřavá srst podléhá Mendelistické dědičnosti, vycházela jsem z předpokladu, že zvířata, mající kadeřavou srst, musela získat mutovanou alelu od obou rodičů, aby byla homozygotní v mutované alele (M/M). Z těchto důvodů byli

k prezentaci ve výsledcích uvedeny rodokmeny jedinců (viz. Obrázek 28, 29 a 30), u kterých lze pozorovat přenos mutované alely z obou stran. Byli vyhledáváni potenciální přenašeči mutované alely. Z rodokmenu na obrázku 28, byl vytipován jedinec označen jako X57 s kadeřavou srstí, který se v rodokmenu nachází na straně matky i otce. V rodokmenu na obrázku 29 lze opět pozorovat jedince X57, ovšem musel se zde nacházet námi neidentifikovaný další jedinec, jakožto přenašeč mutované alely z matčiny strany. Nelze vyslovit jednoznačné závěry tak, jako v případě Camatta (2017), který se dopracoval až k potenciálnímu donoru mutace a s velikou pravděpodobností to ani nebude možné, neboť chybí informace o fenotypu jedinců v historii chovu. Mnohá zvířata nemusela projít bonitací, a to i v případě jedinců použitých v chovu, vzhledem k jiným podmínkám uchovnění v zahraničí.

Z výsledků genotypizace vyplývá, že byli identifikováni dva jedinci, kteří jsou nositeli mutace pro dlouhou i krátkou srst. Jedinec CSV132 je v genu *KRT71* mutovaný homozygot (M/M) a v genu *FGF5* je heterozygot (W/M). Ke kumulaci došlo rovněž u jedince CSV97, který je v genu *KRT71* heterozygot (W/M) a rovněž v genu *FGF5* má heterozygotní genotyp (W/M). Oba jedinci byli nosiči mutace genu *FGF5*, jejich srst měla tedy standardní délku. Nemůžeme proto identifikovat jedince a popsat fenotyp v případě homozygotnosti v obou genech. Typickým zástupcem ovčáckých plemen s dlouhou a kadeřavou srstí je například staroanglický ovčák (FCI-Standard N° 16 2011). Nelze však přesto k němu připodobňovat československého vlčáka nositele obou mutací, neboť už autoři Cadieu et al. (2009), Salmela et al. (2019) a Bauer et al. (2019) uvádí odlišnost intenzity kadeřavosti, a tedy fenotypového projevu mutované alely genu *KRT71* u různých plemen psů.

Vyslovená hypotéza o velmi vzácné existenci nositelů obou mutací byla potvrzena. Pro řadu chovatelů se může jednat o informaci, která na prvním pohled působí velice závažně. Nicméně geny *KRT71* a *FGF5* se nacházejí na různých chromozomech (Housley & Venta 2006) (Cadieu et al. 2009). Proto nelze tvrdit, že mezi těmito geny existuje genová vazba, naopak mezi geny existuje volná kombinovatelnost vloh. Čili neexistuje ona potenciální hrozba, že by výskyt obou kauzálních mutací u jednoho jedince zvyšovala pravděpodobnost současného předávání obou mutovaných alel.

Dále jsem se zamyslela nad tím, co je příčinou vyššího výskytu mutací obou genů v současné populaci československého vlčáka. Domnívám se, že příčinou může být defakto počet generací, které u tohoto plemene byly odchovány (Hartl & Jedlička 1996). Již v předcházející části diskuze je vyslovena hypotéza, že recesivní mutace zodpovědná za kadeřavou srst (Salmela et al. 2019; Bauer et al. 2019), stejně jako recesivní mutace zodpovědná za dlouhou srst (Housley & Venta 2006; Cadieu et al. 2009; Dierks et al. 2013), pochází z německých ovčáků, kteří teoreticky mohli být přenašeči těchto mutací (Camatta 2017). Počet odchovaných generací u tohoto plemene od jeho vzniku je dle mého názoru příčinou, že v současné době se teoretičtí přenašeči obou mutací v heterozygotní sestavě mohou vyskytovat na obou stranách rodokmenu.

Bylo zjištěno, že jedinec s mutovanou alelou genu *FGF5* v heterozygotní sestavě (W/M) má bohatší osrstění (Krausová 2018). Toto bylo podchyceno u genu *FGF5*, otázkou zůstává, jak ovlivní heterozygotní alelická kombinace genu *KRT71* strukturu srsti. Podobné analýzy u genu *KRT71* doposud nebyly provedeny. Dalo by se teoreticky předpokládat, že heterozygotní jedinci budou mít mírně zvlěnou podsadu případně i pesíky, jelikož i na základě konzultací s Ing. Danielou Čílovou byli detekováni jedinci s odchylkami od standardní srsti, kteří byli

genotypizací identifikováni jako heterozygoti mutace c.451C>T. Jedinci s bohatou srstí bývají kladně hodnoceni na výstavách, což vede k chovatelské preferenci heterozygotů, bez genetického záměru.

6.9 Diskuze výsledků statistických analýz

Již v metodice diplomové práce jsem se pokusila reálně charakterizovat testovanou populaci, respektive subpopulace A a B. Jelikož cílem diplomové práce bylo odhalit dědičnost a nalézt kauzální mutaci kadeřavé srsti u československého vlčáka, nepoužila jsem záměrně náhodný výběr hodnocených zvířat. Tudíž jsem teoreticky nemohla očekávat, že by výsledky výskytu mutovaných a nemutovaných alel byly v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. Jinými slovy, volba výchozí populace nebyla zárukou existence Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Domnívám se, že pokud byla prokázána platnost Hardy-Weinbergovy rovnováhy, tak se spíše jedná o efekt náhodnosti výběru jedinců, avšak nikoli to neodpovídá základním pravidlům populační genetiky.

Diskutovat výsledky populační genetiky s literárními zdroji je téměř nemožné. Československý vlčák patří mezi plemena specifická svým původem, jedná se o záměrně vytvořeného vlčího hybridu, jehož chov podléhá umělé selekci prováděné člověkem. Problematika vlčích hybridů z hlediska populační genetiky je aktuálním tématem. Studování jsou zejména hybridy vznikající spontánní cestou, a to v oblastech kde dochází ke kontaktu ferálních populací psů a volně žijících vlků. Spontánně vznikající vlčí hybridy jsou z hlediska populační genetiky studování pomocí různých genetických populačních markerů jako je mikrosatelitní DNA nebo různé typy DNA čipů. Takto získané výsledky je možné relevantně zpracovat z hlediska populační genetiky (Dziech et al. 2021; Harmoinen et al. 2021).

Rovněž Krausová (2018) měla vyšší předpoklad pro relevantní vyhodnocení populačních analýz, které provedla z pohledu genu *FGF5*. Příčinou byl větší rozsah hodnocené populace a zejména náhodnost výběru hodnocených zvířat. Vzhledem k tomu, že cílem mé práce bylo nalézt kauzální mutaci a najít její vztah s fenotypovým projevem byla testovaná zvířata vybírána zcela jistě nenáhodně. Výsledky statistických analýz potvrzují že nenáhodnost výběru mohla s velkou pravděpodobností způsobit u genu *KRT71* jak na genotypové, tak i alelické úrovni odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

7 Závěr

- Byla potvrzena hypotéza, že nestandardní kadeřavá srst u československých vlčáků je způsobena mutací genu *KRT71*. U kadeřavých jedinců v testované populaci byla sekvenací zjištěna substituční mutace c.451C>T.
- Mutace c.1266_1273delins ACA se u československého vlčáka nevyskytovala, ale byla identifikována u curly coated retrievera, čímž byla potvrzena její fixace u tohoto plemene.
- Stanovením genotypů v genech *KRT71* a *FGF5* u modelové populace 80 jedinců byla zjištěna, ač ojediněle, přítomnost mutovaných alel obou genů současně. Jedinec CSV132 je v genu *KRT71* mutovaný homozygot (M/M) a v genu *FGF5* je heterozygot (W/M). Ke kumulaci došlo rovněž u jedince CSV97, který je v genu *KRT71* heterozygot (W/M) a rovněž v genu *FGF5* má heterozygotní genotyp (W/M). Vzácně tedy dochází ke kumulaci sledovaných mutací genu *KRT71* a *FGF5*. Vzhledem k tomu že jsou geny lokalizovány na jiných chromozomech neexistuje riziko vyšší pravděpodobnosti současného předávání obou mutovaných alel v jedné gametě těchto zvířat.
- Metoda PCR-RFLP je vhodnou metodou pro identifikaci všech alelických kombinací kauzální mutace genu *KRT71* c.451C>T, neboť substituce 451 nukleotidu cytosin za thymin způsobuje ztrátu restrikčního místa. Je tedy rozdíl ve velikostech vzniklých fragmentů mezi alelou mutovanou a alelou nemutovanou. Lze tak na základě vzniklých fragmentů odečíst z elektroforeogramu genotyp probanda.
- Vyhodnocení získaných dat z pohledu populační genetiky ukázalo na statisticky významnou odchylku mezi heterozygotností pozorovanou a očekávanou v případě genu *KRT71*. To, že se signifikantnost odchylky u testované populace projevila pouze v genu *KRT71* je zapříčiněno záměrným výběrem testované populace ve vztahu právě k příslušnému fenotypovému projevu.
- Praktickým závěrem diplomové práce je z chovatelského hlediska jednoznačné prokázání genetické podstaty kadeřavosti srsti u československého vlčáka a současně navržení a validování metodického postupu, jak tuto mutovanou alelu detekovat, a to zejména u potenciálních přenašečů mutované alely.
- Z tohoto pohledu má chovatelská veřejnost informace o charakteru kauzální mutace a může využít služeb celé řady genomických laboratoří, které jsou dle mého názoru schopné provádět genetické testy na detekci mutace.

8 Literatura

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2015. Essential cell biology. Garland Science.
- Allingham DN, 2001-2006. Genealogical Research and Analysis Management Programming System. Available from <https://gramps-project.org/blog/>
- Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. 2002. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Developmental cell*, **2**(5), 643-653.
- Bauer A, et al. 2019. A second KRT 71 allele in curly coated dogs. *Animal genetics*, **50.1**: 97-100.
- Bichsel KJ, Hammiller B, Trempus CS, Li Y, Hansen LA. 2016. The epidermal growth factor receptor decreases S tathmin 1 and triggers catagen entry in the mouse. *Experimental Dermatology*, **25**(4), 275-281.
- Bond R, Varjonen K, Hendricks A, Chang YM, Brooks Brownlie H. 2016. Clinical and pathological features of hair coat abnormalities in curly coated retrievers from UK and Sweden. *Journal of Small Animal Practice* **57**: 659–67.
- Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P. 1995. The epidermal growth factor. *Cell biology international*, **19**(5), 413–430. <https://doi.org/10.1006/cbir.1995.1086>
- Botchkarev VA, Kishimoto J. 2003. Molecular control of epithelial–mesenchymal interactions during hair follicle cycling. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, **8**(1):46-55. Elsevier.
- Botchkarev VA, Sharov AA. 2004. BMP signaling in the control of skin development and hair follicle growth. *Differentiation* **72**: 512–526.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, **32**(3): 314.
- Burns M, Fraser MN. 1966. Genetics of the dog. The basis of successful breeding. *Genetics of the dog. The basis of successful breeding*.
- Cadiou E, et al. 2009. Coat Variation in the Domestic Dog Is Governed by Variants in Three Genes. *Science* **326**: 150-153.
- Camatta A. 2017. The Czekoslovakian Wolfdog with Long Hair. Italy.
- Carlton MB, Colledge H, Evans MJ. 1998. Crouzon-like craniofacial dysmorphology in the mouse is caused by an insertional mutation at the Fgf3/Fgf4 locus. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **212**(2): 242-249.
- Clark DP, Pazdernik N. 2011. *Biotechnology: Academic Cell Update Edition*. Academic Press.

- Comerota AJ, et al. 2002. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *Journal of vascular surgery*, **35**(5), 930-936.
- Coulombe PA, Omary MB. 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current opinion in cell biology*, **14**(1), 110-122.
- Coutu DL, Galipeau J. 2011. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY)*, **3**:10: 920.
- Cuevas P, Carceller F, Ortega S, Zazo M, Nieto I, Giménez-Gallego G. 1991. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science*, **254**(5035): 1208-1210.
- Cuevas P, et al. 1996. Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**(21), 11996-12001.
- Cunningham F, et al. 2022. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*. 50(D1) D988–D995, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>. Available from <https://www.ensembl.org>
- Daverio MS, Vidal-Rioja L, Frank EN, Di Rocco F. 2017. Molecular characterization of the llama FGF 5 gene and identification of putative loss of function mutations. *Animal genetics*, **48**(6): 716-719
- Dawson WM. 1937. Heredity in the dog. *U.S. Department of Agriculture Yearbook*, pp. 1315– 1349.
- Dierks C, Mömke S, Philipp U, Distl O. 2013. Allelic heterogeneity of FGF 5 mutations causes the long-hair phenotype in dogs. *Animal genetics*, **44**(4), 425-431.
- Drögemüller C, Rüfenacht S, Wichert B, Leeb T. 2007. Mutations within the FGF5 gene are associated with hair length in cats. *Animal genetics*, **38**(3): 218-221.
- du Cros DL, LeBaron RG, Couchman JR. 1995. Association of versican with dermal matrices and its potential role in hair follicle development and cycling. *Journal of Investigative Dermatology*, **105**(3): 426-431.
- du Cros DL. 1993. Fibroblast growth factor influences the development and cycling of murine hair follicles. *Developmental biology*. **156**:2: 444-453.
- Dziech A. 2021. Identification of wolf-dog hybrids in Europe—an overview of genetic studies. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **9**:760160.
- Faham S, Linhardt RJ, Rees DC. 1998. Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions. *Current opinion in structural biology*, **8**(5): 578-586.
- FCI-Standard N° 15: BELGIAN SHEPHERD DOG. 2002. 1. vydání. FCI mandatory Commissions. Thuin.
- FCI-Standard N° 16: OLD ENGLISH SHEEPDOG. 2011. 1. vydání. FCI mandatory Commissions. Thuin.

- FCI-Standard N° 3: KERRY BLUE TERRIER. 2005. 1. vydání. FCI mandatory Commissions. Thuin.
- FCI-Standard N° 332: CZECHOSLOVAKIAN WOLFD OG. 1999. 1. vydání. FCI mandatory Commissions. Thuin.
- Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M. 1995. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*, **267**(5195): 246-249.
- Floss T, Arnold HH, Braun T. 1997. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes & development*, **11**(16): 2040-2051.
- França LT, Carrilho E, Kist TB. 2002. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly reviews of biophysics*, **35**(2): 169-200.
- Fujimoto A, et al. 2012. A missense mutation within the helix initiation motif of the keratin K71 gene underlies autosomal dominant woolly hair/hypotrichosis. *Journal of Investigative Dermatology* **132**: 2342–2349.
- Gasser RB, Hu M, Chilton NB, Campbell BE, Jex AJ, Otranto D, Cafarchia C, Beveridge I, Zhu X. 2006. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature protocols*, **1**(6): 3121-3128.
- Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. 1998. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated β -catenin in skin. *Cell*. **95**: 605–614.
- Gospodarowicz D. 1974. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*, **249**(5453): 123-127
- Goswami K, Sanan-Mishra N. 2022. RNA-seq for revealing the function of the transcriptome. In *Bioinformatics*, Academic Press, 105-129.
- Griffin HG, Griffin AM. 1993. DNA sequencing: recent innovations and future trends. *Applied biochemistry and biotechnology*, **38**: 147-159.
- Gründemann D, Schömig E. 1996. Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. *Biotechniques*, **21**(5): 898-903.
- 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.
- Hansen LA, Alexander N, Hogan ME, Sundberg JP, Dlugosz A, Threadgill DW, Magnuson T, Yuspa SH. 1997. Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development. *The American journal of pathology*, **150**(6): 1959.
- Harmoinen J, et al. 2021. Reliable wolf-dog hybrid detection in Europe using a reduced SNP panel developed for non-invasively collected samples. *BMC genomics*, **22**(1): 473.
- Hartl K, Jedlička J. 1996. Československý vlčák. 1. vydání. Loba. Praha. ISBN: 80-239-1107-4.

- Hashim HO, Al-Shuhaib MBS. 2019. Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, **6**(4): 137-144.
- Hattori Y, Yamasaki M, Itoh N. 1996. The rat FGF-5 mRNA variant generated by alternative splicing encodes a novel truncated form of FGF-5. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, **1306**(1): 31-33.
- He X, Chao Y, Zhou G, Chen Y. 2016. Fibroblast growth factor 5-short (FGF5s) inhibits the activity of FGF5 in primary and secondary hair follicle dermal papilla cells of cashmere goats. *Gene*, **575**(2): 393-398.
- He XL, Yuan C, Chen YL. 2014. Isolation, characterization, and expression analysis of FGF5 isoforms in Cashmere goat. *Small Ruminant Research*, **116**(2-3): 111-117.
- Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. 1994. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell*, **78**(6): 1017-1025.
- Heiman M. 1997. Webcutter 2.0. Available from <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>
- Higgins CA, Chen JC, Cerise JE, Jahoda CA, Christiano AM. 2013. Microenvironmental reprogramming by three-dimensional culture enables dermal papilla cells to induce de novo human hair-follicle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(49): 19679-19688.
- Higgins CA, Petukhova L, Harel S, Ho YY, Drill E, Shapiro L, Wajid M, Christiano AM. 2014. FGF5 is a crucial regulator of hair length in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**(29): 10648-10653.
- Housley D, Venta P. 2006. The long and the short of it: evidence that FGF5 is a major determinant of canine 'hair'-itability. *Animal Genetics*, **37**: 309-315.
- Hu R, Fan ZY, Wang BY, Deng SL, Zhang XS, Zhang JL, Han HB, Lian ZX. 2017. RAPID COMMUNICATION: generation of knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *Journal of Animal Science*, **95**(5): 2019-2024.
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. 2001. β -Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, **105**(4): 533-545.
- Hutley L, et al. 2004. Fibroblast growth factor 1: a key regulator of human adipogenesis. *Diabetes*, **53**(12): 3097-3106.
- Cheng H, Cao Y, Olson L. 1996. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science*, **273**(5274): 510-513.
- Chidgeavadze ZG, Beabealashvilli RS, Atrazhev AM, Kukhanova MK, Azhayev AV, Krayevsky AA. 1984. 2', 3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases. *Nucleic acids research*, **12**(3): 1671.
- Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE, Cotsarelis G. 2007. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*, **447**(7142): 316-320.

- 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. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x>
- Kamiya T, Shirai A, Kawashima S, Sato S, Tamaoki T. 1998. Hair follicle elongation in organ culture of skin from newborn and adult mice. *Journal of dermatological science*, **17**(1): 54-60.
- Kehler JS, David VA, Schäffer AA, Bajema K, Eizirik E, Ryugo DK, Hannah SS, O'Brien SJ, Menotti-Raymond M. 2007. Four independent mutations in the feline fibroblast growth factor 5 gene determine the long-haired phenotype in domestic cats. *Journal of Heredity*, **98**(6): 555-566.
- King C, Scott-Horton T. 2008. Pyrosequencing: a simple method for accurate genotyping. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, **11**: e630.
- Krausová K. 2018. Molekulární markery mutací genu FGF5 zodpovědných za dlouhou srst u plemene československý vlčák a možnosti jejich aplikace v plemenitbě [MSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague, Prague.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. **62**: e3923.
- Legrand R, Tiret L, Abitbol M. 2014. Two recessive mutations in FGF5 are associated with the long-hair phenotype in donkeys. *Genetics Selection Evolution*, **46**(1): 1-7.
- Lin PH, Cheng H, Huang WC, Chuang TY. 2005. Spinal cord implantation with acidic fibroblast growth factor as a treatment for root avulsion in obstetric brachial plexus palsy. *Journal of the Chinese Medical Association*, **68**(8): 392-396.
- Lin W, et al. 2015. Fibroblast Growth Factors Stimulate Hair Growth through β -Catenin and Shh Expression in C57BL/6 Mice. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/730139>
- Lindblad-Toh K, et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, **438**(7069):803-819.
- Maraqqa T, Alhajeri BH, Alhaddad H. 2021. FGF5 missense mutation is associated with dromedary hair length variation. *Animal Genetics*, **52**(6): 848-856.
- Martin J, Gruber M, Lupas AN. 2004. Coiled coils meet the chaperone world. *Trends in biochemical sciences*, **29**(9): 455-458.
- Maxam AM, Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**(2): 560-564.
- McKeehan WL, Wang F, Kan M. 1997. The heparan sulfate–fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, **59**: 135-176.
- Metzker ML. 2010. Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, **11**(1): 31-46.

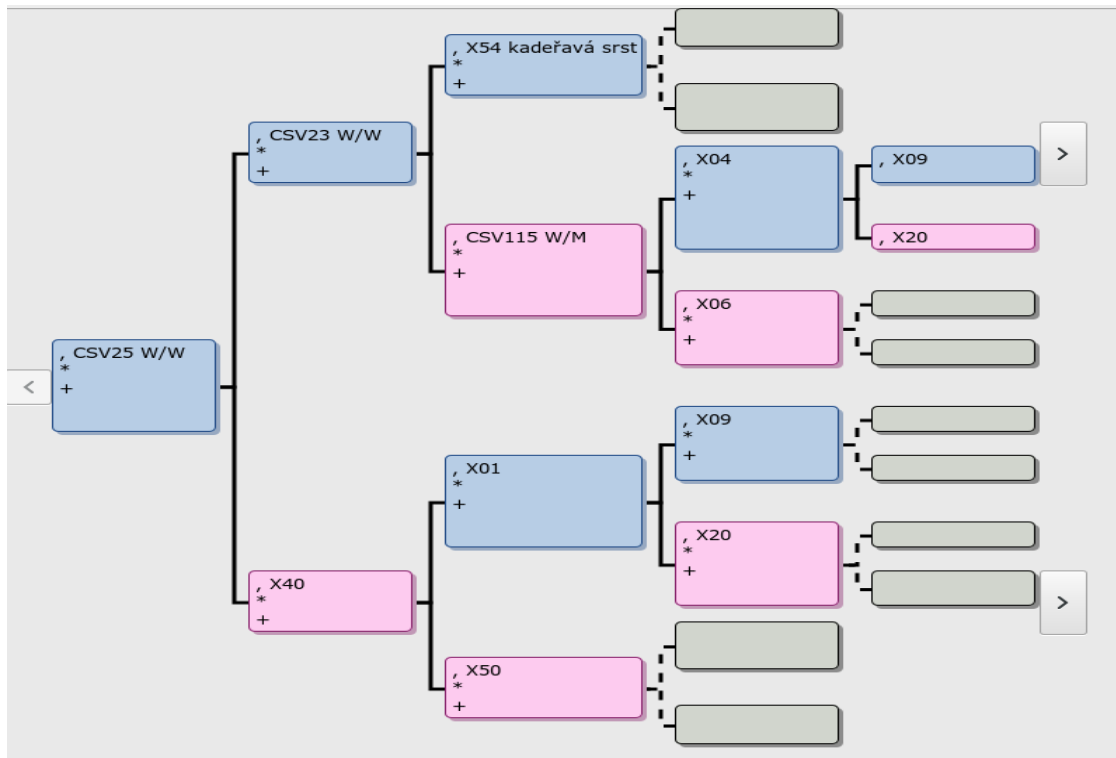
- Milos PM. 2010. Helicos single molecule sequencing: Unique capabilities and importance for molecular diagnostics. *Genome Biology*, **11**: I14.
- Moll R, Divo M, Langbein L. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology*, **129**: 705-733.
- Moravčíková N, Kasarda R, Židek R, Vostrý L, Vostrá-Vydrová H, Vašek J, Čílová D. 2021. Czechoslovakian Wolfdog Genomic Divergence from Its Ancestors Canis lupus, German Shepherd Dog, and Different Sheepdogs of European Origin. *Genes*, **12**(6): 832.
- Muyzer G, Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 127–141. <https://doi.org/10.1023/A:1000669317571>
- Newton CR, Graham A, Ellison JS. 1997. *PcR*. BIOS Scientific Publishers. Oxford, UK.
- Nikol S, et al. 2008. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Molecular Therapy*, **16**(5): 972-978.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(8):2766-2770. doi:10.1073/pnas.86.8.2766.
- Ornitz DM, Itoh N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* **2**. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005>
- Ornitz DM, Marie PJ. 2002. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & development*, **16**(12): 1446-1465.
- Ota Y, Saitoh Y, Suzuki S, Ozawa K, Kawano M, Imamura T. 2002. Fibroblast growth factor 5 inhibits hair growth by blocking dermal papilla cell activation. *Biochemical and biophysical research communications*, **290**(1): 169-176.
- Pallotti S, Pediconi D, Subramanian D, Molina MG, Antonini M, Morelli MB, Renieri C, La Terza A. 2018. Evidence of post-transcriptional readthrough regulation in FGF5 gene of alpaca. *Gene Journal*, **647**:121–128.
- Panteleyev AA, Jahoda CA, Christiano AM. 2001. Hair follicle predetermination. *Journal of cell science*, **114**(19): 3419-3431.
- Plikus MV, Mayer JA, de La Cruz D, Baker RE, Maini PK, Maxson R, Chuong CM. 2008. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature*, **451**: 340–344.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from <https://www.R-project.org/>.
- Ribani A, Schiavo G, Utzeri VJ, Bertolini F, Geraci C, Bovo S, Fontanesi L. 2018. Application of next generation semiconductor based sequencing for species identification in dairy products. *Food chemistry*, **246**: 90-98

- Rincon G, et al. 2011. Comparison of buccal and blood-derived canine DNA, either native or whole genome amplified, for array-based genome-wide association studies. *BMC Research Notes*, **4**:1-6.
- Rishikaysh P, Dev K, Diaz D, Qureshi WMS, Filip S, Mokry J. 2014. Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development. *International journal of molecular sciences*, **15**(1): 1647-1670.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **132**, 365–386. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365>
- Salmela E, Niskanen J, Arumilli M, Donner J, Lohi H, Hytönen MK. 2019. A novel KRT71 variant in curly-coated dogs. *Animal genetics*, **50**: 101-104.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, **74**(12): 5463-5467.
- Sayers et al. 2022. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* **50**(D1):D20-D26. doi: 10.1093/nar/gkab1112. PMID: 34850941; PMCID: PMC8728269.
- Scott JP, Fuller JL. 1965. Genetics and the social behavior of the dog. *Univ. Chicago Press, Chicago, 111*.
- Sharp PA, Sugden B, Sambrook J. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**(16): 3055-3063.
- Shimomura Y, Wajid M, Petukhova L, Kurban M, Christiano AM. 2010. Autosomal-dominant woolly hair resulting from disruption of keratin 74 (KRT74), a potential determinant of human hair texture. *The American Journal of Human Genetics*, **86**(4): 632-638.
- Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. 2010. A window into third-generation sequencing. *Human molecular genetics*, **19**(R2): 227-240.
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. 2009. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Current biology*, **19**(3): 132-142.
- Smetanová M, Černá Bolfíková B, Randi E, Caniglia R, Fabbri E, Galaverni M, Kutal M, Hulva P. 2015. From wolves to dogs, and back: genetic composition of the Czechoslovakian Wolfdog. *PloS one*, **10**(12), e0143807.
- Soma T, Tajima M, Kishimoto J. 2005. Hair cycle-specific expression of versican in human hair follicles. *Journal of dermatological science*, **39**(3): 147-154.
- Stellwagen NC. 2009. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*, **30**: 188-195.
- Stenn KS, Combates NJ, Eilertsen KJ, Gordon JS, Pardinas JR, Parimoo S, Prouty SM. 1996. Hair follicle growth controls. *Dermatologic clinics*, **14**: 543–558.

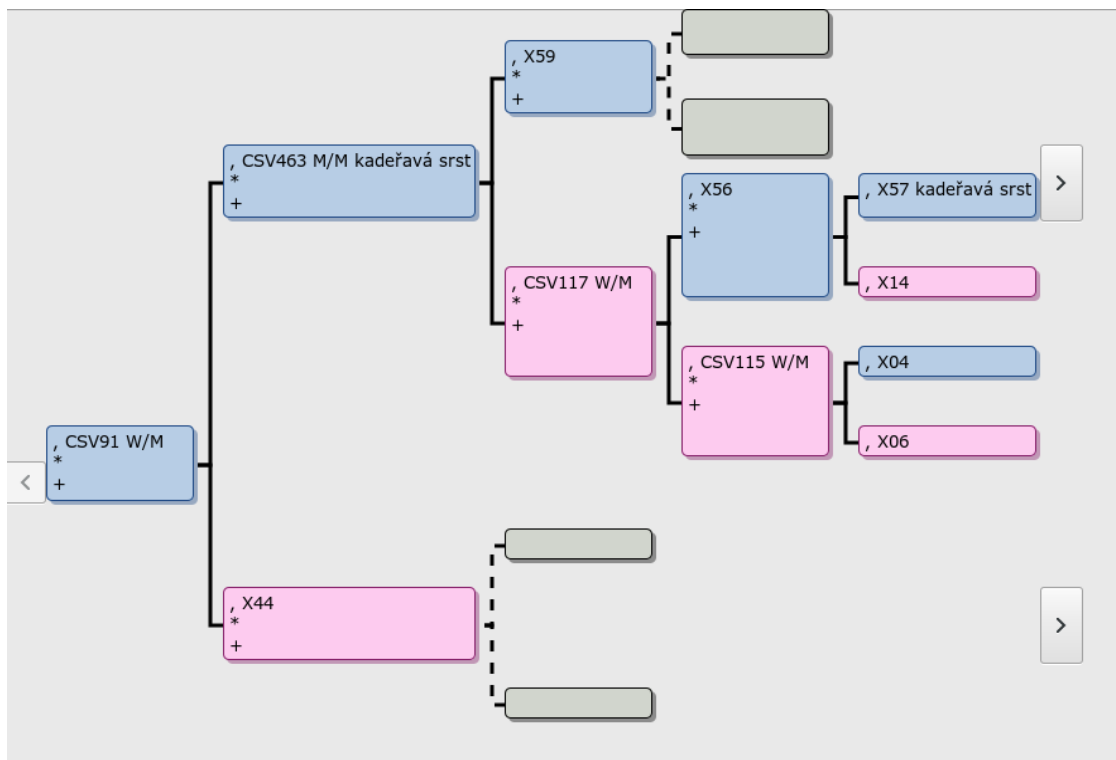
- Štikarová R, Vašek J, Čílová D, Vejl P. 2019. Estimation of genotyping errors of STR markers in dogs and wolves. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, **7**(1): 901-902.
- Thomas KA, Rios-Candelore M, Fitzpatrick S. 1984. Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **81**(2): 357-361.
- Tucker T, Marra M, Friedman JM. 2009. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *The American Journal of Human Genetics*, **85**(2): 142-154.
- Uemura S, Aitken CE, Korlach J, Flusberg BA, Turner SW, Puglisi JD. 2010. Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature*, **464**(7291): 1012-1017.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yoshizawa Y, Wada K, Shimoi G, Kameyama Y, Wakabayashi Y, Fukuta K, Hashizume R. 2015, A 1-bp deletion in FGF5 causes male-dominant long hair in the Syrian hamster. *Mammalian Genome*, **26**: 630–637.
- Zhang H, Nan W, Wang S, Zhang T, Si H, Yang F, Li G. 2016. Epidermal growth factor promotes proliferation and migration of follicular outer root sheath cells via Wnt/ β -catenin signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **39**(1): 360-370.

9 Samostatné přílohy

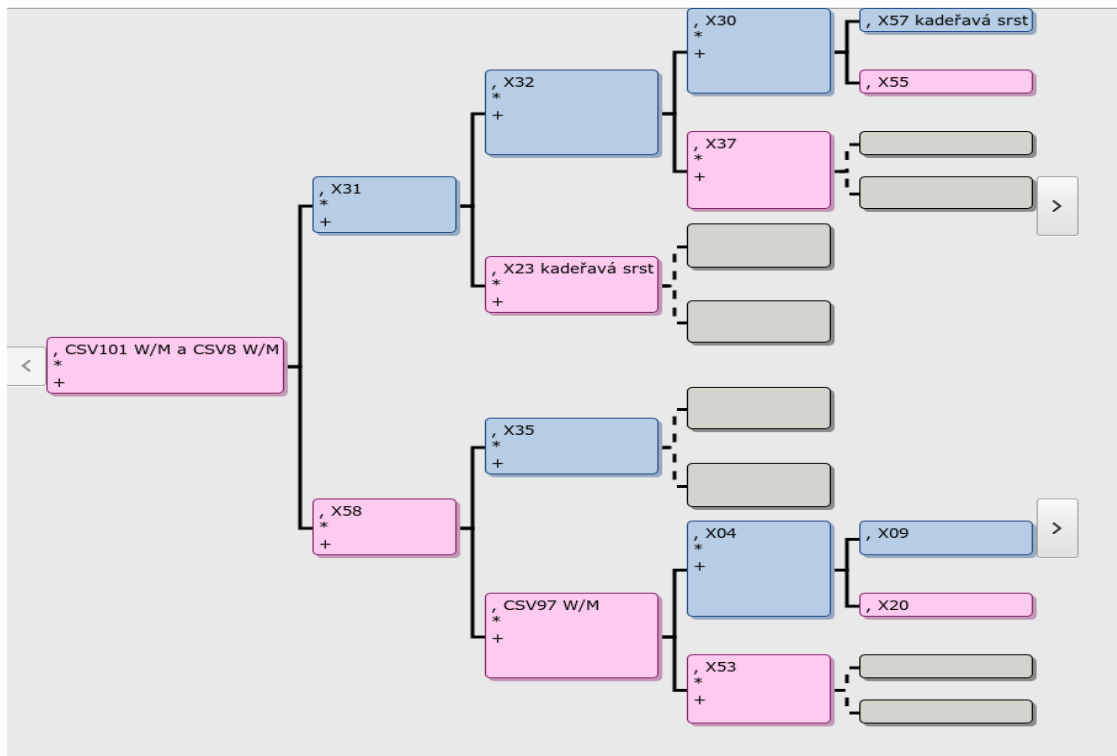
Příloha 1: Rodokmen jedince CSV25



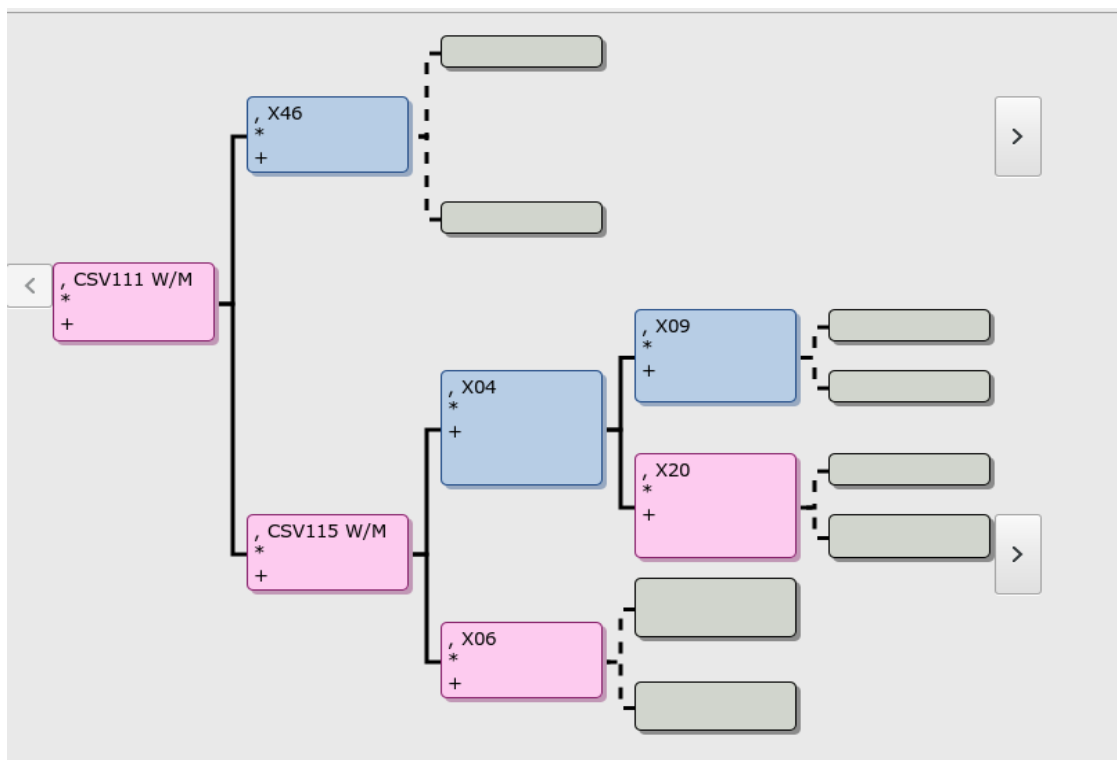
Příloha 2: Rodokmen jedince CSV91



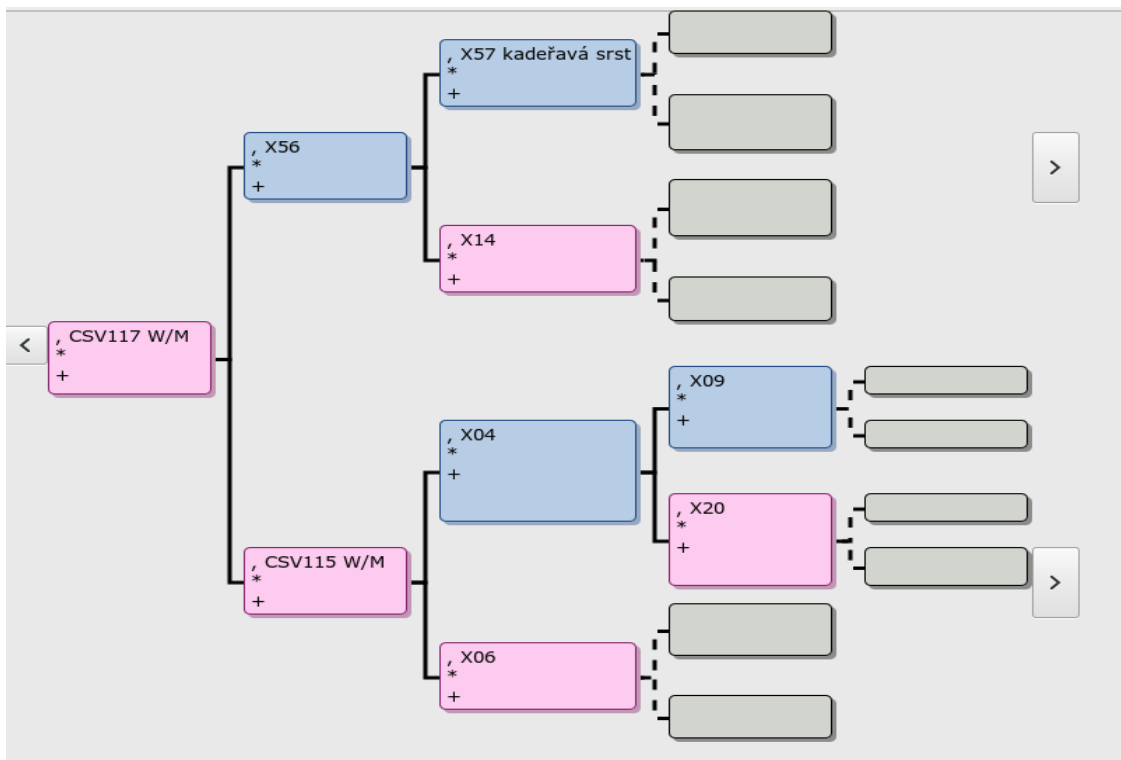
Příloha 3: Rodokmen jedince CSV101 a CSV8



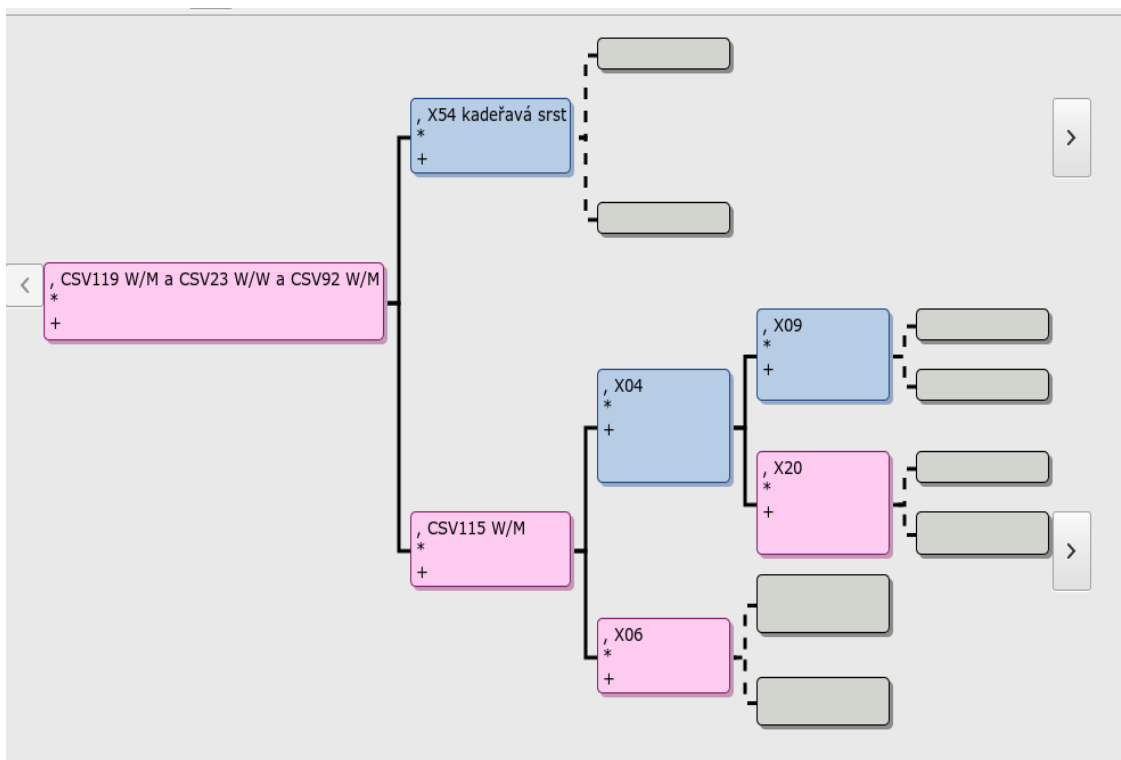
Příloha 4: Rodokmen jedince CSV111



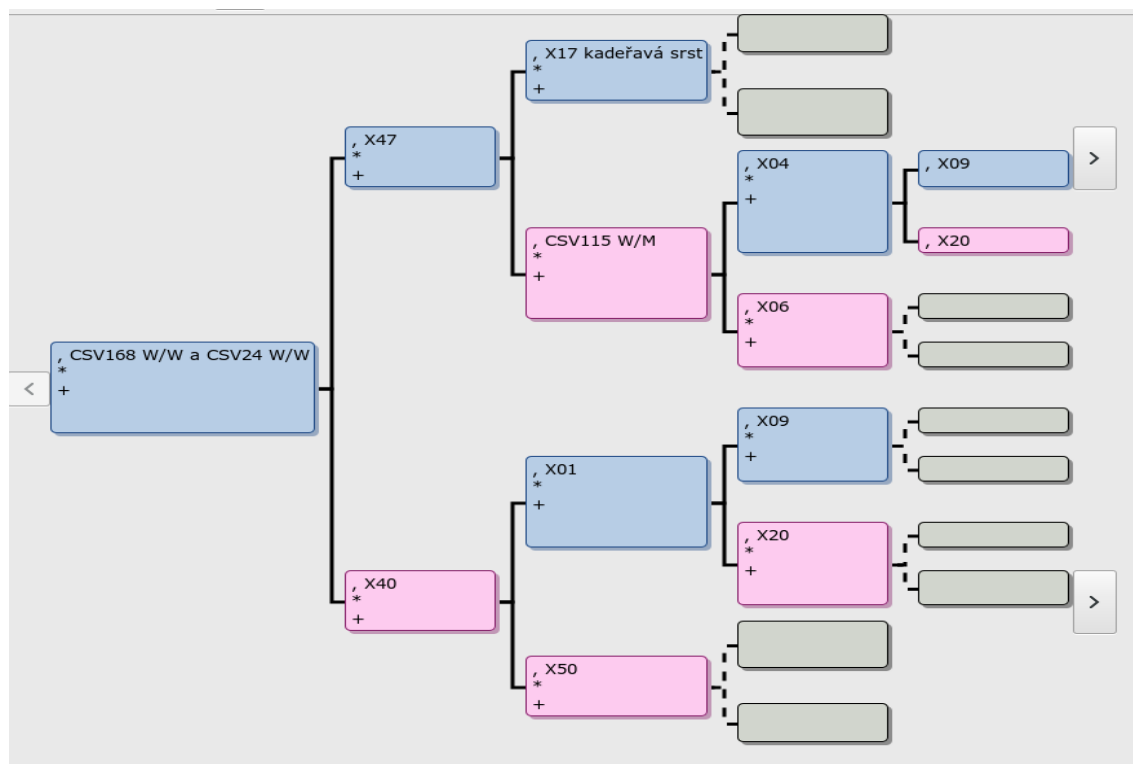
Příloha 5: Rodokmen jedince CSV117



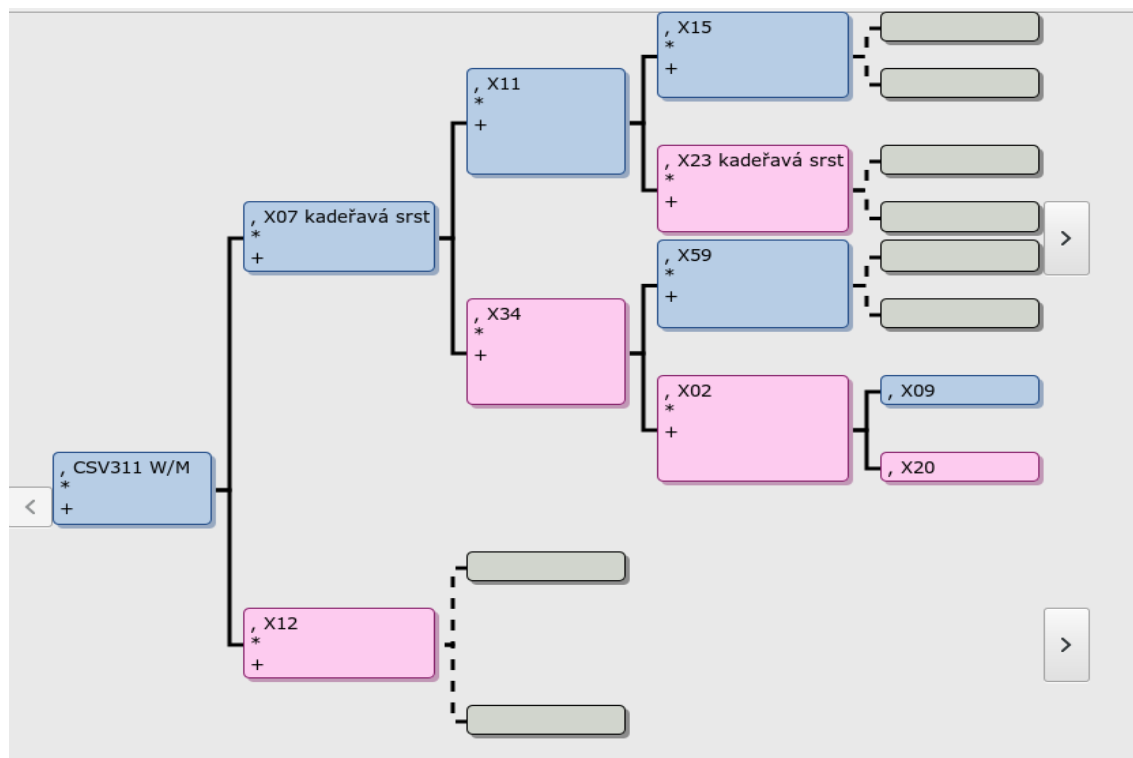
Příloha 6: Rodokmen jedince CSV119, CSV23 a CSV92



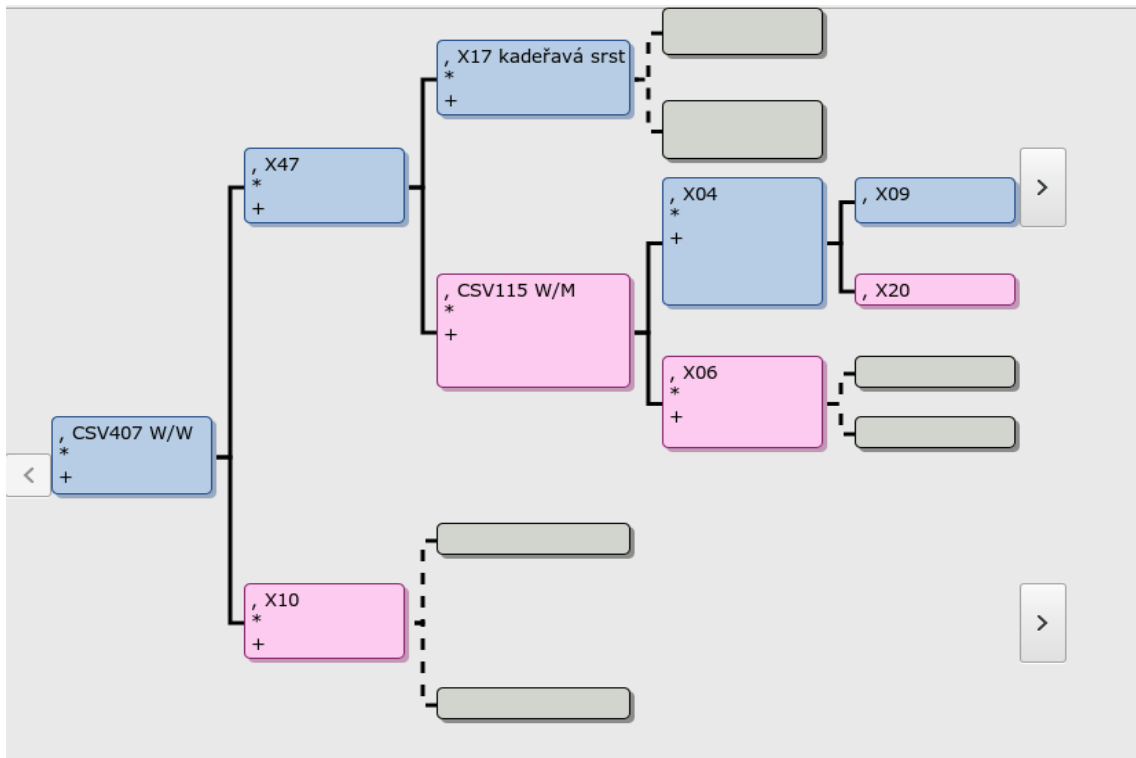
Příloha 7: Rodokmen jedince CSV168 a CSV24



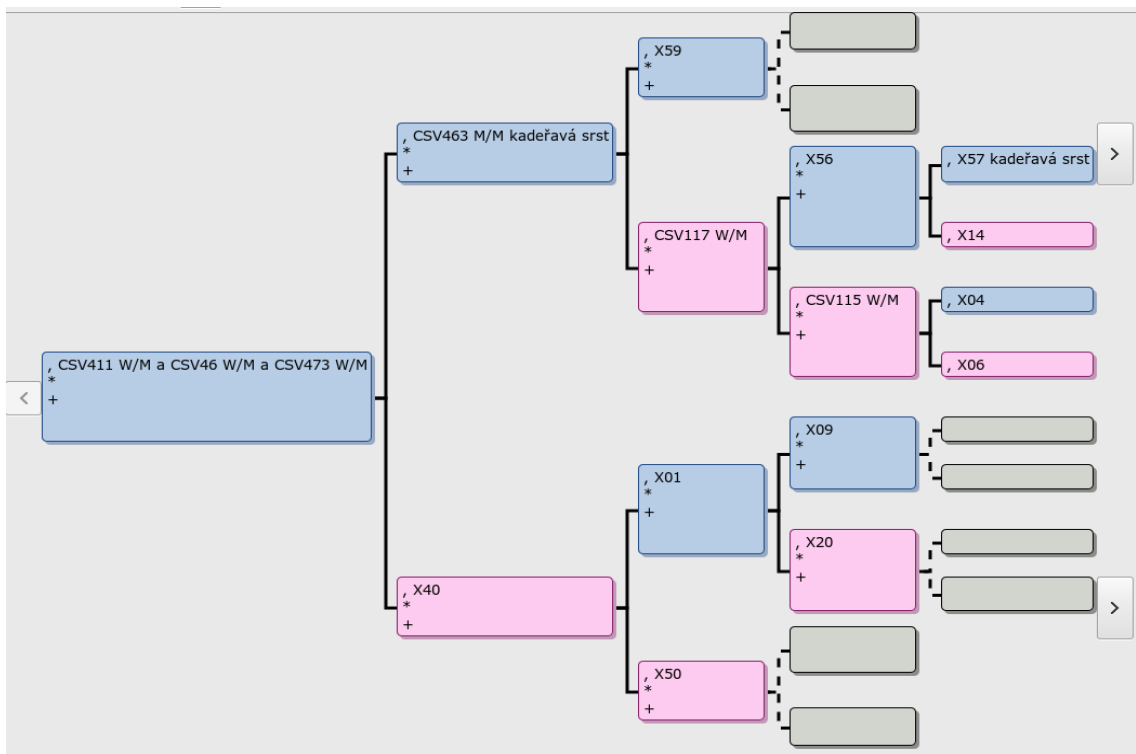
Příloha 8: Rodokmen jedince CSV311



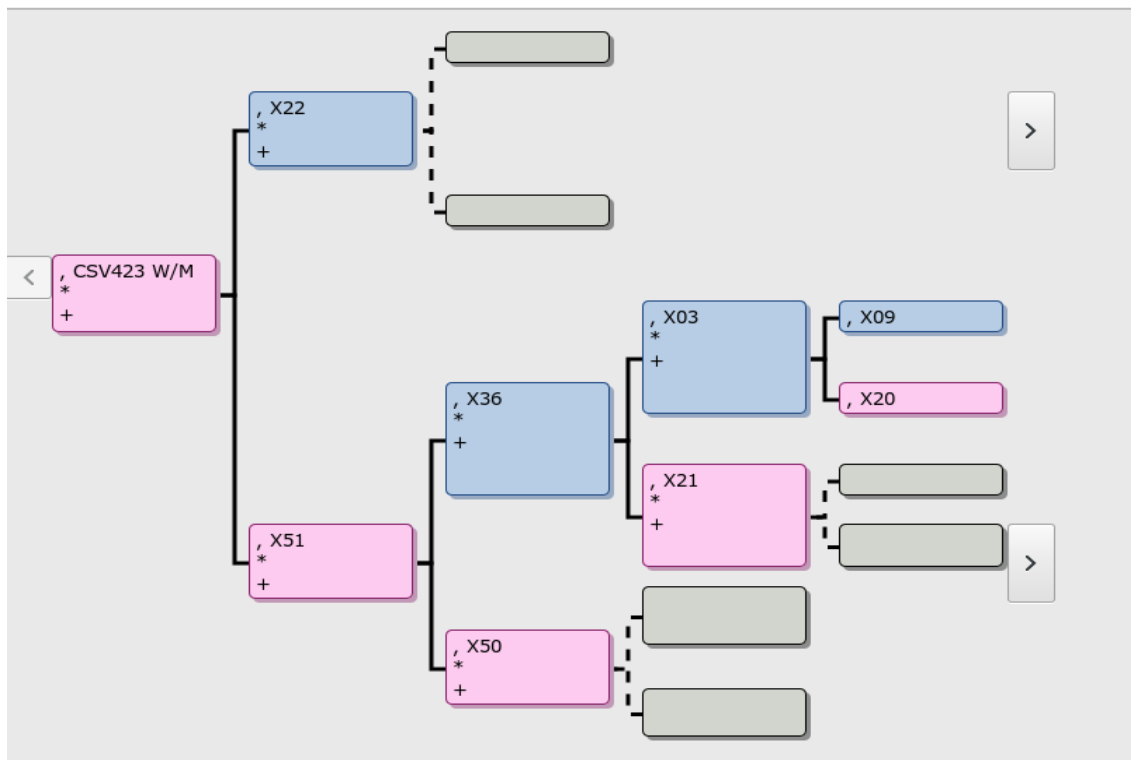
Příloha 9: Rodokmen jedince CSV407



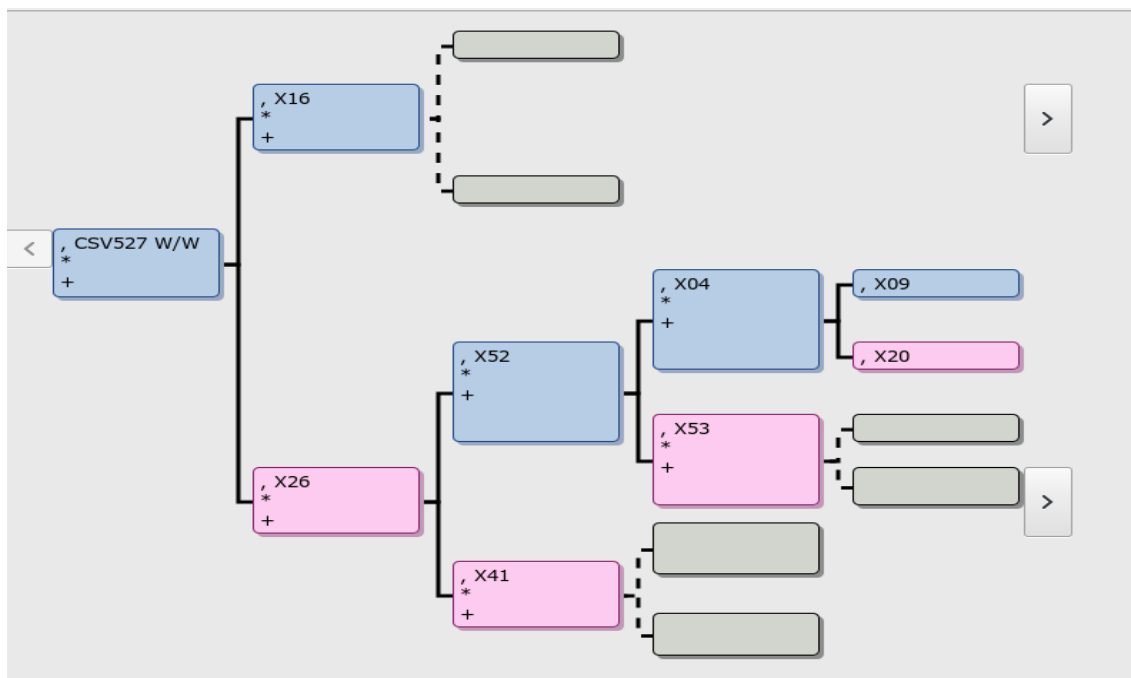
Příloha 10: Rodokmen jedince CSV411



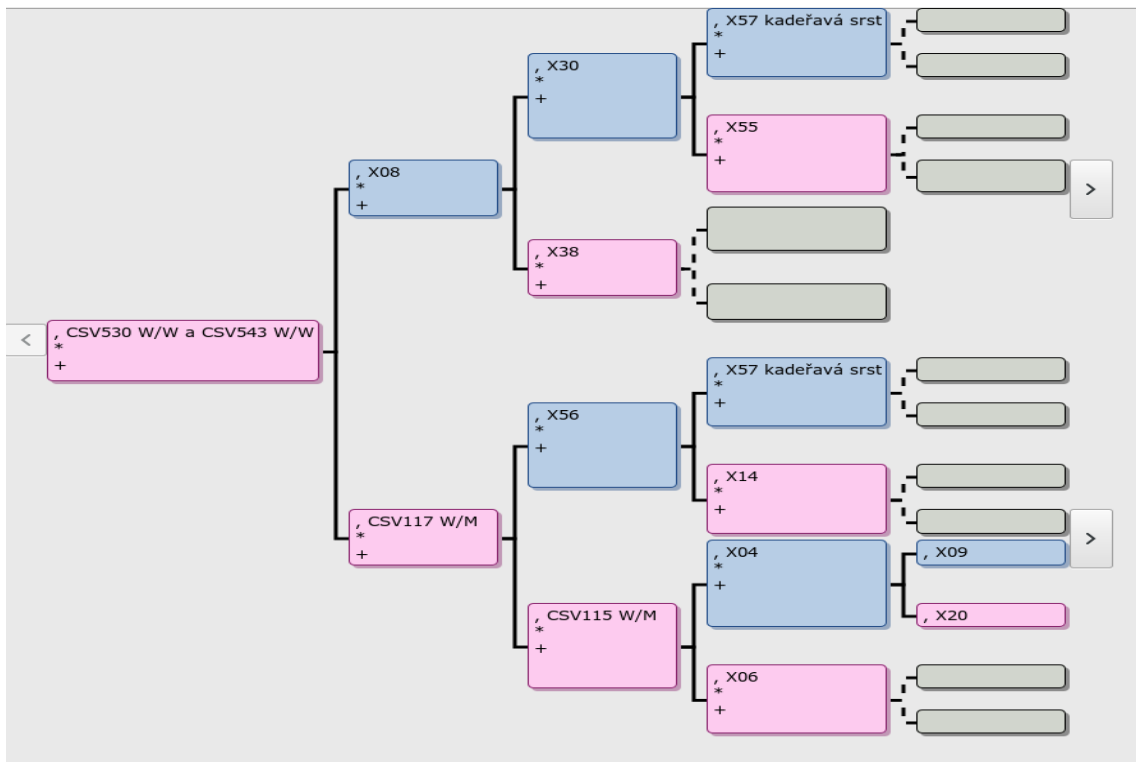
Příloha 11: Rodokmen jedince CSV423



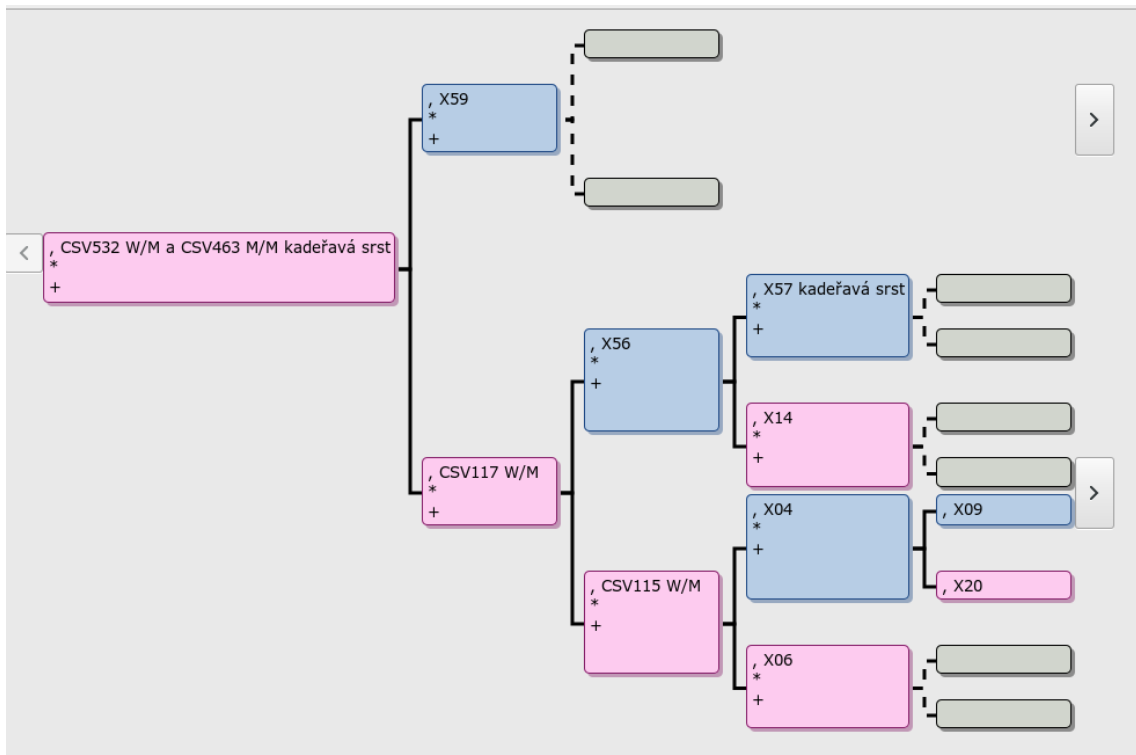
Příloha 12: Rodokmen jedince CSV527



Příloha 13: Rodokmen jedince CSV530 a CSV543



Příloha 14: Rodokmen jedince CSV532 a CSV463



Příloha 15: Výsledky genotypizace. U pohlaví písmeno M odpovídá samci a písmeno F samici.

ID	Subpopulace	KRT71	FGF5	Pohlaví
CSV1LONG	B	W/W	M/M	M
CSV2LONG	B	W/W	M/M	M
CSV4	B	W/W	W/W	F
CSV8	A	W/M	W/W	F
CSV16	B	W/W	W/W	M
CSV23	A	W/W	W/W	M
CSV24	A	W/W	W/W	F
CSV25	A	W/W	W/W	M
CSV27	B	W/W	W/W	M
CSV35	B	W/W	W/W	M
CSV37	B	W/W	W/W	M
CSV39	B	W/W	W/W	F
CSV46	A	W/M	W/W	M
CSV52	A	M/M	W/W	M
CSV78	B	W/W	W/W	M
CSV91	A	W/M	W/W	M
CSV92	A	W/M	W/W	F
CSV97	A	W/M	W/M	F
CSV98	B	W/W	W/W	F
CSV99	A	M/M	W/W	M
CSV100	B	W/W	W/W	F
CSV101	A	W/M	W/W	F
CSV102	B	W/W	W/W	F
CSV111	A	W/M	W/W	F
CSV115	A	W/M	W/W	F
CSV117	A	W/M	W/W	F
CSV119	A	W/M	W/W	F
CSV123	B	W/W	W/M	F
CSV131	A	M/M	W/W	F
CSV132	A	M/M	W/M	F
CSV133	A	W/M	W/W	F
CSV149	B	W/W	W/W	M
CSV161	B	W/W	W/W	M
CSV168	A	W/W	W/W	M
CSV196	B	W/W	W/M	M
CSV249	A	M/M	W/W	F
CSV255	B	W/W	W/W	M
CSV276	B	W/W	W/W	F
CSV297	B	W/W	W/W	F
CSV298	B	W/W	W/W	F
CSV299	B	W/W	W/W	F

CSV311	A	W/M	W/W	M
CSV317	B	W/W	W/W	F
CSV319	B	W/W	W/W	M
CSV326	B	W/W	W/M	M
CSV338	B	W/W	W/M	F
CSV353	B	W/W	W/M	M
CSV355	B	W/W	W/M	M
CSV399	B	W/W	W/W	M
CSV407	A	W/M	W/W	M
CSV411	A	W/M	W/W	M
CSV421	B	W/W	W/W	M
CSV423	A	W/M	W/W	F
CSV442	B	W/W	W/W	F
CSV444	B	W/W	W/W	M
CSV463	A	M/M	W/W	M
CSV470	B	W/W	W/W	M
CSV473	A	W/M	W/W	M
CSV475	B	W/W	W/W	F
CSV518	B	W/W	W/M	M
CSV527	A	W/W	W/W	M
CSV530	A	W/W	W/W	F
CSV532	A	W/M	W/W	F
CSV543	A	W/W	W/W	M
CSV582	B	W/W	W/W	M
CSV594	B	W/W	W/M	M
CSV600	B	W/W	W/M	F
CSV697	B	W/W	W/W	F
CSV709	B	W/W	W/W	M
CSV712	B	W/W	W/M	F
CSV736	B	W/W	W/W	F
CSV743	B	W/W	W/W	F
CSV793	B	W/W	W/W	F
CSV818	B	W/W	W/M	M
CSV855	B	W/W	W/W	M
CSV886	B	W/W	W/W	M
CSV950	B	W/W	W/W	F
CSV974	B	W/W	W/W	M
CSV1001	B	W/W	W/W	F
CSV1037	B	W/W	W/W	M