

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Charakteristika gonozómů technikami qRT-PCR
a ddPCR u klisny se symptomy syndromu androgenní
insenzitivity – kauzální studie**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Pavlína Čadová

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: Ing. Vladimíra Sedláková, Ph.D.

Odborný konzultant: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Charakteristika gonozómů technikami qRT-PCR a ddPCR u klisny se symptomy syndromu androgenní insenzitivity – kauzální studie" 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Vladimíře Sedlákové Ph.D. za cenné rady a odborné vedení a konzultantovi práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za navržení prumerů a pomoc při zpracování experimentální části práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Daniele Čílové a Mgr. Martině Melounové, Ph.D. za vedení při práci v laboratoři a majitelům ranče Kopaniny z.s. za poskytnutí vzorků.

Charakteristika gonozómů technikami qRT-PCR a ddPCR u klisny se symptomy syndromu androgenní insenzitivity – kauzální studie

Souhrn

Syndrom androgenní insenzitivity (AIS) patří u koní mezi jednu z nejčastějších poruch sexuálního vývoje. Jedinec trpící tímto syndromem má běžný karyotyp hřebce s gonozómy XY, ale fenotypový projev je samičí. Tento patologický stav se projevuje jako následek nedostatečného působení androgenů během ontogenetického vývoje samce z důvodu mutace v genu pro androgenní receptor. V koňském genomu bylo zatím popsáno pouze 5 mutací, které jsou kauzální pro vznik tohoto syndromu.

Jedinec Nikita, jež je hlavním subjektem této diplomové práce, vykazoval symptomy syndromu androgenní insenzitivity, zahrnující samičí fenotyp, projevy samčího chování a ambivalentní pohlavní orgány. Pro molekulární analýzy byla izolována DNA z chlupových cibulek pomocí kitu NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, Německo).

V prvním kroku byla provedena genotypizace jedince Nikity i kontrolních vzorků pomocí metody PCR. Byly navrženy specifické primery pro markery HOR4 (gen *SRY*) a HOR10 (gen pro amelogenin – *AMEL*). Pomocí amplifikace těchto markerů bylo zjištěno, že jedinec trpící symptomy syndromu androgenní insenzitivity má přítomny pouze chromozomy X a nemá gen *SRY* a jedná se tedy o samici.

Pro potvrzení výsledků byla optimalizována metoda relativní kvantifikace, při níž byla porovnávána míra amplifikace, daná počtem CNV (copy number variation), mezi geny *CYLC1*, *SRY* a autozomálním genem *MCEE*. Byly navrženy specifické primery pro markery HOR1 (gen *CYLC1* na nehomologní části chromozomu X), HOR4 (gen *SRY* na chromozomu Y) a HOR7 (gen *MCEE* na chromozomu 1), který byl využit jako referenční gen. Získané výsledky potvrdily, že je možné využít tyto markery pro rozlišení pohlaví u koní. Hodnota CNV u genu *CYLC1* dosahovala u samic přibližně 1,00, jelikož mají chromozom X ve dvou kopiích, u samců byla hodnota přibližně poloviční. Při porovnání míry amplifikace genu *CYLC1* a *SRY* u samců byla hodnota přibližně stejná, což dokazuje přítomnost obou typů pohlavních chromozomů po jedné kopii. U jedince se symptomy AIS byly detekovány dvě kopie chromozomu X a bylo tak potvrzeno samičí pohlaví.

Metoda digitální dropletové PCR byla využita pro absolutní kvantifikaci molekul DNA ve vzorcích a určení přesné hodnoty CNV. Absolutní kvantifikace potvrdila u jedince Nikity samičí pohlaví, hodnota CNV u jejího vzorku byla 0,9175, což odpovídá hodnotě pro běžnou klisnu.

Pro ověření přítomnosti kauzální mutace na první pozici start kodonu (c.1A>G) byla u jedince Nikity sekvenována část genu pro androgenní receptor. Kauzální mutace nebyla prokázána, byla však nalezena bodová mutace na pozici c.322, při níž došlo k substituci alely C za alelu T. Tato substituce, vedoucí ke vzniku cysteinu místo původně vznikajícího argininu, však podle dostupné literatury není kauzální pro vznik syndromu androgenní insenzitivity.

Přestože v diplomové práci nebyla odhalena příčina samčích projevů chování u klisny Nikity ani nebyla prokázána kauzální mutace vedoucí ke vzniku syndromu androgenní insenzitivity, lze metody navržené v této práci využít k determinaci pohlaví u koní v dalších výzkumech.

Klíčová slova: syndrom androgenní insenzitivity, *Equus caballus*, gonozómy, qRT-PCR, ddPCR

Characterization of gonosomes by qRT-PCR and ddPCR techniques in a mare with symptoms of androgen insensitivity syndrome – a causal study

Summary

Androgen insensitivity syndrome (AIS) is one of the most common disorders of sexual development in horses. An individual with androgen insensitivity syndrome has the normal karyotype of a stallion with XY gonosomes, but the phenotypic expression is female. This pathological condition manifests as a consequence of insufficient androgen exposure during ontogenetic development of the male due to a mutation in the androgen receptor gene. So far only 5 mutations have been described in the equine genome that are causative of this syndrome.

The individual called Nikita, who is the main subject of this thesis, exhibited symptoms of androgen insensitivity syndrome, including a female phenotype, typical male behaviour and ambivalent genitalia. For molecular analyses, DNA was isolated from the hair bulbs of a total of 24 horses using the NucleoSpin Tissue XS kit (Macherey-Nagel, Germany).

In a first step, genotyping of Nikita and control samples was performed using PCR. Specific primers for markers HOR4 (*SRY* gene) and HOR10 (*AMEL* gene) were designed. Using amplification of these markers, it was found that the individual suffering from symptoms of androgen insensitivity syndrome were present only X chromosomes and lacks the *SRY* gene and is therefore a female.

To confirm the results, a relative quantification method was optimized by comparing the amplification rate, given by copy number variation (CNV), between *CYLC1* gene, *SRY* gene and autosomal *MCEE* gene. Specific primers were designed for the markers HOR1 (*CYLC1* gene on the non-homologous part of the X chromosome), HOR4 (*SRY* gene on the Y chromosome) and HOR7 (*MCEE* gene on chromosome 1), which was used as a reference gene. The results obtained from this experiment confirmed that it is possible to use these markers for sex determination in horses. The CNV value for the *CYLC1* gene was approximately 1.00 in females, since they have two copies of the X chromosome, whereas in males the value was approximately half that in females. When comparing the amplification rate of the *CYLC1* and *SRY* gene in males, the value was approximately the same (0.50), demonstrating the presence of both types of sex chromosomes with one copy each. In the individual with AIS symptoms, two copies of the X chromosome were detected, confirming the female sex.

The digital droplet PCR method was used for absolute quantification of DNA molecules in the samples and determination of the exact copy number variation value. Absolute quantification confirmed the female sex of Nikita, the CNV value for her sample was 0.9175, which corresponds to the value for a normal mare.

To verify the presence of a causal mutation at the first position of the start codon (c.1A>G), the part of the androgen receptor gene was sequenced. The causative mutation was not found, but a single nucleotide polymorphism at position c.322 was found, in which the C allele was substituted for the T allele. However, this substitution, leading to the formation of cysteine instead of the originally formed arginine, is not causal for the development of androgen insensitivity syndrome according to the available literature.

Although the thesis did not reveal the cause of the male behavioural manifestations in the mare Nikita, nor was a causal mutation shown to lead to androgen insensitivity syndrome, the methods proposed in this thesis can be used to determine sex in horses in future research.

Keywords: androgen insensitivity syndrome, *Equus caballus*, gonosomes, qRT-PCR, ddPCR

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
2.1 Vědecká hypotéza	9
2.2 Cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Genom koně	10
3.1.1 Stavba koňského chromozomu Y	11
3.2 Androgenní receptor	17
3.2.1 Stavba androgenního receptoru	17
3.2.2 Princip fungování androgenního receptoru.....	19
3.2.3 Ligandy	20
3.3 Poruchy sexuálního vývoje - DSD.....	21
3.3.1 Syndrom androgenní insenzitivity u koní	22
3.3.2 Syndrom androgenní insenzitivity u lidí.....	24
3.4 Metody analýzy využívané v diagnostice AIS.....	25
3.4.1 Real-Time PCR/qPCR	25
3.4.2 Dropletová digitální PCR.....	28
3.5 Nejčastěji využívané lokusy pro určování pohlaví.....	30
3.5.1 <i>SRY</i>	30
3.5.2 Amelogenin.....	31
3.5.3 <i>ZFX, ZFY</i> – zinkové prsty	31
4 Metodika	32
4.1 Biologický materiál	32
4.1.1 Veterinární vyšetření jedince	32
4.1.2 Hodnocení jedinci	32
4.1.3 Izolace DNA a ověření její kvality	32
4.2 Genotypizace pomocí PCR pro geny <i>SRY</i> a amelogenin	33
4.2.1 Použité primery	33
4.2.2 Teplotní gradient pro geny <i>AMEL</i> a <i>SRY</i>	34
4.2.3 Amplifikace genů <i>AMEL</i> a <i>SRY</i>	35
4.3 Kvantifikace pomocí real-time PCR (qPCR)	36
4.3.1 Real-time PCR pro optimalizační fázi	36
4.3.2 Real-time PCR pro geny <i>CYLC1</i> , <i>MCEE</i> a <i>SRY</i>	37
4.4 Absolutní kvantifikace	38
4.5 Sekvenační reakce genu pro androgenní receptor	39
4.5.1 Teplotní gradient pro nasedání primerů	39
4.5.2 Amplifikace genu pro androgenní receptor	40

5	Výsledky	42
5.1	Biologický materiál	42
5.1.1	Veterinární vyšetření jedince	42
5.1.2	Izolace DNA	43
5.2	Genotypizace pomocí PCR pro geny SRY a amelogenin	44
5.2.1	Teplotní gradient pro geny <i>AMEL</i> a <i>SRY</i>	44
5.2.2	Amplifikace genů <i>AMEL</i> a <i>SRY</i>	44
5.3	Kvantifikace pomocí real-time PCR (qPCR)	45
5.3.1	Real-time PCR pro optimalizační fázi	45
5.3.2	Real-time PCR pro geny <i>CYLC1</i> , <i>SRY</i> a <i>MCEE</i>	47
5.4	Absolutní kvantifikace	48
5.5	Sekvenační reakce genu pro androgenní receptor	53
5.5.1	Teplotní gradient pro nasedání primerů	53
5.5.2	Vyhodnocení výsledků sekvenace	54
6	Diskuze	55
6.1	Veterinární vyšetření	55
6.2	Izolace DNA	56
6.3	Genotypizace	56
6.4	Relativní kvantifikace	57
6.5	Absolutní kvantifikace	58
6.6	Sekvenační reakce	59
6.7	Shrnutí	60
7	Závěr	62
8	Bibliografie	63
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	72

1 Úvod

Mezi hospodářskými zvířaty zaujímá kůň (*Equus caballus*) speciální místo. Od domestikace před cca 5500 lety (Gaunitz et al. 2018) byli koně využíváni lidmi v zemědělství, v dopravě, ke sportu, ale i jako společníci. Velmi brzy začalo jejich selektivní množení jak pro výkonnostní vlastnosti, tak pro vzhled a výsledkem tohoto dlouhodobého procesu byl vznik více než 400 různých plemen (Petersen et al. 2013).

V jezdeckém sportu i mezi běžnými chovateli se v posledních letech dostává do popředí problematika poruch sexuálního vývoje koní. Toto téma je aktuální i mezi vědeckou společností, i přesto je však kolem poruch sexuálního vývoje u koní stále mnoho neobjasněných otázek. Význam výzkumu a poznání této oblasti je přitom obrovský. Reprodukční výkonnost jedince má pro chovatele ekonomický význam a u divokých populací koní je životně důležitá pro jejich přežití.

Jedním z důvodů, proč je v oblasti poruch sexuálního vývoje u koní tolik nejasností, může být chromozom Y. Jedná se o nejméně prozkoumanou část koňského genomu a dosud nebyla stanovena jeho kompletní sekvence. V současnosti probíhají snahy o pokrok v poznání chromozomu Y a nedávno byla autory Janečka et al. (2018) představena sekvence jeho části, konkrétně oblasti specifické pouze pro samce (MSY region). V této oblasti se nachází gen *SRY*, který je důležitý pro správný vývoj samčího pohlaví. Jeho umístění mezi repetitivními sekvencemi může mít za následek větší pravděpodobnost delece tohoto genu a s tím spojené komplikace při správném vývoji pohlaví (Janečka et al. 2018).

U koní je popsáno mnoho případů jedinců, u kterých se neshoduje fenotypový projev pohlaví s jejich genotypem (Bolzon et al. 2016; Welsford et al. 2017). Porucha jedinců s karyotypem XY a samičím fenotypem je označována jako syndrom androgenní insenzitivity (Villagomez et al. 2020). Tento patologický stav se projevuje jako následek nedostatečného působení androgenů během ontogenetického vývoje samce (Welsford et al. 2017). Do současné doby bylo u koní popsáno 5 mutací v genu pro androgenní receptor, které jsou považovány za kauzální. Kromě malého množství studií je problémem také heterogenita fenotypu syndromu, jednotliví jedinci se mohou v projevech značně lišit. U jakékoli poruchy sexuálního vývoje je prvním krokem diagnostiky stanovení genetického pohlaví jedince. Tato práce má za cíl optimalizovat metodu real-time PCR a metodu relativní kvantifikace a využít tyto metody k determinaci pohlaví jedinců včetně jedince trpícího symptomy syndromu androgenní insenzitivity.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Vědecká hypotéza

Diplomová práce je postavena na těchto vědeckých hypotézách:

- Zkoumaný jedinec se symptomy syndromu androgenní insenzitivity je z hlediska karyotypu hřebec s gonozómy XY.
- Na základě bioinformatických dat lze navrhnout vysoce specifické DNA markery lokalizované v homologních a nehomologních oblastech gonozómů X a Y, pomocí kterých lze rozlišit pohlaví jedinců.
- Pomocí relativní kvantifikace lze rozlišit samčí a samičí pohlaví na základě porovnání kvantity amplikonů markerů lokalizovaných na gonozómech s kvantitou amplikonů referenčního autozomálního genu.
- U zkoumaného jedince se nachází mutace v exonu 1 genu pro androgenní receptor (c.1A>G), která je kauzální pro vznik syndromu androgenní insenzitivity.

2.2 Cíle práce

Na základě vědeckých hypotéz byly stanoveny následující cíle práce:

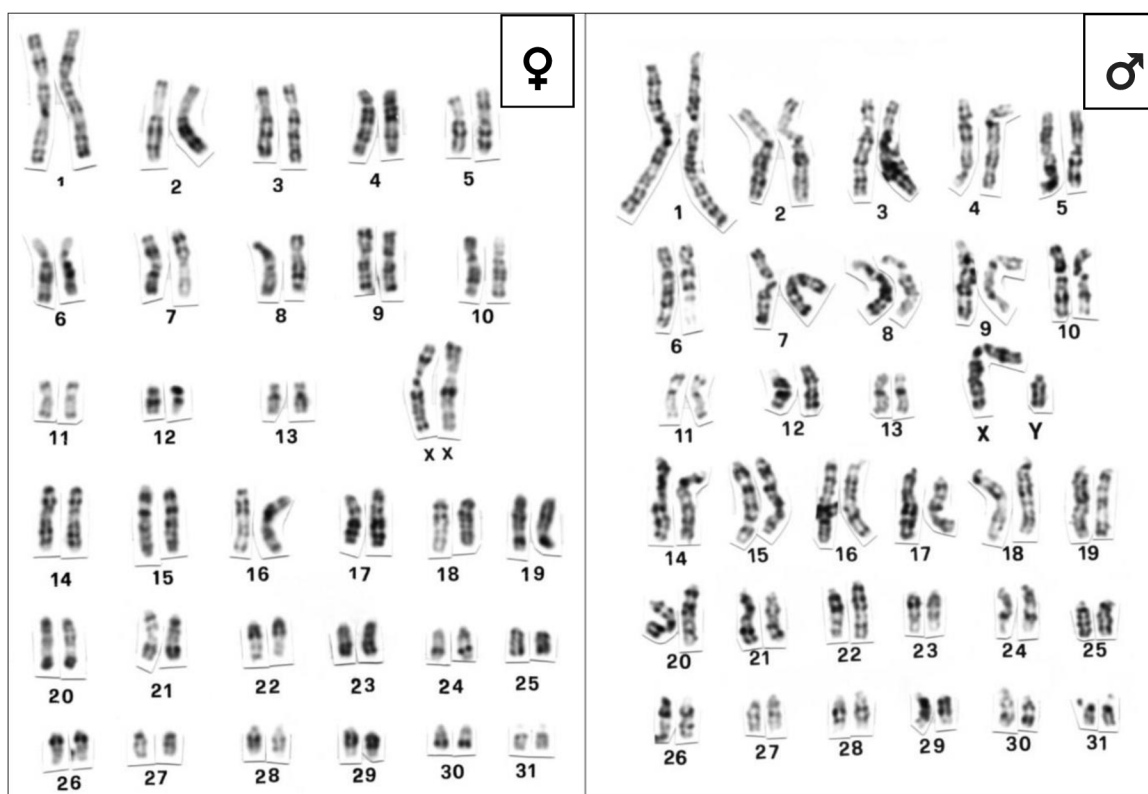
- Ověřit platnost vědeckých hypotéz.
- Zpracovat literární rešerši s využitím odborné vědecké literatury.
- Na základě bioinformatické studie gonozómů X a Y navrhnout specifické markery pro homologní a nehomologní oblasti a pomocí nich identifikovat oba typy gonozómů u jedince se symptomy AIS.
- Na základě bioinformatické studie určit vhodný referenční autozomální gen.
- Pomocí metody relativní kvantifikace provést stanovení počtu kopií markerovaných genů lokalizovaných v různých oblastech gonozómů.
- Prokázat přítomnost kauzální mutace v genu pro androgenní receptor zodpovědné za syndrom AIS.

3 Literární rešerše

3.1 Genom koně

Kůň (*Equus caballus* Linnaeus, 1758) žije po boku člověka od doby jeho domestikace přibližně před 5500 lety. Domestikace koně měla vliv na změnu v mnohých oblastech života člověka, mezi které patří např. doprava, obchod, migrace nebo způsob boje (Gaunitz et al. 2018). V současnosti je moderní společností kůň považován spíše za společníka a je důležitou součástí odvětví volného času. Zájem o prohlubování znalostí ohledně tohoto druhu je velký nejen mezi laickou veřejností, ale i mezi vědci a v posledních letech dosahuje výzkum v oblasti koňského genomu obrovského pokroku (Raudsepp et al. 2019).

Karyotyp koně je tvořen 64 chromozomy. Skládá se z 13 metacentrických autozomálních párů, 18 akrocentrických autozomálních párů a jednoho páru pohlavních chromozomů (Murray 2002). Na obrázku 1 je zobrazeno porovnání karyotypu klisny a hřebce.



Obrázek 1 Porovnání karyotypu klisny (♀) a hřebce (♂) (Iannuzzi et al. 2014)

V roce 2007 byla zveřejněna genomová sekvence koně nazvaná EquCab 2, pro kterou byla využita DNA klisny anglického plnokrevníka Twilight. Jednalo se o první sestavený genom jak mezi koňmi, tak mezi lichokopytníky. Výsledkem sekvenování byla vysoce kvalitní

2,5 miliardy párů bází (Gbp) dlouhá sekvence, která zahrnovala 31 koňských autozomů, chromozom X a mitochondriální genom (Wade et al. 2009).

V roce 2018 byl genom klisny Twilight znovu osekvenován a sestaven a byla představena nová verze referenčního genomu EquCab 3, která doplnila velkou část chybějících dat z předchozí verze (Kalbfleisch et al. 2018). Zároveň byla ve stejném roce publikována první sekvence oblasti specifické pro samce (male-specific region – MSY region) na Y chromozomu (Janečka et al. 2018).

Od první sekvenace koňského genomu se výzkum v oblasti koňské genomiky významně posunul kupředu. Byly popsány některé kauzální mutace pro poruchy způsobené jedním genem, zároveň byl odhalen genetický základ i pro několik komplexních onemocnění (Raudsepp et al. 2019).

3.1.1 Stavba koňského chromozomu Y

Chromozom Y je dosud nejrychleji se vyvíjejícím jaderným chromozomem. Jeho evoluční dynamika a strukturní složitost vedly k tomu, že byl dosud osekvenován pouze u 6 druhů. Sekvenace byla provedena u člověka (Skaletsky et al. 2003), šimpanze, makaka rhesus (Hughes et al. 2012), myši (Soh et al. 2014), prasete (Skinner et al. 2016) a částečně u koně (Janečka et al. 2018). Koňský chromozom Y je velikostně srovnatelný s nejmenšími koňskými autozomy, jeho velikost se pohybuje kolem 40-50 Mbp. Podle pruhování lze říci, že jsou dvě třetiny chromozomu Y heterochromatické. V distální části se nachází malý euchromatický segment, který obsahuje MSY oblast a PAR oblast (Janečka et al. 2018).

3.1.1.1 MSY region u koně

Hlavní část Y chromozomu je část specifická pouze pro samce (MSY region). Tento úsek je haploidní a neúčastní se crossing-overu. Během evoluce došlo v této oblasti k akumulaci pro samce prospěšných genů, které ovlivňují vývoj samčích pohlavních orgánů a plodnost. Velikost de novo sekvenované oblasti MSY v práci Janečka et al. (2018) byla 9 497 449 bp, reálná velikost MSY je odhadována na 12 Mbp. Více než polovina MSY oblasti (54 %) se skládá z různých repetitivních sekvencí. Ze 34 % převládají prvky L1 LINE (long interspersed element-1), což jsou autonomní a aktivní retrotranspozony (Janečka et al. 2018).

Geny nacházející se v MSY oblasti lze rozdělit do tří hlavních kategorií v závislosti na jejich evolučním původu. První kategorií jsou geny, které jsou z velké části shodné s geny

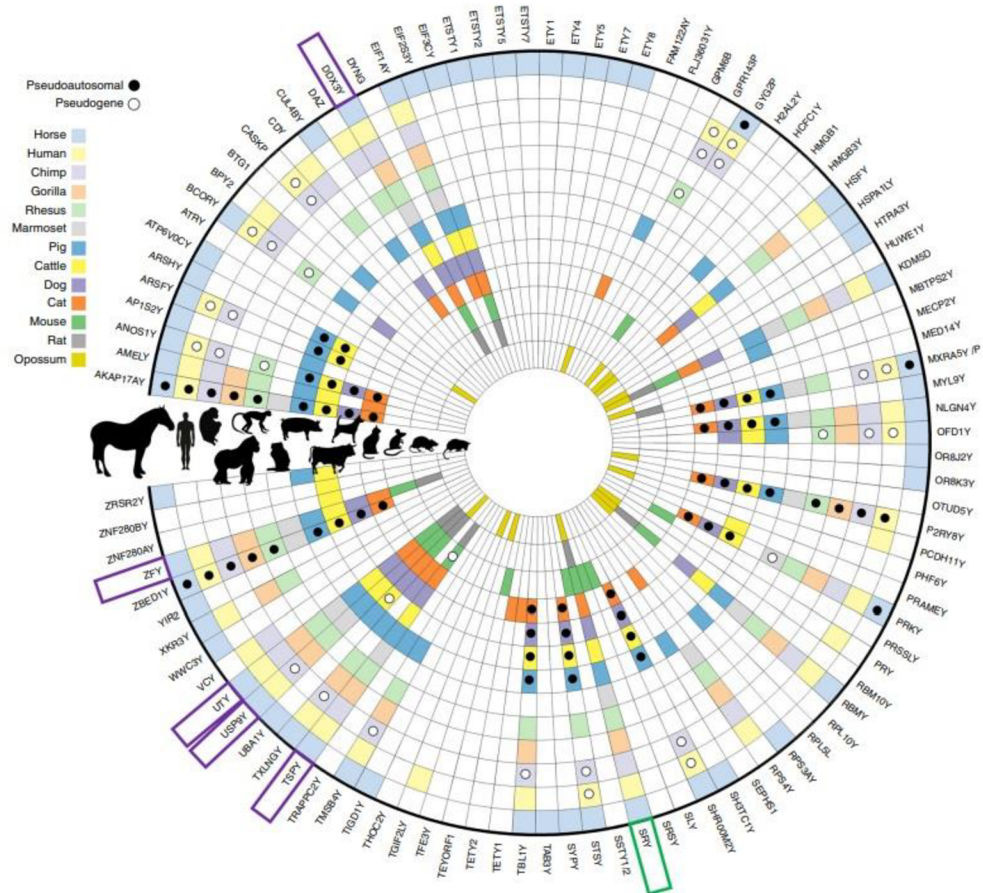
na chromozomu X a bývají označovány jako XY geny, i když mezi nimi nedochází ke crossing-overu. Druhá kategorie zahrnuje transponované geny z autozomálních chromozomů a třetí kategorie obsahuje geny specifické pouze pro Y chromozom (Janečka et al. 2018).

V MSY oblasti koně bylo identifikováno celkem 52 genů. Hustota genů se v této oblasti pohybuje v rozmezí 5,5 – 18,3 genů na Mbp, což je hodnota srovnatelná se spodní hranicí průměrné hustoty genů na autozomech (5,4 – 28,2 genů na Mbp). Z celkového počtu 52 genů se 37 z nich nachází v jedné kopii (single-copy) a 15 genů je amplikonických, představujících dohromady 174 genových kopií. Většina XY genů i autozomálně transponovaných genů se v MSY oblasti nachází ve formě single-copy. Téměř všechny amplikonické (multi-copy) geny jsou umístěny mezi sekvencí 1 000 000 a 4 700 000 bp a jsou charakteristické přítomností velkých počtů identických opakování (Janečka et al. 2018). Porovnání mezi různými druhy ukazuje, že většina multi-copy genů na Y chromozomu je druhově nebo rodově specifická (Paria et al. 2011).

Koňská MSY oblast obsahuje 29 XY genů, což je dosud nejvyšší zaznamenaný počet tohoto typu genů na Y chromozomu v porovnání s ostatními placentály. Dva z těchto genů (*TAB3Y* a *SYPY*) se od svých gametologů odchýlily velmi dávno, cca před 123,5-115,7 miliony lety, a nejsou vázány na Y chromozom u žádného jiného druhu. Tato skutečnost poukazuje na to, že si MSY oblast koní uchovala unikátní sadu genů předků (Janečka et al. 2018).

V MSY oblasti se u koní dále nachází 13 transponovaných genů z různých autozomálních regionů. Většina z nich se v genomu nachází ve formě single-copy a oproti svým paralogům na autozomech obsahují tyto geny snížený počet exonů. Zdá se, že se převážná část autozomálních transpozic udála v průběhu posledních 25 milionů let (Janečka et al. 2018).

Většina genů specifických pouze pro samce se nachází ve formě multi-copy genů (Castaneda et al. 2022). Mezi nejvýznamnější geny specifické pro Y chromozom patří *SRY* gen, který byl jako single-copy vložen mezi repetitivní sekvence. Toto umístění může zvyšovat pravděpodobnost delece *SRY* genu a způsobovat tak poruchy sexuálního vývoje (DSD – disorder of sexual development). *SRY* gen se řadí mezi nejdříve utvářené geny, jeho divergence proběhla přibližně před 170,7 miliony lety (Janečka et al. 2018). Gen *SRY* se nachází v pozici Yq14.1 na Y chromozomu a patří do rodiny SOX (SRY-related HMG box) genů, která zastává důležitou funkci ve vývoji pohlaví savců (Raudsepp et al. 2004).

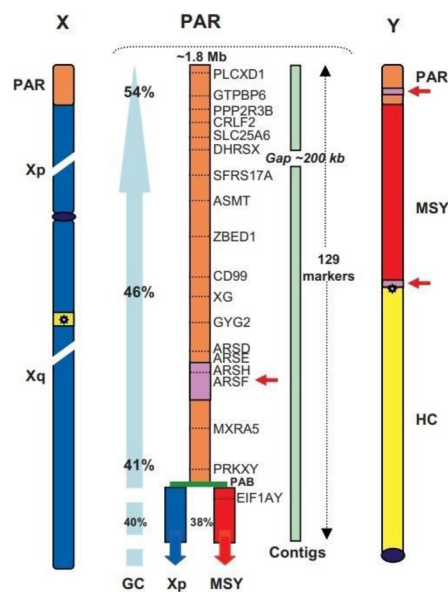


Obrázek 2 Radiální graf zobrazující geny na chromozomu Y u 13 druhů savců. Každý prsteneček označuje jeden druh, kůň je reprezentován nejvzdálenějším prstencem od středu. Barevná políčka odpovídající každému druhu ukazují, zda se u daného druhu gen vyskytuje, bílá tečka označuje pseudogenní stav genu a černá tečka pseudoautozomální (PAR) stav genu. Gen *SRY*, zvýrazněný zeleným rámečkem, se nachází u všech savců. Geny zvýrazněné fialovým rámečkem (*ZFY*, *UTY*, *USP9Y*, *TSPY*, *DOX3Y*) se nacházejí u všech placentálů (Janečka et al. 2018).

3.1.1.2 Pseudoautozomální oblast (PAR)

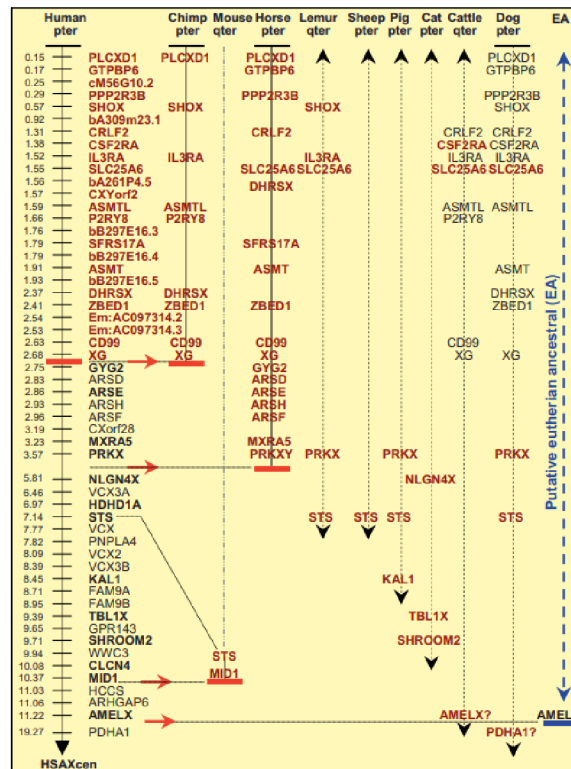
Potlačení možnosti rekombinace mezi X a Y chromozomy vedlo ke ztrátě genů a následné degeneraci chromozomu Y. Rekombinace mezi chromozomy X a Y může probíhat pouze v oblasti společné oběma chromozomům, která se nazývá pseudoautozomální oblast (PAR) (Raudsepp & Chowdhary 2016). Původ pseudoautozomální oblasti je datován přibližně do doby před 80-130 miliony lety (Raudsepp & Chowdhary 2008). Jedná se o oblast sekvenční homologie mezi X a Y chromozomem, která je klíčová pro správné párování a segregaci chromozomů během meiózy. Lokusy, které se nacházejí v PAR oblasti, jsou diploidní a dochází u nich k rekombinaci (Brown & Greally 2003). Úroveň rekombinace je v PAR oblastech nejvyšší z celého genomu (Raudsepp & Chowdhary 2008).

V roce 2008 byla koňská PAR oblast poprvé osekvenována a bylo popsáno její umístění mezi koncovou částí pohlavního chromozomu a tzv. pseudoautozomální hranicí (PAB), která se u koní nachází mezi geny *PRKXY* a *EIF1AY*. Za touto hranicí klesá sekvenční podobnost mezi X a Y chromozomem, ustává rekombinace a začínají oblasti specifické pro samčí a samičí pohlavní chromozom (Obrázek 3). Obsah GC párů je v koňské PAR oblasti nejvyšší směrem k telomerám chromozomů X a Y (54 %) a směrem ke středu PAR oblasti postupně klesá (Raudsepp & Chowdhary 2008).



Obrázek 3 Schéma pohlavních chromozomů s oranžově znázorněnou PAR oblastí. Růžově zvýrazněný proužek označuje sekvenci, která se nachází jak v PAR oblasti na Y chromozomu, tak v regionu specifickém pro samce (MSY oblast) (Raudsepp & Chowdhary 2008).

Velikost PAR oblasti u koně je 1,8 Mbp, což je méně než u člověka (*Homo sapiens*), pravděpodobně kvůli četným repetitívám, které se u člověka nacházejí. Je zajímavé, že kromě genu *DHRSX* se pořadí koňských genů umístěných v PAR oblasti shoduje s pořadím jejich ortologů u lidí. Koňská PAR oblast však navíc obsahuje sedm genů, které už do lidské PAR oblasti nejsou zahrnuty. Jedná se o geny *GYG2*, *ARSD*, *ARSE*, *ARSF*, *ARSH*, *MXRA5*, *PRKX*, které u člověka najdeme v MSY oblasti, jak je možné vidět na obrázku 4 (Raudsepp & Chowdhary 2008).



Obrázek 4 Porovnání genů v PAR oblasti člověka a několika savčích druhů včetně koně (Raudsepp & Chowdhary 2008).

V práci Janečka et al. (2018) byly publikovány rozdílné výsledky. Autoři popisují v PAR oblasti koně pouze pět genů, jedná se o geny *AKAP17Y*, *GYGZP*, *MXRA5Y/P*, *PRKY* a *ZBED1Y* (Obrázek 2). Dále ve své studii tvrdí, že se kvůli poměrně krátké PAR oblasti u koní nachází typické PAR geny ostatních savců jako *TBL1*, *SHROOM2* a *STS21* u koně již v MSY oblasti (Janečka et al. 2018).

3.1.1.3 Duplikace mezi PAR oblastí a MSY oblastí

Jak je patrné z Obrázku 3, na chromozomu Y byl nalezen cca 200 kb velký úsek, který se nachází jak v PAR oblasti, tak v oblasti specifické pouze pro samčí pohlavní chromozom (MSY oblast). Na Obrázku 3 je tato duplikace označena červenými šipkami (Raudsepp & Chowdhary 2008).

Sled událostí, který vedl k duplikaci a následně k přemístění jedné z kopií genu do PAR oblasti zatím nebyl přesně popsán. Je obecně známo, že vysoká frekvence rekombinací a zvýšená míra nerovnoměrného crossing-overu v rámci PAR oblastí mohou vést k duplikacím. Jedná se však o duplikace pouze v rámci PAR oblasti, ne o bloky sdílené mezi PAR a MSY oblastí, jak bylo pozorováno v tomto případě u koní. Jedna z teorií předpokládá, že během

evoluce došlo k nesespecifickému párování nebo nerovnoměrnému crossing-overu a homologní část segmentu z chromozomu X byla transponována na proximální konec MSY. Podle druhé teorie byl region nejdříve duplikován na Y chromozomu a poté byl v průběhu evoluce jeden z duplikátů transponován z MSY oblasti do PAR oblasti (Raudsepp & Chowdhary 2008). Duplikovaná oblast obsahuje geny *ARSFY* a *ARSHY*, průměrná sekvenční identita mezi PAR oblastí a MSY oblastí byla v tomto úseku 98,8 %, což naznačuje, že je transpozice nedávného původu. Pomocí metody FISH bylo zjištěno, že je tato transpozice přítomna i u jiných koňovitých včetně osla (*Equus asinus* Linnaeus, 1758), zebry (*Equus Burchelli* Gray, 1824) a Hartmanovy zebry horské (*Equus zebra hartmannae* Matschie, 1898) (Janečka et al. 2018).

3.1.1.4 Horizontální přenos genu *ETSTY7*

V práci Janečka et al. (2018) byl popsán transkript *ETSTY7* genu, který vykazoval expresi ve varlatech a byl kódován 15 kopiemi genu, společně pokrývajících 50 kb nejproximálnější části MSY oblasti. Velikost každé z kopií, obsahující vždy 3 exony, se pohybovala mezi 2,8 a 5,7 kb. Analýza metodou FISH ukázala masivní amplifikaci PCR produktu v rámci celého heterochromatinu, stejně jako ve fakultativním heterochromatinu Xq17-q21. Předpokládá se, že tato pole jsou potřebná ke stabilizaci obsahu genů a zároveň k ochraně genů řídících spermatogenezi (Janečka et al. 2018).

Amplikonické sekvence genu *ETSTY7* byly detekovány i u jiných koňovitých, ale s odlišnými distribučními vzorci. Odhaduje se, že genová rodina *ETSTY7* byla na X chromozom umístěna po divergenci koňovitých a ostatních kopytníků asi před 52-58 miliony lety, ale zároveň před jejich rozdělením, ke kterému došlo před 4-4,5 miliony lety. Následně byly sekvence amplifikovány a transponovány u koní na Y chromozom a u zeber na Y chromozom a zároveň některé autozomy (Janečka et al. 2018).

Autoři pozorovali sekvenční podobnost genu *ETSTY7* mezi čeledí koňovití a parazitem škrkavkou koňskou (*Parascaris equorum*) (genome assembly GenBank LM462759.1). Pro vyloučení možnosti, že se jedná o kontaminaci hostitelského druhu DNA parazita byly navrženy specifické primery pro sekvenci u koní, jiné pro sekvenci u parazitů a poté pro sdílenou sekvenci. Pouze primery pro sdílenou sekvenci byly amplifikovány u obou organismů, což dokazuje, že se nejednalo o kontaminaci, ale s největší pravděpodobností o horizontální transfer genu. Oblast homologie zahrnovala část intronu mezi exony 2 a 3 a exon 3 s 84-96% sekvenční podobností s několika kontigy v genomu škrkavky (Janečka et al. 2018).

Byly sekvenovány amplikony *ETSTY7* genů z několika parazitů a jejich různých vývojových stádií a byla prokázána 90-95% sekvenční podobnost mezi parazitem *Parascaris*

equorum a čeledi koňovití. Na základě těchto poznatků byl vytvořen fylogenetický strom, kde bylo možné pozorovat mnoho sekvencí původem od škrkavky umístěných na různých místech v rámci celého stromu, což naznačuje, že se horizontální přenos pravděpodobně udál několikrát. Amplifikace a transpozice genu *ETSTY7* v různých liniích koňovitých ukazuje, že se jedná o mobilní a aktivní element, nelze však přesně určit časové období, kdy k přenosu došlo (Janečka et al. 2018).

3.2 Androgenní receptor

3.2.1 Stavba androgenního receptoru

Androgenní receptor (AR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který se řadí do rodiny jaderných receptorů pro steroidní hormony. Mezi další členy rodiny jaderných receptorů pro steroidní hormony patří estrogenový receptor (ER), progesteronový receptor (PR), glukokortikoidní receptor (GR) a mineralokortikoidní receptor (MR) (Davey & Grossmann 2016).

Gen pro AR byl poprvé charakterizován v roce 1988. Nachází se v pozici Xq11-12 na dlouhém raménku chromozomu X a obsahuje 8 exonů. Exony kódují protein o velikosti 110 kDa, který se skládá z více než 900 aminokyselin. Velikost genu je díky polymorfismům v 1. exonu velmi variabilní (Chang et al. 1988).

Jak je možné vidět na Obrázku 5, obsahuje AR, stejně jako jiné jaderné receptory, tři funkční domény. Jedná se o N-koncovou doménu (NTD), DNA-vazebnou doménu (DBD) a C-koncovou ligand-vazebnou doménu (LBD). Mezi DBD a LBD je umístěna krátká pantová oblast (Zhou et al. 2022).

N-koncová doména (NTD), známá také jako oblast aktivace transkripce nebo transaktivační doména, hraje klíčovou roli v transkripci cílových genů. Zaujímá přibližně polovinu velikosti genu pro AR a její hlavní úlohou je přenos signálu na iniciační místo transkripce (Jenster et al. 1995). Je kódována exonem 1 a obsahuje jednu z identifikovaných transkripčních aktivačních oblastí (AF-1), která je nezbytná pro správné fungování AR a úzce interaguje s AF-2 nacházející se v LBD oblasti (Davey & Grossmann 2016).

NTD obsahuje dva úseky tvořené repetitivy aminokyselin glutaminu a glycinu. Tyto repetice jsou polymorfny, což znamená, že se jejich počet u jedinců v rámci populace liší (Zhou et al. 2022). Pokud se v oblasti nachází vyšší počet repetic, dochází ke snížení transaktivační aktivity AR, naopak při nižším počtu repetic vykazuje AR zvýšenou aktivitu. Pokud dojde

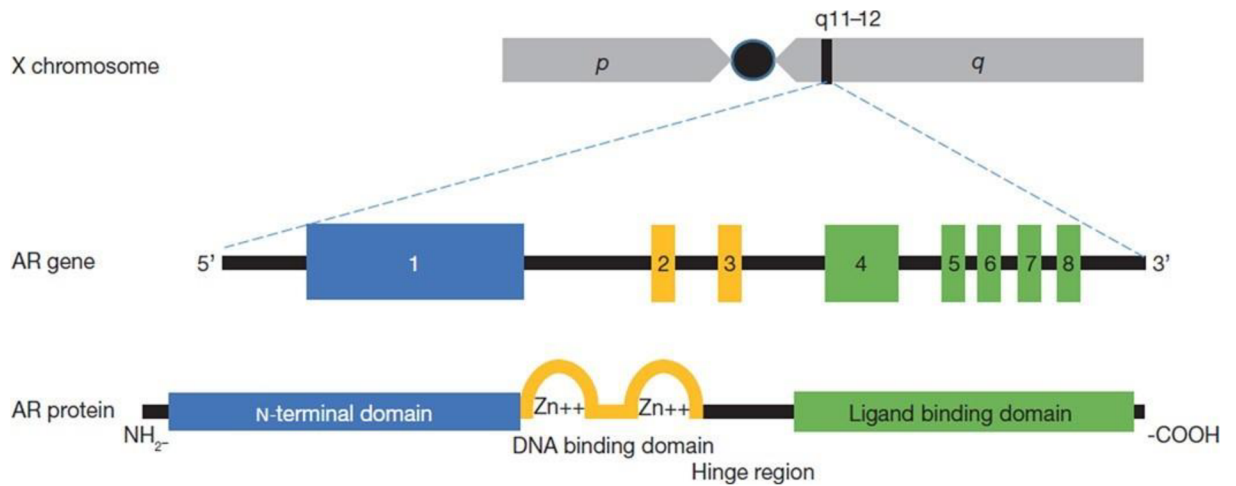
v této oblasti k deleci, může to vést až ke čtyřnásobnému zvýšení aktivity mutovaného androgenního receptoru v porovnání s normálním receptorem (Callewaert et al. 2003).

Na NTD oblast navazuje DNA-vazebná doména (DBD), která patří mezi nejvíce konzervované oblasti v rámci celé rodiny jaderných receptorů pro steroidní hormony. Je kódována exony 2, 3 a částečně 4 a typicky obsahuje motiv tzv. zinkových prstů. Jedná se o dva komplexy (N-koncový a C-koncový), které jsou tvořeny čtyřmi cysteinovými zbytky vázajícími v sobě zinkový iont (Davey & Grossmann 2016). Tato oblast je klíčová pro rozpoznání a vazbu receptoru do specifické oblasti na DNA známé jako androgen-responzivní elementy (ARE, androgen responsive elements) (Shaffer et al. 2004; Davey & Grossmann 2016). První zinkový prst je přímo zodpovědný za vazbu s ARE, zatímco druhý zinkový prst stabilizuje celý komplex a usnadňuje dimerizaci AR, jelikož při steroidní regulaci transkripce obvykle nasedá AR jako homodimer (AR/AR) (Härd et al. 1990; Shaffer et al. 2004).

Za DBD se nachází krátká pantová oblast neboli hinge region (H). Tato oblast obsahuje tzv. jaderný lokalizační signál (NLS, nuclear localization signal), který napomáhá přenosu proteinu z cytoplazmy do jádra. Dále obsahuje jaderný exportní signál (NES, nuclear export signal), který je potlačen v přítomnosti ligandu, ale po jeho disociaci napomáhá přesunu AR zpět do cytoplazmy (Tan et al. 2015).

C-koncová ligand-vazebná doména (LBD) je kódována částí exonu 4 a exony 5-8. Struktura LBD se skládá z 11 alfa šroubovic, dvou antiparalelních beta skládaných listů a centrálního vazebného místa pro androgen (Shaffer et al. 2004). V této oblasti se také nachází druhá z transkripčních aktivačních oblastí (AF-2), což je hydrofobní oblast na povrchu receptoru, která interaguje s AF-1 v NTD. Mutace či delece v této oblasti významně snižují transkripční aktivitu v odpovědi na ligand (Davey & Grossmann 2016). Po navázání ligandu dochází ke konformačním změnám, vytvoří se vazebná kapsa překrývající ligand a dojde tak ke stabilizaci celého komplexu (Shaffer et al. 2004; Zhou et al. 2022).

LBD hraje esenciální roli ve vazbě ligandů, přičemž právě vazba androgenů na AR je klíčová pro aktivaci receptoru. Jakékoli poškození nebo variace v této oblasti obvykle vedou k nemožnosti navázání androgenů na AR a tím ke ztrátě funkce receptoru (Davey & Grossmann 2016). Pokud se protein nachází volně v cytoplazmě bez přítomnosti ligandů, jsou do této oblasti vázány proteiny teplotního šoku (HSP, heat-shock proteins), které udržují AR v optimální konformaci pro navázání ligandů a zároveň zabraňují jeho degradaci proteolytickými enzymy. Po navázání ligandu dojde k disociaci HPS a následně k přemístění AR do jádra (Zoubeidi et al. 2007).

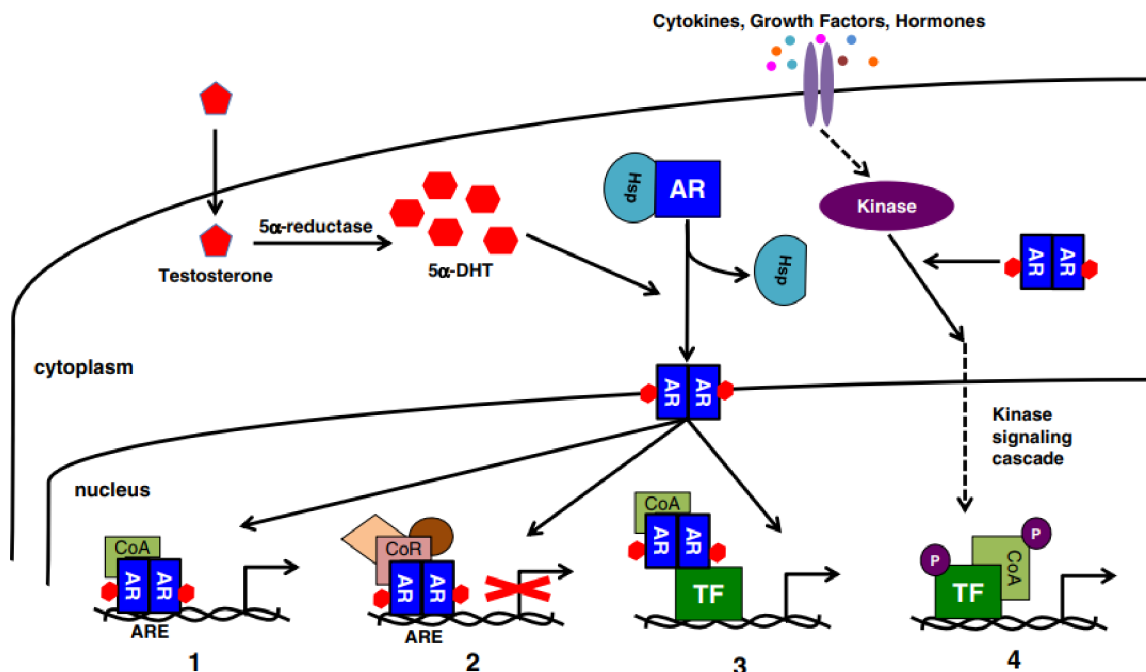


Obrázek 5 Struktura genu pro androgenní receptor a vznikajícího proteinu (Proverbs-Singh et al. 2015).

3.2.2 Princip fungování androgenního receptoru

Jak bylo zmíněno výše, v nepřítomnosti ligandu se AR nachází volně v cytoplasmě. Je udržován v neaktivní formě vázaný v heterokomplexu s proteiny teplotního šoku a ostatními chaperony. Molekulární chaperony se účastní procesů jako je skládání, aktivace, komunikace a regulace transkripční aktivity u většiny steroidních hormonů (Zoubeidi et al. 2007).

Podle Shafi et al. (2013) existují čtyři různé možnosti, jak může AR v buňce působit (Obrázek 6).



Obrázek 6 Schéma působení AR v buňce (Shafi et al. 2013).

V prvním případě (1) 5 α -dihydrotestosteron (DHT), který se váže do LBD způsobí konformační změny vedoucí k disociaci chaperonových proteinů a expozici NLS. Komplex androgen-AR se přemístí do jádra, kde dimerizuje a váže se na ARE cílových genů. Transkripční aktivita AR s navázanými androgeny je regulována specifickými proteiny známými jako koregulátory. Koregulátory se vážou na aktivovaný AR a svou aktivitou vedou k zesílení (koaktivátory) nebo potlačení (koregulátory) transaktivace exprese cílových genů (Zoubeidi et al. 2007; Davey & Grossmann 2016). Bylo popsáno více než 150 proteinů, které se chovají jako koregulátory AR (Heemers & Tindall 2007). Patří mezi ně p160 rodina, p300/CBP, ARA54, ARA55 a ARA70 a mnoho dalších proteinů. Mnohé z koregulátorů jsou enzymy (histonové acetyltransferázy, metyltransferázy a kinázy), které působí na rozvolňování chromatinové struktury a usnadňují tak transkripci. Koregulátory jsou nezbytné pro účinnou regulaci transkripce cílových genů, proto mohou mutace v koregulátorech vést ke změnám v aktivitě AR a také způsobovat poruchy v cílových tkáních (Wang et al. 2005). Tento proces, kdy se po přesunu do jádra dimer AR váže na konsenzuální vazebnou sekvenci DNA a zároveň dochází k vazbě koregulátorů a k aktivaci transkripce, je jednou z nejlépe popsaných drah působení AR v buňce (Shafi et al. 2013).

Další možností je nasedání korepresorů (2) na AR, což může vést až k inhibici transkripce. Korepresory mohou bránit vazbě AR na DNA působením na DBT (např. kalretikulín, DJBP, ARR19) nebo ovlivňovat ostatní části AR (např. PAK6, RACK1, HDAC1). Zároveň mohou korepresory působit i přes ovlivnění koaktivátorů a zabráňovat tak jejich interakci s AR (Wang et al. 2005).

Dále (3) může AR ale regulovat transkripci interakcí s jinými transkripčními faktory cestou nezávislou na vazbě DNA (Shafi et al. 2013).

Poslední možností působení AR (4) je tzv. mimojaderná signalizace. V tomto případě aktivovaný AR není transportován do jádra, ale interaguje s kinázami (AKT, Src), což vede k aktivaci kinázové kaskády. Kinázová kaskáda pak může aktivovat další transkripční faktory bez nutnosti přímé vazby AR na cílový gen (Shafi et al. 2013; Davey & Grossmann 2016).

3.2.3 Ligandy

Pro správné fungování AR je klíčová vazba ligandu do LBD. Ligandy mohou být děleny na agonisty a antagonisty na základě jejich schopnosti aktivovat/inhibovat transkripci cílových genů. Mezi hlavní agonisty, které se váží na AR, patří androgeny testosteron a 5 α -dihydrotestosteron (DHT). Jedná se o samčí pohlavní hormony potřebné pro vývoj samčího reprodukčního systému a sekundárních pohlavních znaků. Testosteron je primárně syntetizován

z cholesterolu v Leydigových buňkách ve varlatech, dále je v menší míře produkován kůrou nadledvin, játry a vaječníky. Kromě AR testosteron reaguje i s dalšími steroidními receptory jako je progesteronový a estrogenový receptor (Lindzey et al. 1994; Gao et al. 2005).

Testosteron může být v prostatě, kůži a játrech přeměňován na svou biologicky aktivnější formu, DHT, pomocí 5 α reduktázy. Malé množství testosteronu (0,2 %) může být také přeměněno na estradiol pomocí aromatázy, k čemuž dochází převážně v tukové tkáni. Oba způsoby metabolismu testosteronu jsou ireverzibilní procesy (Gao et al. 2005). DHT je biologicky aktivnější než testosteron a váže se na AR s dvakrát vyšší afinitou. Zároveň má až pětkrát menší rychlost disociace ve srovnání s testosteronem (Davey & Grossmann 2016).

Mezi antagonisty se řadí hormony steroidní i nesteroidní povahy, které soupeří s androgeny o místo ve vazebné doméně AR. Jedná se především o syntetické ligandy využívané v klinické praxi např. pro léčbu rakoviny prostaty. Mezi běžně využívané syntetické ligandy patří 17 α -metylt testosteron, propionát nebo bikalutamid (Gao et al. 2005).

3.3 Poruchy sexuálního vývoje – DSD

V roce 2006 přijala medicína k popisu všech intersex, hermafroditních a pseudohermafroditních stavů u člověka označení DSD (disorders of sexual development) neboli poruchy sexuálního vývoje. Poruchy sexuálního vývoje zahrnují vrozené stavy, které jsou charakteristické atypickým vývojem chromozomálního, gonadálního nebo anatomického pohlaví (Lee et al. 2006). Pro domácí zvířata zatím není přítomný analogický konsenzus v názvosloví, proto jsou jedinci, kteří vykazují atypický sexuální vývoj, obvykle zařazováni do jedné ze tří skupin hermafroditismu. Jedná se o pravý hermafroditismus, u těchto jedinců jsou přítomna varlata i vaječníky, samčí hermafroditismus, kde je přítomna testikulární tkáň u jedince, který vykazuje samičí fenotyp a samičí hermafroditismus, u kterého je přítomná vaječnicková tkáň u jedinců se samčím fenotypem. U domácích zvířat je také často používán termín „sex reversal“, který zahrnuje širokou škálu vývojových a pohlavních abnormalit (Monteiro da Silva et al. 2020).

Počátek výzkumu v oblasti DSD u koní se datuje do 70. let 20. století. V této době byla využívána karyotypizace barvených chromozomů pro zjištění jejich morfologie nebo abnormálního počtu (Richer et al. 1990). Nebylo však možné potvrdit či vyvrátit přítomnost Y chromozomu, dokud nebyly vyvinuty metody chromozomového pruhování. Až díky využití Southern blottu s lidskými sondami pro gen *SRY* byl odhalen první případ koně s genotypem XY *SRY* negativní (Pailhoux et al. 1995). Později byly navrženy i první specifické primery pro označení *SRY* negativních klisen (Mäkinen et al. 1999).

V posledních desetiletích bylo u koní provedeno mnoho molekulárních studií, na základě kterých byly identifikovány 4 obecné typy DSD. Jedná se o 63 XO; 64 XX SRY negativní; 64 XY SRY pozitivní a 64 XY SRY negativní. Po monosomii X chromozomu (63 XO) patří u koní porucha jedinců se samičím fenotypem a karyotypem 64 XY, označována také jako syndrom androgenní insenzitivity, mezi nejčastěji se vyskytující poruchy sexuálního vývoje (Raudsepp et al. 2010).

3.3.1 Syndrom androgenní insenzitivity u koní

Syndrom androgenní insenzitivity (AIS) je výsledkem disfunkce androgenního receptoru a je častou příčinou poruch pohlavního vývoje (Mongan et al. 2015). Tento syndrom byl velmi dobře zmapován jak u lidí, tak u domestikovaných koní. Jedná se o recesivně dědičné onemocnění s vazbou na chromozom X, postižení jedinci jsou charakterizováni samičím fenotypem a samčím karyotypem 64, XY SRY pozitivní. Fenotyp AIS do jisté míry závisí na stupni aktivity reziduálního androgenního receptoru. Mezi jedinci je pozorována velká fenotypová heterogenita, fenotyp jedinců XY se může pohybovat od femininních až po velmi maskulinní jedince (Villagómez et al. 2011; Welsford et al. 2017). SRY pozitivní jedinci mají často větší tělesné proporce, zvýšenou hladinu testosteronu v krvi, abnormální vnější genitálie a různé stupně gonadální dysgeneze. Dále bývají přítomny známky chování podobného hřebčimu jako je shánění stáda s hlavou u země, naskakování na klisny v říji nebo agresivita vůči ostatním hřebcům (Raudsepp et al. 2010).

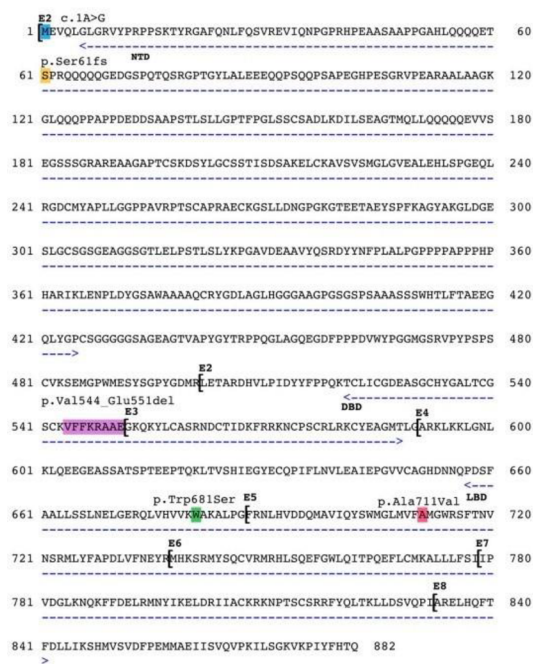
Příčinou tohoto syndromu je mutace v genu pro androgenní receptor, který kóduje cytoplazmatický receptorový protein zodpovědný za zprostředkování maskulinizace a virilizace během vývoje jedince. Mutace v genu pro AR má za následek různé stupně androgenní rezistence a způsobuje většinu forem samčí neplodnosti (Welsford et al. 2017). Ačkoli u lidí bylo do současnosti popsáno více než 1000 mutací způsobujících syndrom androgenní insenzitivity, u koní je výzkum týkající se molekulární podstaty AIS omezen pouze na několik studií.

Révy et al. (2012) popsali vzácný typ patogenní varianty ve start kodonu (c.1A>G), která vedla k úplné androgenní rezistenci u tří členů rodiny plemene americký quarter horse.

V práci Bolzon et al. (2016) byla identifikována missense mutace v exonu 4 (c.2042G>C) u členů rodiny plnokrevníků Thor. Předpokládá se, že tato mutace vede k substituci vysoce konzervovaného tryptofanového zbytku serinem v C-koncové ligand vázající doméně androgenního receptoru.

Welsford et al. (2017) ve své studii popsali 25 nt dlouhou delecii v exonu 2 (c.1630_1654del) u teplokrevných koní, která pravděpodobně vede ke zkrácení proteinu a nepříznivým změnám ve vazebné kapacitě receptoru.

Villagomez et al. (2020) prezentovali další dvě mutace, které by mohly způsobovat syndrom androgenní insenzitivity. V prvním případě se jedná o delecii jednoho nukleotidu (c.183del), která vede k posunu čtecího rámce a k předpokládanému zkrácení proteinu a předčasnému ukončení translace na pozici 452. Tato delece se nachází v místě jedné z několika serinových fosforylací v androgenním receptoru. Mutace ovlivňuje Ser61 koňského androgenního receptoru, který je u lidí konzervován jako Ser83. Ser83 je jedno z největších stechiometrických fosforylačních míst v lidském androgenním receptoru a značně ovlivňuje jeho funkci. U lidí byl pozorován stejný případ 10 nt dlouhé delece, kterou popsali Audi et al. (2010). U dvou ovlivněných jedinců nebyla v laboratorních testech prokázána žádná substrát-vázající aktivita androgenního receptoru. Tato varianta vedla ke stejnému posunutí čtecího rámce a předčasnému ukončení translace jako u případu klisny v práci Villagomez et al. (2020), z čehož autoři usuzují, že varianta c.183delT může být považována za patologickou i u koní. U druhého jedince byla nalezena rozdílná sekvenční varianta (c.2132C>T), která vedla k záměně kodonu GCC za kodon GTC. Tato varianta genu způsobuje missense změnu aminokyseliny alaninu na valín (Ala711Val). Missense varianta genu se nacházela v exonu 5, což je část ligand-vázající domény (LBD). Tato velmi konzervovaná proteinová doména je zodpovědná za děje související s vazbou androgenů, jejich aktivací a dimerizací, proto je pro správnou funkci AR stěžejní. U lidí bylo nejvíce missense mutací popsáno právě v LBD doméně (Villagomez et al. 2020).



Obrázek 7 Patogenní varianty v genu pro androgenní receptor u koní. Funkční domény jsou znázorněny šipkami, NTD = N-koncová doména, DBD = DNA-vázací doména, LBD = ligand-vázací doména. Exony jsou popsány jako E1-E8 (Villagomez et al. 2020).

3.3.2 Syndrom androgenní insenzitivity u lidí

Historicky byl AIS známý pod různými jmény jako Morrisův syndrom (Morris 1953), Rosewaterův syndrom (Rosewater 1965) nebo Aimanův syndrom (Aiman et al. 1979). Různá jména poukazují na rozdíly ve fenotypech pacientů, proto dlouho panoval mezi lékaři názor, že jsou poruchy způsobeny odlišnou etiologií. Teprve rozbor rodokmenů rodin s recidivující patologií a také pokrok v molekulární diagnostice odhalil, že se syndrom androgenní insenzitivity vyznačuje různými fenotypovými projevy, které reflektují různé mutace v genu pro androgenní receptor (Gulía et al. 2018).

U lidských pacientů může být syndrom androgenní insenzitivity podle klinických nálezů a projevů poruchy dělen na kompletní syndrom androgenní insenzitivity (CAIS), syndrom částečné androgenní insenzitivity (PAIS) a mírný syndrom androgenní insenzitivity (MAIS).

Mírná forma AIS (MAIS) se u pacientů s normálním mužským vzhledem může projevit defektem spermatogeneze, redukcí sekundárního ochlupení nebo zvětšením prsních žláz. U pacientů s částečnou androgenní insenzitivitou (PAIS) většinou nejsou vnější genitálie plně maskulinizované, bývá přítomen mikropenis, androgenní insenzitivita však není dostatečně silná na to, aby způsobila úplnou feminizaci jedince. U jedinců s CAIS se objevuje plně vyvinutý feminní fenotyp s typickými ženskými vnějšími genitáliemi. CAIS fenotyp je spojen

s mutací genu pro androgenní receptor, která zcela naruší funkci receptoru a cílové buňky tak nereagují na testosteron ani DHT (Hughes et al. 2012; Gulia et al. 2018).

Do současnosti bylo popsáno více než 1000 mutací v genu pro androgenní receptor, které jsou spojovány s AIS. Mutace, které vedou k CAIS a PAIS, se většinou nacházejí v LBD oblasti a mutace spojené s MAIS jsou obvykle lokalizovány v NTD oblasti. Mutace v DBD oblasti bývají velmi vzácné ve všech fenotypech AIS. Byly popsány také mutace způsobené posunem čtecího rámce nebo alternativním sestřihem intronů. Mezi pacienty s PAIS bylo 93,8 % mutací kategorizováno jako missense mutace a 68,8 % mutací bylo lokalizováno v LBD oblasti (Mongan et al. 2015). U lidských pacientů zahrnuje léčba syndromu androgenní insenzitivity primárně angioplastiku zevního genitálu a hormonální léčbu (Zhou et al. 2022).

3.4 Metody analýzy využívané v diagnostice AIS

3.4.1 Real-Time PCR/qPCR

Kvantitativní PCR v reálném čase je molekulární metoda umožňující specifickou a reprodukovatelnou kvantifikaci nukleových kyselin. Tato metoda umožňuje detekci i velmi malého množství výchozí DNA (Heid et al. 1996). Při konvenční PCR se amplifikovaný produkt DNA detekuje po skončení analýzy pomocí elektroforézy, naopak při real-time PCR se kumulace amplifikovaného produktu měří v průběhu reakce v reálném čase a kvantifikace produktu se provádí po každém cyklu (Seifi et al. 2012).

Hlavní výhodou PCR v reálném čase oproti běžné PCR je, že umožňuje s vysokou přesností stanovit počáteční počet kopií templátové DNA. Data z real-time PCR lze navíc vyhodnotit i bez gelové elektroforézy, což vede ke zkrácení času potřebného k interpretaci výsledků (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006).

3.4.1.1 Primery

Úspěšná reakce PCR v reálném čase vyžaduje účinnou a specifickou amplifikaci produktu. Pro správný průběh reakce je třeba věnovat pozornost jak výběru vhodné cílové sekvence, tak navržení primerů. K tomuto účelu je k dispozici řada volně i komerčně dostupných softwarových programů. Mezi volně dostupné programy se řadí např. Primer3, který byl použit i pro účely této práce (Rozen & Skaletsky 1999).

Primery jsou krátké oligonukleotidy, které z obou stran ohraničují cílovou sekvenci určenou pro amplifikaci. Jejich velikost by se měla pohybovat v rozmezí od 18 do 30 nukleotidů s obsahem GC bází 50-60 %. Kratší sekvence primerů by nemusely být specifické a mohlo by

docházet k sekundární hybridizaci (Dieffenbach et al. 1993). Je třeba, aby u primerů nedocházelo ke komplementaritě zejména na 3' konci a tím ke vzniku primer-dimerů. Teplota tání (T_m), která slouží ke kontrole vzniku nespecifických produktů, by se měla pohybovat v rozmezí 50 až 65 °C (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006). Jedná se o teplotu, při které dochází k rozvolnění vodíkových můstků mezi primery a molekulou DNA, pokud by byla vyšší, mohlo by dojít k sekundárnímu annealingu (Dieffenbach et al. 1993; Seifi et al. 2012).

Ideální velikost cílového amplifikovaného produktu by se měla pohybovat v rozmezí 75-200 bp. Kratší amplikony se nedoporučují z důvodu snadné záměny s primery-dimery, které mohou při reakci vznikat. Amplikony by neměly tvořit sekundární strukturu ani obsahovat více než 4 opakování jednotlivých bází za sebou (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006).

Reakční směs pro real-time PCR se skládá ze stejných komponent jako směs pro klasickou PCR. Obsahuje DNA polymerázu, primery, všechny čtyři typy nukleotidů, reakční pufr, hořčičnaté ionty, fluorescenční molekuly a vodu (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006).

3.4.1.2 Průběh reakce

Technologie real-time PCR funguje stejně jako klasická PCR. Princip metody je založen na replikaci nukleových kyselin, pomocí cyklicky se opakujících základních kroků je možné vytvořit velké množství kopií specifického úseku DNA (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006).

Amplifikace specifických částí DNA probíhá pomocí enzymu polymerázy DNA, nejčastěji se využívá termostabilní Taq-polymeráza, která je izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (Brock & Freeze 1969). Jedná se o enzym, který má klíčové vlastnosti potřebné pro úspěšnou PCR reakci. Taq-polymeráza má schopnost vytvářet nová vlákna DNA pomocí DNA templátu a primerů a zároveň je odolná vůči teplotě. Druhá vlastnost je nezbytná, protože po každém cyklu kopírování DNA musí být výsledná dvouřetězcová DNA rozdělena na jednotlivá vlákna pomocí vysoké teploty (Valasek & Repa 2005).

Rozpad vodíkových můstků a disociace dvouvláknové molekuly DNA na dvě jednovláknové molekuly je označován jako denaturace. Denaturace probíhá většinou při 95 °C, doba trvání je specifická, obvykle se jedná o desítky sekund (Lorenz 2012). Následuje ochlazení reakce na 50-60 °C, aby mohlo dojít k nasednutí oligonukleotidových primerů na jednovláknovou templátovou DNA, tento proces se označuje jako annealing. Ideální teplota pro nasedání primerů je ovlivněna délkou, sekvencí i množstvím primerů v reakci (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006). Po nasednutí primerů dochází k opětovnému zvýšení teploty na 65-75 °C a aktivaci Taq-polymerázy, která funguje nejlépe při 72 °C. Posledním krokem je elongace, která spočívá v prodlužování primerů přidáváním komplementárních volných nukleotidů

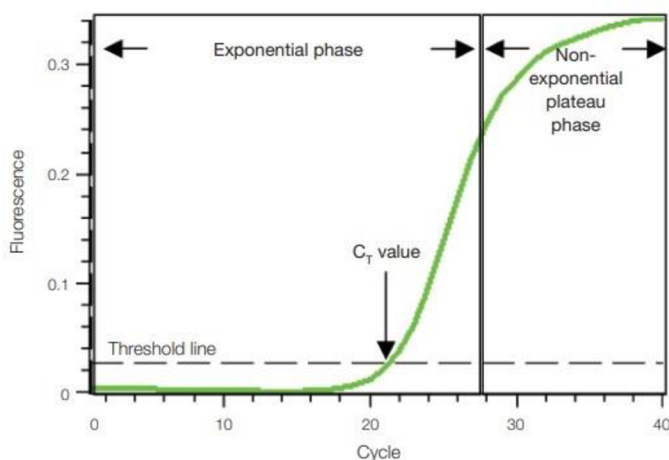
pomocí DNA polymerázy, čímž dochází k vytvoření nového vlákna DNA (Valasek & Repa 2005; Arya et al. 2014). Tyto tři kroky se cyklicky opakují, obvyklý počet opakování je 25-35 cyklů. Pokud reakce funguje s dokonalou účinností, množství produktu PCR se během každého cyklu zdvojnásobí (Bio-rad Laboratories, Inc. 2006).

3.4.1.3 Kinetika reakce

Detekce produktů PCR v reálném čase je umožněna tím, že reakce obsahuje fluorescenční molekuly, které hlásí nárůst množství DNA úměrným nárůstem fluorescenčního signálu. Mezi metody detekce patří barviva vázající DNA (jako např. SYBR Green I) a fluorescenčně značené sekvenčně specifické primery nebo sondy (Arya et al. 2014).

Na Obrázku 8 je zobrazen graf, který reprezentuje průběh real-time PCR. Reakce je rozdělena na fázi exponenciální a na fázi neexponenciální neboli plató fázi. Během exponenciální fáze se množství PCR produktu v každém cyklu přibližně zdvojnásobí, postupně však dochází ke spotřebování reakčních složek. Když se některá z potřebných komponent zcela vyčerpá, reakce se zpomalí a přechází do fáze plató, obvykle mezi 28-40 cyklem (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006).

Z počátku signál fluorescence nelze odlišit od signálu pozadí, i když množství produktu roste exponenciálně. V momentě, kdy se nahromadí dostatečné množství amplifikovaného produktu, vzniká detekovatelný signál. Hodnota takového cyklu je označována jako prahový cyklus neboli C_T a je určována především množstvím templátu přítomného na počátku reakce. Pokud do reakce vstupuje velké množství templátu, bude k amplifikaci potřeba menší počet cyklů než při malém počátečním množství DNA (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006).



Obrázek 8 Amplifikační graf zobrazující průběh real-time PCR. Na ose X je zobrazen počet cyklů, na ose Y je vynesena míra fluorescence (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006).

3.4.1.4 Interpretace výsledků

Kvantitativní PCR v reálném čase je také známá jako analýza qPCR. Existují dvě možnosti kvantifikace výsledků qPCR.

Absolutní kvantifikace spočívá v určení skutečného počtu kopií nukleové kyseliny v daném vzorku. To vyžaduje nejprve sériově zředěné standardy o známých koncentracích pro vytvoření standardní křivky. Standardní křivka vyjadřuje lineární vztah mezi C_T a počátečním množstvím nukleové kyseliny v reakci (Seifi et al. 2012). Hodnoty C_T u testovaných vzorků je možné porovnávat se standardní křivkou a na základě toho určit množství nukleové kyseliny v daném vzorku (Valasek & Repa 2005; Arya et al. 2014).

Pro přesnou a spolehlivou kvantifikaci je klíčové, aby byla určena eficeence reakce. Eficeence neboli účinnost reakce se vypočítá ze sklonu standardní křivky pomocí vzorce:

$$E = 10^{-1/\text{sklon}}$$

V ideálním případě poroste množství produktu PCR během každého cyklu exponenciálně, což znamená, že dojde ke dvojnásobnému nárůstu počtu kopií s každým cyklem. Eficeence reakce by v tomto případě byla rovná 2. Optimální sklon standardní křivky je -3,32, rozpětí hodnot přijatelné v experimentech je uváděno od -3,6 do -3,1. Ideální účinnost proběhlé reakce se pohybuje v rozmezí 90 až 110 %. Koeficient determinace (R^2), by měl být vyšší než 0,98 (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006).

Oproti absolutní kvantifikaci měří relativní kvantifikace změny v ustálených hladinách požadovaného genu ve vztahu k referenčnímu genu. Referenční gen je takový, jehož hladina je konstantní ve všech testovaných vzorcích a u kterého se nepředpokládá změna exprese během experimentu (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006). Jako vhodné referenční geny slouží houskeepingové geny, které jsou syntetizovány všemi jadernými buňkami v těle. Mezi nejčastěji využívané referenční geny se řadí např. beta-aktin nebo beta-tubulin (Lemma et al. 2016). Protože není známé absolutní množství kontrolního genu, lze u tohoto typu kvantifikace zjistit pouze relativní změny exprese. To ovšem nemusí znamenat problém, protože v mnoha případech může být násobná změna exprese pro experiment dostatečně informativní (Valasek & Repa 2005).

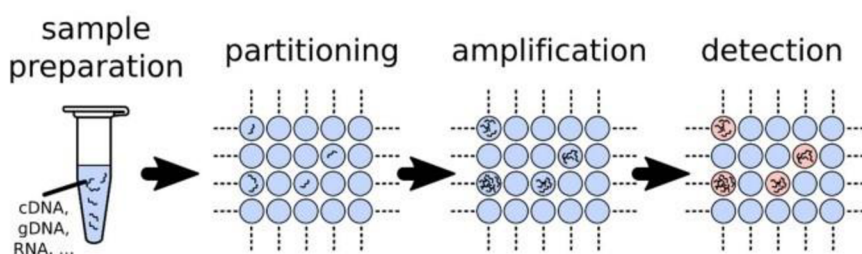
3.4.2 Dropletová digitální PCR

Dropletová digitální PCR (ddPCR) je metoda, která pracuje na principu absolutní kvantifikace sekvencí nukleových kyselin. Umožňuje citlivou a specifickou detekci jednotlivých templátových molekul, zároveň je méně citlivá k inhibici než klasická PCR.

Metoda ddPCR je využívána v mnoha oblastech genetiky, kromě absolutní kvantifikace počtu molekul DNA slouží např. k detekci vzácných mutací, zjišťování genové exprese, analýze mikroRNA nebo zaznamenávání editací v genomu (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2012).

3.4.2.1 Průběh reakce

Princip kvantifikace pomocí ddPCR spočívá v rozdělení reakční směsi do mnoha nezávislých dílčích oddílů. Rozdělení probíhá na základě Poissonova rozdělení a každý z oddílů obsahuje několik, jednu nebo žádnou cílovou sekvenci DNA (Obrázek 9). V každém oddíle pak probíhá amplifikace samostatně a oddíly obsahující amplifikované cílové sekvence jsou detekovány fluorescencí (Quan et al. 2018).



Obrázek 9 Schematicky znázorněný princip ddPCR (Quan et al. 2018).

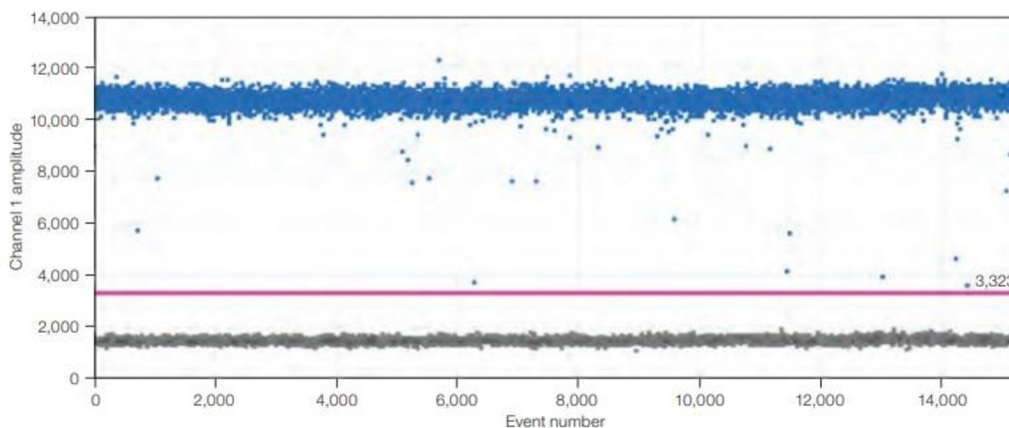
K separaci jednotlivých molekul DNA dochází pomocí tvorby dropletů. Před provedením PCR reakce je vzorek s reakční směsí smíchán s olejem a chemicky aktivními látkami pro stabilizaci reakce. V generátoru kapének pak probíhá emulgace vzorku, při které dochází k rozdělení směsi do 20 000 nanolitrových kapének. Kapénky jsou přeneseny na 96jamkovou PCR destičku a následuje amplifikace v klasickém termocykleru. Po proběhlé amplifikaci je destička přesunuta do čtečky kapek, která je schopná analyzovat přítomnost pozitivních dropletů (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2012; Fialová et al. 2019).

3.4.2.2 Detekce produktů

Klíčový rozdíl mezi qPCR a ddPCR spočívá ve způsobu hodnocení původního množství cílové sekvence DNA ve vzorku. V qPCR je reakce monitorována během procesu amplifikace a kvantifikace je založen na analýze fluorescenčního signálu v exponenciální fázi reakce. Naproti tomu ddPCR detekuje fluorescenční signály až po skončení reakce na základě zobrazovacího softwaru (Quan et al. 2018). Není třeba sestavovat kalibrační křivku, protože vyhodnocení reakce probíhá na základě binomické statistiky. Kapénky s pozitivním signálem jsou označeny hodnotou 1, kapénky s negativním signálem hodnotou 0. Software QuantaSoft

je schopný podle počtu pozitivních kapének vůči jejich celkovému počtu zpětně stanovit počáteční koncentraci detekované sekvence (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2012).

Na Obrázku 10 je možné vidět výstup z ddPCR, na ose X je zobrazený počet dropletů a na ose Y síla fluorescenčního signálu. Na grafu jsou vyneseny všechny kapénky, pozitivní kapénky, nacházející se nad červenou linií, jsou označené modře. Kapénky nacházející se pod červenou prahovou linií jsou považovány za negativní a je jim přidělena hodnota 0 (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2012).



Obrázek 10 Grafický výstup z ddPCR (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2012).

3.5 Nejčastěji využívané lokusy pro určování pohlaví

3.5.1 SRY

Pro genetické určování pohlaví se využívá gen *SRY*, který se u koní běžně nachází na Y chromozomu v pozici Yq14.1 a neobsahuje žádné introny (Raudsepp et al. 2004). Gen *SRY* kóduje protein SRY, který patří mezi transkripční faktory z rodiny HMG (high mobility proteins). Tento protein je klíčový pro vývoj samčích pohlavních znaků (Sinclair et al. 1990).

Problematika použití samotného genu *SRY* pro určení pohlaví spočívá v neschopnosti zjistit, zda k absenci PCR produktu došlo kvůli nepřítomnosti genu, a tudíž samičímu pohlaví jedince, nebo je na vině chyba amplifikace. Pro snížení chybovosti je vhodné používat při amplifikaci *SRY* genu vhodný referenční lokus pro potvrzení správného výsledku (Hasewaga et al. 2000).

Raudsepp et al. (2010) se snažili pomocí PCR rozlišit zdravé samce s normálním genotypem a samice s XY *SRY* negativním genotypem. Autoři předpokládali, že byl na chromozomu Y u *SRY* negativních samic deletován pouze exon genu *SRY*, navrhli tedy primery, které těsně lemovaly tuto delecí. Po dalších analýzách však zjistili, že delece není omezena pouze na exon, ale zahrnuje nejméně 21 500 bp kolem něj. Zároveň se kolem delece

nacházelo velké množství repetitivních sekvencí, takže nebylo možné pomocí PCR prokázat rozdíl mezi zdravými samci a samicemi s SRY-negativním genotypem (Raudsepp et al. 2010).

3.5.2 Amelogenin

Gen pro amelogenin (*AMEL*) se nachází na obou pohlavních chromozomech. U většiny savců je funkční pouze gen *AMELX* na chromozomu X a exprese genu *AMELY*, který se nachází na chromozomu Y, je velmi nízká. U druhů, které mají rozdíly v sekvenci a délce genů, bývá tento gen často využíván jako marker pro určení pohlaví (Warinner et al. 2022). Mezi druhy s délkovými polymorfismy, u kterých je gen pro amelogenin využíván pro determinaci pohlaví se řadí např. ovce (Pfeiffer & Brenig 2005), skot (Ennis & Gallagher 1994), prasata (Fontanesi et al. 2008) nebo lidé (Nagare et al. 2018). V laboratořích běžně probíhá testování vzorků na gen *AMEL* i u koní, většinou v kombinaci s testováním na přítomnost *SRY* genu (Martinez et al. 2020).

U koní se v genu *AMELY* na chromozomu Y nachází 24 bp dlouhá delece, a proto lze tento gen využívat pro detekci pohlaví. I když se varianty genu liší délkou i sekvencí nukleotidů, jsou stále dostatečně homologní, aby je bylo možné amplifikovat pomocí jednoho páru primerů (Fukushima et al. 1999). V případě samčího genotypu vzniká při amplifikaci jeden produkt o velikosti 184 bp. U samčího genotypu je možné na gelu pozorovat tři bandy, vzniká produkt pro chromozom X (184 bp), pro chromozom Y (160 bp) a pro heteroduplex (200 bp) (Hasewaga et al. 2000).

3.5.3 ZFX, ZFY – zinkové prsty

Další gen, který lze využít pro určení pohlaví, je gen *ZFY*, vázaný na chromozom Y a jeho homolog *ZFX* na chromozomu X. Tyto dva geny lze po amplifikaci rozlišit díky polymorfismu délky restričních fragmentů v restričním místě enzymu HaeIII. Tohoto jevu se využívá pro analýzu přítomnosti Y chromozomu za pomoci markeru *ZFX* jako kontroly amplifikace. Štěpená DNA u samic poskytuje dva *ZFX* fragmenty o délce 403 a 45 bp, u samců odpovídají fragmenty neštěpenému produktu *ZFY* dlouhému 448 bp a dvěma fragmentům *ZFX* (Senese et al. 1999).

4 Metodika

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Veterinární vyšetření jedince

Bylo provedeno veterinární vyšetření koně jménem Nikita, který je hlavním subjektem zkoumaným v experimentální části této práce. Jedná se o čtrnáctiletého jedince plemene american quarter horse po matce Colonels Golden Star a po otci Smartin Off.

Veterinární vyšetření zahrnovalo klinickou prohlídku zevních pohlavních orgánů zaměřenou na určení pohlaví. Dále bylo provedeno rektální ultrasonografické vyšetření pomocí přístroje WED300V se sondou 6.5 MHz. Pro určení hladiny hormonů byla odebrána krev veterinárním lékařem a vzorky byly odeslány na vyhodnocení do specializované laboratoře.

4.1.2 Hodnocení jedinci

V této práci byla analyzována DNA jedince Nikity pro určení genetického pohlaví. Zároveň byla využita DNA dalších 23 koní, 13 samic a 10 samců. Jednalo se o koně plemene huculský kůň, appaloosa, welsh pony a arabský plnokrevník, sledovaní jedinci byli zástupci všech věkových kategorií. Podrobný seznam jedinců včetně příslušnosti ke konkrétnímu plemeni je uveden v Příloze 1.

4.1.3 Izolace DNA a ověření její kvality

DNA byla izolována z chlupových cibulek pomocí komerčně dostupného kitu NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, Německo). Před izolací DNA byly koncové části žíní s chlupovými cibulkami nastříhány do nových 1,5 ml polypropylenových zkumavek. Každá zkumavka obsahovala přibližně 50 kusů chlupových cibulek, ke kterým bylo přidáno 150 μ l pufru T1. Zkumavky byly krátce ponořeny do tekutého dusíku a poté byly vloženy do vodní lázně o teplotě 56 °C, dokud nedošlo k rozmrznutí. Celý proces byl opakován 4x. Následně bylo k vzorkům přidáno 25 μ l Proteinázy K (Macherey-Nagel, Německo) a proběhlo promíchání vzorku pomocí vortexu TK3S TechnoKartell (Hertz, Německo) po dobu 2x 10 sekund. Zkumavky byly na 6 hodin uloženy do termobloku TDB-120 (Biosan, Litva) nahřátého na teplotu 56 °C. Po 6 hodinách bylo ke vzorkům přidáno 200 μ l pufru B3, vzorky byly důkladně protřepány a ponechány 10 minut v termostatu nahřátém na 70 °C. Ke vzorkům byly přidány 4 μ l RNAsy sloužící k enzymatickému odstranění RNA. Dále bylo do zkumavek přidáno 210 μ l 96% ethanolu, aby došlo k vysrážení molekul DNA. V dalším kroku bylo

provedeno odstředění vzorků v centrifuze 5430R (Eppendorf, Německo) po dobu 1 minuty při 11000 x g a následně přepipetování supernatantu z každého vzorku na novou kolonku. Po přenesení roztoku byly zkumavky centrifugovány, molekuly izolované DNA zůstaly zachyceny na filtru a kapalina nahromaděná ve sběrné zkumavce byla vylita. Stejný postup byl opakován, dokud filtrem neprošel veškerý objem roztoku s lyzovanými buňkami. Následně byly kolonky promývány 500 µl pufru BW a po centrifugaci bylo provedeno druhé promývání pomocí 600 µl pufru B5. Zbytek kapaliny, který utkvěl v sběrné zkumavce, byl odstraněn a následovala centrifugace po dobu 2 minut za účelem usušení kolonky a úplného odstranění zbytků promývacích roztoků. Posledním krokem bylo přenesení filtru do sterilní 1,5 ml zkumavky a finální promytí 100 µl pufru BE, který byl předem inkubován na teplotu 70 °C. Zkumavky byly ponechány 1 minutu při laboratorní teplotě a následně centrifugovány. Filtr byl ze zkumavek odstraněn a ve zkumavce zůstalo 100 µl roztoku obsahujícího DNA.

Koncentrace a čistota izolovaných vzorků byly spektrofotometricky ověřeny pomocí přístroje NanoPhotometer (Implen, Německo). Pro ověření vysokomolekularity DNA byla provedena gelová elektroforéza v 1% agarózovém gelu.

4.2 Genotypizace pomocí PCR pro geny *SRY* a amelogenin

Vzhledem k netypickým projevům chování a ambivalentním pohlavním orgánům nebylo možné jasně stanovit pohlaví jedince při veterinární prohlídce. Z tohoto důvodu byla provedena amplifikace pomocí PCR pro fragmenty genů Sex-determining region Y (*SRY*) a amelogenin (*AMEL*), což je metoda běžně využívaná v laboratořích po celém světě pro determinaci genetického pohlaví (Martinez et al. 2020).

4.2.1 Použité primery

Pro účely této diplomové práce bylo navrženo a optimalizováno pět dvojic primerů, jejichž kompletní sekvence jsou uvedeny v Tabulce 1. K navržení primerů byl použit program Primer3 Input v4.1.0 (dostupný na adrese <https://primer3.ut.ee>). Jejich specifita byla ověřena pomocí softwaru BLAST (dostupný na adrese <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), který je součástí databáze NCBI.

Označení	Gen	Zkratka genu	Sekvence 5'-3'	Délka primeru (bp)	Velikost ampliconu (bp)
HOR1F	Cyclin-1	CYLC1	CATACGTGCCAACTTTGTGGCAGA	24	218
HOR1R			GCCTCCCAATTCATGGGAAAGCTC	24	
HOR4F	Sex-determining region Y	SRY	CAGTCGTCCGTGAATGTGAAAGGG	24	200
HOR4R			CCATTCTTCGAGGAGGCACAGAGA	24	
HOR7F	Methylmalonyl-CoA epimerase	MCEE	AACCTGGGTCGCCTCAATCATGTA	24	210
HOR7R			CTGCAGAAAGCCTGCAATTGGACT	24	
HOR9F	Androgen Receptor	AR	CTAGCTGCAAGGACTACCGCATCA	24	564
HOR9R			CAGCTGCTTAAGCCTGGGAAAGTG	24	
HOR10F	Amelogenin	AMELX, AMELY	AACACTCCATGRTTCCAASYCAAC	24	170, 146
HOR10R			GAATATYGGAGGCAGAGGWGSGCTG	24	

Tabulka 1 Přehled navržených primerů, předpokládaná velikost ampliconu byla určena pomocí programu BLAST (dostupný na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

4.2.2 Teplotní gradient pro geny *AMEL* a *SRY*

Pro marker HOR10 (gen *AMEL*) byl nejprve vytvořen teplotní gradient. Pro přípravu premixu o celkovém objemu 10 μ l na reakci byl použit 1 μ M primer HOR10-F, 1 μ M primer HOR10-R, 5 μ l Master Mix Multiplex 2x (Qiagen, Německo) a 3 μ l DNA o koncentraci 5 ng/ μ l (15 ng DNA). Byla využita DNA od jedné samice (AR1B) a jednoho samce (AR2B). Na přístroji T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) byl vytvořen teplotní gradient z 8 teplot v rozmezí 60-68 $^{\circ}$ C (Tabulka 2). Teplotní a časový profil reakce je uveden v Tabulce 3. Po proběhnutí reakce byla provedena gelová elektroforéza ve 3% agarózovém gelu s přidávkem 5 μ l barviva Ethidium bromid po dobu 90 minut. Gel byl vizualizován pomocí UV Transiluminátoru (BioRad, USA) a na základě vizuálního zhodnocení signálu jednotlivých bandů byla zvolena nejvhodnější teplota pro nasedání primerů HOR10-F a HOR10-R. Stejný postup byl použit i pro teplotní gradient markeru HOR4 (gen *SRY*).

Tabulka 2 Teplotní gradient pro annealing primerů HOR10 a HOR4

Teplotní gradient
60 $^{\circ}$ C
60,6 $^{\circ}$ C
61,6 $^{\circ}$ C
63,1 $^{\circ}$ C
64,9 $^{\circ}$ C
66,4 $^{\circ}$ C
67,4 $^{\circ}$ C
68 $^{\circ}$ C

Tabulka 3 Teplotní a časový profil PCR reakce

fáze	teplota	doba	počet opakování
predenaturace	95 °C	6 min	1x
denaturace	94 °C	30 s	
annealing	viz Tab. 2	30 s	35x
elongace	72 °C	30 s	
finální elongace	68 °C	10 min	1x

4.2.3 Amplifikace genů *AMEL* a *SRY*

Pro finální amplifikační reakci genu pro amelogenin (marker HOR10) byla využita DNA 8 jedinců, 3 samců (GON1, GON3, GON4) a 5 samic (Nikita hříva II, Nikita ocas I, Escape Dona, HUC12B, HUC13B, HUC14B). Premix o celkovém objemu 10 µl na reakci byl připraven ve složení 1 µM HOR10-F primeru, 1 µM HOR10-R primeru, 5 µl Master MixMultiplex 2x (Qiagen, Německo) a 3 µl DNA o koncentraci 5 ng/µl (15 ng DNA). Analýza proběhla na přístroji T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA), teplotní a časový profil reakce je uveden v Tabulce 4. Následně byla provedena gelová elektroforéza ve 3% agarózovém gelu při napětí 110 V po dobu 90 minut.

Tabulka 4 Teplotní a časový profil amplifikace genu *AMEL*

fáze	teplota	doba	počet opakování
predenaturace	95 °C	10 min	1x
denaturace	94 °C	30 s	
annealing	68 °C	30 s	35x
elongace	72 °C	30 s	
finální elongace	65 °C	10 min	1x

Pro marker HOR4 (gen *SRY*) byl připraven premix ve stejném složení jako pro marker HOR10, s rozdílem v použití specifických primerů HOR4F+R. Pro amplifikaci bylo použito 11 vzorků, 7 samičích (Nikita hříva II, Nikita ocas I, Escape Dona, AR1B, HUC12B, HUC13B, HUC14B) a 4 samčí (AR2B, GON1, GON3, GON4). Teplotní a časový profil reakce, která proběhla na přístroji T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA), je uveden v Tabulce 5. Následně byla provedena gelová elektroforéza ve 3% agarózovém gelu při napětí 110 V po dobu 90 minut.

Tabulka 5 Teploty použité pro amplifikaci genu *SRY*

fáze	teplota	doba	počet opakování
predenaturace	95 °C	10 min	1x
denaturace	94 °C	30 s	
annealing	60 °C	30 s	35x
elongace	72 °C	30 s	
finální elongace	65 °C	10 min	1x

4.3 Kvantifikace pomocí real-time PCR (qPCR)

Pro potvrzení správnosti determinace pohlaví byl navržen další krok experimentu, při kterém byla porovnávána míra amplifikace, daná počtem CNV (copy number variation) genů *Cylicin-1 (CYLC1)* a *Sex-determining region Y (SRY)* vůči autozomálnímu genu *Methylmalonyl-CoA epimerase (MCEE)*. Gen *CYLC1* se nachází na nehomologní části chromozomu X a měl by tak být přítomen u samců pouze v jedné kopii, tedy amplifikovat v polovičním množství než u samic. Gen *SRY* je umístěn na nehomologní části Y chromozomu a u samic není amplifikován vůbec. Oba tyto geny byly porovnávány s autozomálním genem *MCEE*, který se u koní nachází na chromozomu 1 a měl by být přítomen u obou pohlaví ve stejné míře, tedy ve dvou kopiích.

4.3.1 Real-time PCR pro optimalizační fázi

Nejprve byla sestavena ředící řada pro ověření eficiency primerů pro markery HOR1, HOR4 a HOR7. Sekvence jednotlivých F a R primerů jsou uvedeny v Tabulce 1. Pro vytvoření ředící řady byla použita DNA od jedné samice (AR1B) a jednoho samce (AR2B). Oba jedinci byli zástupci plemene arabský plnokrevník. Získaná DNA byla naředěna na koncentraci 25 ng/μl a z této koncentrace byla poté vytvořena pětinasobná ředící řada. Množství DNA pro jednotlivé koncentrace ředící řady je uvedeno v Tabulce 6.

	koncentrace DNA pro ředící řadu	množství DNA v 10 μl reakci
1. koncentrace	100 000 pg/μl	400 000 pg
2. koncentrace	20 000 pg/μl	80 000 pg
3. koncentrace	4000 pg/μl	16 000 pg
4. koncentrace	800 pg/μl	3200 pg
5. koncentrace	160 pg/μl	640 pg
6. koncentrace	32 pg/μl	128 pg

Tabulka 6 Množství DNA pro jednotlivé koncentrace ředící řady

Pro každou sadu primerů byl vytvořen samostatný premix obsahující 0,5 μM F primer, 0,5 μM R primer a 5 μl FastStart Essential DNA Green Master 2x (Roche, Švýcarsko). Do každé jamky bylo napipetováno 6 μl konkrétního premixu a 4 μl DNA v dané koncentraci (Tabulka 6). Jednotlivé vzorky byly analyzovány v triplicátech pro odhalení případné chyby v pipetování nebo kontaminace DNA. qPCR reakce probíhala na přístroji CFX Connect™ RealTime PCR Detection System (Bio-Rad, USA), teplotní a časový profil reakce je uveden v Tabulce 7.

Tabulka 7 Teplotní a časový profil reakce

fáze	teplota	doba	počet opakování
predenaturace	95 °C	10 min	1x
denaturace	95 °C	20 s	39x
annealing	60 °C	20 s	
elongace	72 °C	20 s	
finální elongace	72 °C	10 min	1x

Vyhodnocení qPCR bylo provedeno v programu CFX Maestro v4.1.24. (Bio-Rad, USA). Pro každý vzorek ředící řady byla získána hodnota C_T , která udává počet cyklů nutných k vytvoření detekovatelného množství produktu. Účinnost amplifikace neboli eficeience (E) byla vypočítána na základě sklonu výsledné křivky podle vzorce:

$$E = (10^{(-1/\text{sklon})} - 1) \times 100$$

V ideálním případě se množství produktu po každém cyklu reakce zdvojnásobí, účinnost amplifikace se tedy rovná 2 (100 %) a optimální hodnota sklonu standardní křivky -3,32. Hodnota eficeience pohybující se kolem 100 % je ukazatelem vhodně navrženého a reprodukovatelného experimentu. Nízká hodnota eficeience může být zapříčiněna špatně navrženými primery nebo nevhodnými reakčními podmínkami. Naopak hodnoty eficeience vyšší než 110 % mohou poukazovat na vznik nespecifických produktů nebo chybu při pipetování (Bio-Rad Laboratories Inc. 2006).

4.3.2 Real-time PCR pro geny *CYLC1*, *MCEE* a *SRY*

Pro amplifikaci genů *CYLC1*, *MCEE* a *SRY* bylo použito 10 vzorků DNA od samic (Nora, AR1B, Nikita, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 8B, 9B) a 10 vzorků od samců (GON1, GON3, GON4, AR2B, HUC4, HUC7, HUC9, HUC11, APPA18, APPA19). Složení základního premixu bylo pro všechny vzorky stejné, lišily se pouze přidané primery pro jednotlivé geny. Jedna reakce o celkovém objemu 10 μ l obsahovala 0,5 μ M konkrétní F-primer, 0,5 μ M konkrétní R-primer, 5 μ l FastStart Essential DNA Green Master 2x (Roche, Švýcarsko) a 20 ng DNA. Amplifikace probíhala na přístroji CFX Connect™ RealTime PCR Detection System (Bio-Rad, USA), teplotní profil reakce je uveden v Tabulce 7.

Vyhodnocení qPCR bylo provedeno v programu CFX Maestro v4.1.24. (Bio-Rad, USA). Pro určení míry exprese genu *CYLC1* byl proveden výpočet relativní kvantifikace templátové DNA normalizované k autozomálnímu genu *MCEE* podle vzorce:

$$\Delta C_T = C_T \text{ gonozomální gen} - C_T \text{ autozomální gen}$$

$$\text{Ratio } \Delta C_T = 2^{-\Delta C_T}$$

4.4 Absolutní kvantifikace

Pro zjištění absolutní kvantifikace molekul DNA ve vzorku byla využita metoda dropletové digitální PCR. Pro reakci byly využity stejné primery jako u metody qPCR pro geny *CYLC1*, *SRY* a *MCEE*. Pro amplifikaci pomocí ddPCR bylo vybráno 5 vzorků DNA, 2 vzorky od samců (GON1, AR2B) a 2 vzorky od samic (AR1B, Nora) a vzorek od jedince Nikity (Nikita ocas I).

Pro všechny tři geny byla připravena stejná reakční směs, která se lišila pouze v přidání specifických primerů pro konkrétní geny. Objem reakční směsi byl 44 μl (Tabulka 8), protože byla připravována pro duplikátovou reakci a zároveň byla započítána rezerva. Koncentrace DNA byla stanovena na základě hodnoty c parametru, který udává hmotnost DNA v haploidním genomu jedince. Doporučený rozsah hodnot obsahu DNA se podle Droplet Digital™ PCR Applications Guide pohybuje v rozmezí od 1 do 120 000 kopií v 20 μl reakci (Bio-Rad Laboratories Inc. 2012). Pro účely této práce bylo na základě empirických zkušeností určeno vhodné množství DNA v reakci na 30 000c. Parametr c se podle Tiersch et al. (1989) rovná u druhu *Equus caballus* 3,15 pg. Z uvedených hodnot bylo vypočítáno množství DNA v 20 μl reakci na 94 500 pg. Do 44 μl reakce tak bylo pipetováno 207,9 ng DNA, což odpovídá 10 μl DNA o koncentraci 20,79 ng/ μl .

Tabulka 8 Složení reakční směsi ddPCR o celkovém objemu 44 μl (dvě reakce + rezerva)

složka	objem
QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix 2x	22 μl
primer F (10 μM)	1,1 μl
primer R (10 μM)	1,1 μl
H ₂ O	9,8 μl
DNA	10 μl

V prvním kroku byla reakční směs důkladně promíchána a odstředěna v centrifuze 5430R (Eppendorf, Německo). Následně byla připravena reakční kazeta (DG8™ cartridge, Bio-Rad, USA), která obsahuje tři řady jamek. Do prostřední jamky bylo napipetováno 20 μl reakční směsi, do spodní řady byl napipetován olej (Droplet Generator Oil, Bio-Rad, USA) v objemu 70 μl . Reakční kazeta byla překryta gumičkou a vložena do generátoru dropletů (QX200 Droplet Generator, BioRad, USA). Došlo k vytvoření dropletů, které byly přeneseny multikanálovou pipetou do 96jankové PCR destičky. PCR destička byla zapečetěna hliníkovou fólií v přístroji PX1 PCR Plate Sealer, Bio-Rad, USA při teplotě 185 °C po dobu 10 sekund. Amplifikace probíhala na přístroji termocykler T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) podle parametrů uvedených v Tabulce 9. Následně byla destička umístěna do čtečky (QX200 Droplet

Reader, Bio-Rad, USA), která zaznamenává fluorescenci jednotlivých dropletů. Výsledky amplifikace byly vyhodnoceny pomocí programu QuantaSoft v1.7.4. (Bio-Rad, USA).

Tabulka 9 Teplotní a časový profil reakce ddPCR

fáze	teplota	doba	počet opakování
predenaturace	95 °C	5 min	1x
denaturace	95 °C	30 s	40x
annealing + elongace	60 °C	1 min	40x
chlazení	4 °C	5 min	1x
stabilizace	90 °C	5 min	1x
finální chlazení	10 °C	dle potřeby	

4.5 Sekvenační reakce genu pro androgenní receptor

4.5.1 Teplotní gradient pro nasedání primerů

Pro sekvenační reakci byly navrženy specifické primery HOR9F a HOR9R, jejichž sekvence je uvedena v Tabulce 1. Nejprve byla provedena optimalizace teploty pro jejich nasedání. K optimalizaci byla využita DNA jedné samice (AR1B) a jednoho samce (AR2B), DNA byla naředěna na koncentraci 5 ng/μl. V reakční směsi o objemu 10 μl bylo použito 4μl DNA (celkem 20 ng), 0,5 μM HOR9-F primer, 0,5 μM HOR9-R primer, 5 μl FastStart Essential DNA Green Master 2x (Roche, Švýcarsko). Byl vytvořen teplotní gradient v rozmezí 60-68 °C, přesné hodnoty teplot jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10 Teplotní gradient pro nasedání primerů HOR9

Teplotní gradient
60 °C
60,6 °C
61,6 °C
63,2 °C
65,1 °C
66,7 °C
67,6 °C
68 °C

Amplifikace probíhala na přístroji CFX Connect™ RealTime PCR Detection System (Bio-Rad, USA), teplotní a časový profil reakce zobrazuje Tabulka 11. Po proběhnutí amplifikace byla provedena gelová elektroforéza v 1,5% agarózovém gelu s přidavkem 5 μl barviva Ethidium bromid. Gel byl vizualizován pomocí UV Transiluminátoru (BioRad, USA) a na základě vizuálního zhodnocení signálu jednotlivých bandů byla určena nejvhodnější teplota pro nasedání primerů.

Tabulka 11 Teplotní a časový profil reakce

fáze	teplota	doba	počet opakování
predenaturace	95 °C	6 min	1x
denaturace	94 °C	30 s	
annealing	viz Tabulka 11	30 s	35x
elongace	72 °C	30 s	
finální elongace	68 °C	10 min	1x

4.5.2 Amplifikace genu pro androgenní receptor

Pro amplifikaci zvoleného úseku genu pro androgenní receptor byla využita DNA od jedince Nikity a jednoho samce (AR2B). Vzorky DNA byly naředěny na koncentraci 5ng/μl a každý byl amplifikován ve dvou kopiích. Reakční směs pro jeden vzorek o objemu 10 μl obsahovala 4 μl DNA (celkem 20 ng), 0,5μM HOR9-F primer, 0,5 μM HOR9-R primer a 5 μl FastStart Essential DNA Green Master 2x (Roche, Švýcarsko). Amplifikace proběhla na přístroji CFX Connect™ RealTime PCR Detection System (Bio-Rad, USA) podle teplotního a časového profilu uvedeného v Tabulce 12.

Tabulka 12 Teplotní a časový profil reakce

fáze	teplota	doba	počet opakování
predenaturace	95 °C	10 min	1x
denaturace	94 °C	20 s	
annealing	65,1 °C	20 s	35x
elongace	72 °C	20 s	
finální elongace	65 °C	10 min	1x

Po amplifikaci byla provedena gelová elektroforéza v 1,5% agarózovém gelu s přídavkem 5 μl barviva Ethidium bromid. Elektroforéza probíhala po dobu 65 minut při napětí 120 V. Fragmety byly vizualizovány pomocí UV Transiluminátoru (BioRad, USA).

Následně byly fragmety z gelu vyříznuty, zváženy a byla provedena izolace DNA pomocí kitu Gene Jet Gel Extraction (Thermo Scientific, USA). V prvním kroku byl přidán Binding Buffer v poměru 1:1 k váze gelu s fragmentem DNA. Vzorky se nechaly inkubovat v termostatu TDB-120 (Biosan, Litva) při 56 °C po dobu 10 minut, aby došlo k úplnému rozpuštění gelu. Po inkubaci byly vzorky zvortexovány, přepipetovány na kolonku a odstředěny v centrifuze 5430R (Eppendorf, Německo) po dobu 1 minuty při 11000 x g. Dále bylo ke vzorkům přidáno 100 μl Binding Buffer a opět byly odstředěny v centrifuze. Následně bylo přidáno 700 μl Wash Buffer a vzorky byly znovu stočeny v centrifuze. Následovala centrifugace na sucho, aby došlo k úplnému odstranění zbytků promývacího pufru.

V posledním kroku byla kolonka od každého vzorku přenesena do čisté mikrocentrifugační zkumavky, každý vzorek byl promyt 25 μ l deionizované vody o pH 8 a byla provedena centrifugace po dobu 2 minut. Vzorky byly kvantifikovány pomocí přístroje UV-spektrofotometr NanoPhotometer (Implen, Německo). Výsledná koncentrace DNA byla naředěna podle požadavků poskytovatele sekvenačních služeb (Eurofins Genomics Germany GmbH) na 70ng/ μ l.

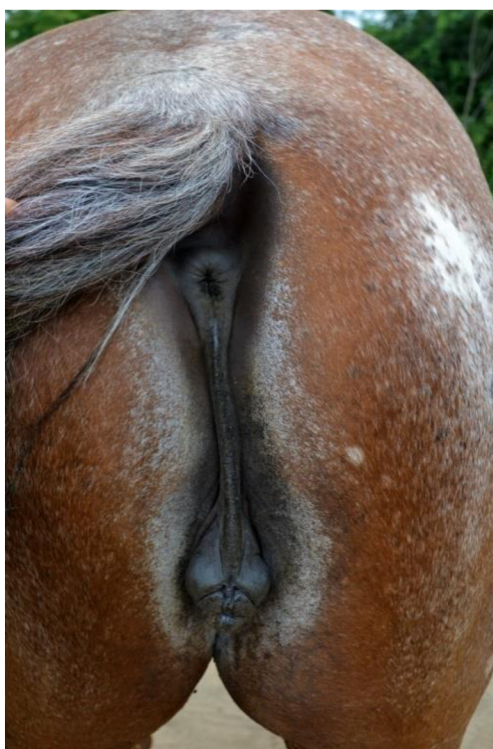
Pro následné bioinformatické zpracování výsledků byl využit program BioEdit version 7.2.5 (Hall 1999).

5 Výsledky

5.1 Biologický materiál

5.1.1 Veterinární vyšetření jedince

Při klinickém vyšetření byly v břišní krajině (regio inguinalis) popsány rudimenty obou mléčných žláz včetně obou ze stran oploštělých struků. Ventrálně pod řitním otvorem (anus) ve vzdálenosti cca 25 cm byla nalezena struktura anatomicky podobná žaludu penisu (glans penis) s vývodem močové trubice. Prostor mezi strukturou glans penis a anem spojovala řasa, která je pravděpodobně rudimentem srostlých vnějších stydkých pysků (Obrázek 11).



Obrázek 11 Vnější pohlavní orgány Nikity

Palpací v levém tříselném kanále byl nahmatán kulovitý útvar o průměru přibližně 6 cm. Podle umístění a struktury bylo veterinárním lékařem konstatováno, že by se mohlo jednat o zakrnělé varle. Rektální ultrasonografické vyšetření prokázalo nepřítomnost dělohy a vagíny. Pro potvrzení nepřítomnosti vaječníků by bylo třeba provést vyšetření na specializované klinice pomocí transdermálního ultrazvuku. Toto vyšetření by bylo finančně náročné a pro jedince nadměrně stresující, proto k němu nebylo přistoupeno.

Podle popisu majitelky jedinec Nikita vykazoval atypické projevy chování, které byly podobné chování samců. Jednalo se o naskakování na samice během říje (Obrázek 12), agresivitu vůči samcům a shánění stáda se sníženým krkem, což je chování typické pro hřebce.



Obrázek 12 Nikita při naskakování na klisnu v říji

Z hormonálního vyšetření byly získány hodnoty pro estradiol <18 pmol/l (4,9 pg/ml), pro progesteron 0,29 nmol/l (0,09 ng/ml) a pro testosteron $<0,09$ nmol/l (0,03 ng/ml). Hladina testosteronu nebyla výrazně vyšší než u běžné klisny. Referenční hodnoty pro hladinu testosteronu u samců jsou 1-5 ng/ml, u klisen je uváděna referenční hodnota $<0,02$. Hladina estradiolu u jedince Nikity má hodnoty typické pro klisnu v proestu (1,2-6,2 pg/ml). Kompletní veterinární zpráva je přiložena v Příloze 2.

5.1.2 Izolace DNA

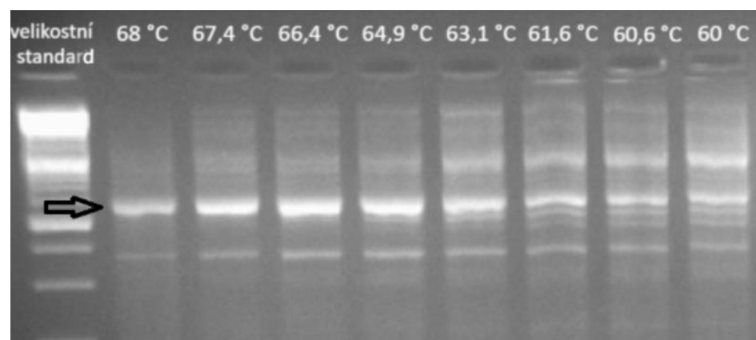
Čistota izolované DNA byla ověřena pomocí UV spektrofotometru NanoPhotometer (Implen, Německo). Přístroj pracuje na principu proměření vzorku při vlnových délkách 260 a 280 nm, poměr absorbancí A_{260}/A_{280} by se u DNA měl pohybovat v intervalu od 1,7 do 2 (Wilfinger et al. 1997). U každého vzorku byla změřena koncentrace DNA, hodnoty naměřených koncentrací a poměru absorbancí A_{260}/A_{280} jsou uvedeny v Příloze 1. Průměrná hodnota poměru absorbancí A_{260}/A_{280} byla 1,84 a kromě dvou vzorků (HUC9 a APPA19) se všechny vzorky pohybovaly v rozmezí pro čistou DNA. U vzorků HUC9 a APPA19 byl poměr nižší, než je stanovené rozmezí, což může poukazovat na kontaminaci vzorku např. proteiny (Matlock 2015).

5.2 Genotypizace pomocí PCR pro geny SRY a amelogenin

5.2.1 Teplotní gradient pro geny *AMEL* a *SRY*

Na Obrázku 13 se nachází elektroforeogram, který zobrazuje výsledky amplifikace teplotního gradientu pro primery HOR10F+R u vzorku AR1B. Jednotlivé vzorky jsou seřazeny podle annelační teploty, vpravo se nachází vzorek s nejnižší teplotou. Pro účely amplifikace byla pro optimální nasedání primerů HOR10 vybrána teplota 68 °C. Při této teplotě je na gelu viditelný oproti ostatním vzorkům pouze nepatrný šum, který může značit kontaminaci nebo vznik nespecifických produktů. Naopak jasný band ve velikosti očekávaného produktu naznačuje, že amplifikace daného markeru proběhla při této teplotě úspěšně.

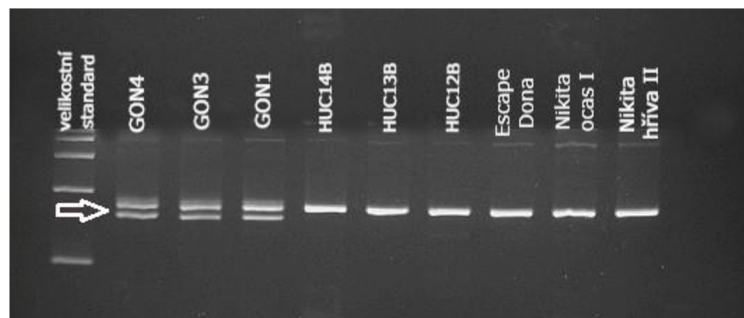
Pro gen *SRY* byla na základě elektroforeogramu určena nejlepší teplota pro nasedání primerů HOR4F+R 60 °C, data z této části experimentu nejsou vizualizována.



Obrázek 13 Elektroforeogram pro teplotní gradient primeru HOR10, šipka označuje očekávaný produkt

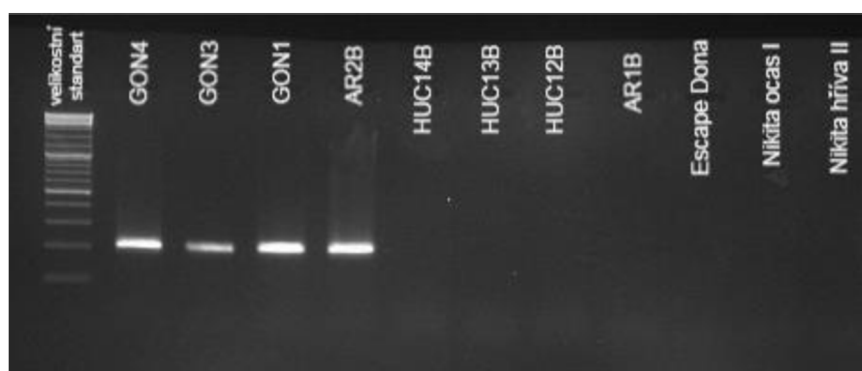
5.2.2 Amplifikace genů *AMEL* a *SRY*

Amplifikace pro oba geny proběhla úspěšně. Na Obrázku 14 je zobrazen elektroforeogram pro gen amelogenin (marker HOR10) se vzorky DNA od 9 koní. Prvních šest vzorků DNA zprava pochází od samic, další tři vzorky od samců. Na obrázku je jasně patrný rozdíl mezi samčími a samičími vzorky, u samic vzniká jeden produkt o velikosti 170 bp a u samců dva produkty o velikosti 170 a 146 bp.



Obrázek 14 Elektroforeogram genu pro amelogenin (HOR10), šipka označuje vznikající produkty

Elektroforeogram amplikonů genu *SRY* (primer HOR4) je možné vidět na Obrázku 15. Bylo analyzováno 11 vzorků DNA, prvních sedm vzorků DNA zprava bylo od samic, další čtyři vzorky od samců. Jelikož se gen *SRY* nachází na chromozomu Y, u samic není tento gen amplifikován, a tudíž není možné pozorovat na gelu žádný band. U samců vzniká jeden produkt o velikosti 200 bp. Z obrázku je patrné, že u žádné ze samic nebyl fragment amplifikován, naopak u všech samců amplifikace proběhla. U jedince Nikity (vzorky Nikita hřiva II a Nikita ocas I) amplifikace neproběhla, což značí, že jedinec nemá gen *SRY*.



Obrázek 15 Elektroforeogram pro gen *SRY* (HOR4)

5.3 Kvantifikace pomocí real-time PCR (qPCR)

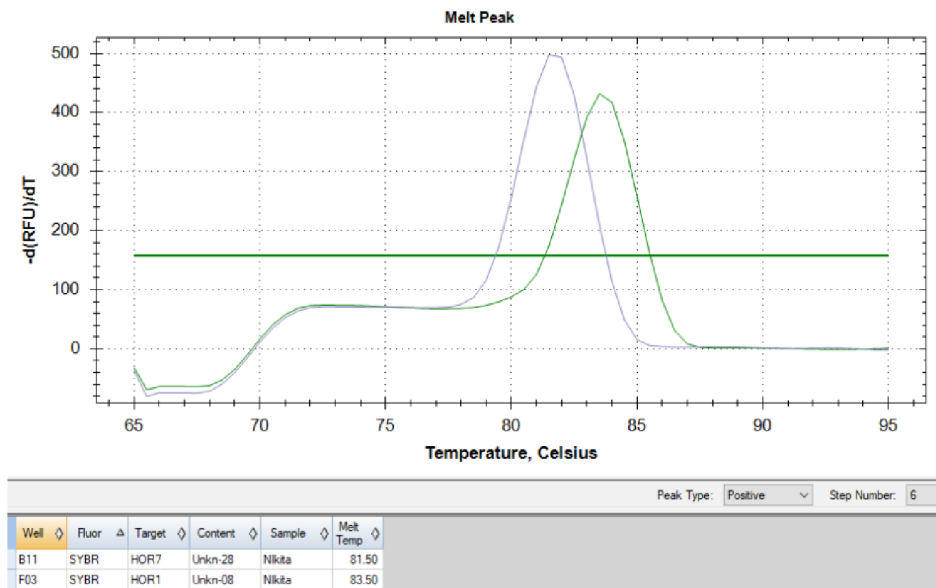
5.3.1 Real-time PCR pro optimalizační fázi

Amplifikace vzorků ředící řady proběhla úspěšně. Amplifikační křivky vzniklých produktů vykazovaly standardní průběh, v Tabulce 14 jsou uvedeny konkrétní parametry výsledných kalibračních křivek pro primery HOR1, HOR4 a HOR7. Efektivita amplifikace se ve všech případech pohybovala v požadovaném rozmezí 90-110 %. Všechny vzorky náležely do doporučeného intervalu pro sklon kalibrační křivky (-3,1 až -3,6) (Bio-Rad Laboratories Inc. 2006). Hodnota koeficientu determinace (R^2) by měla být vyšší než 0,98, což se potvrdilo u všech vzorků.

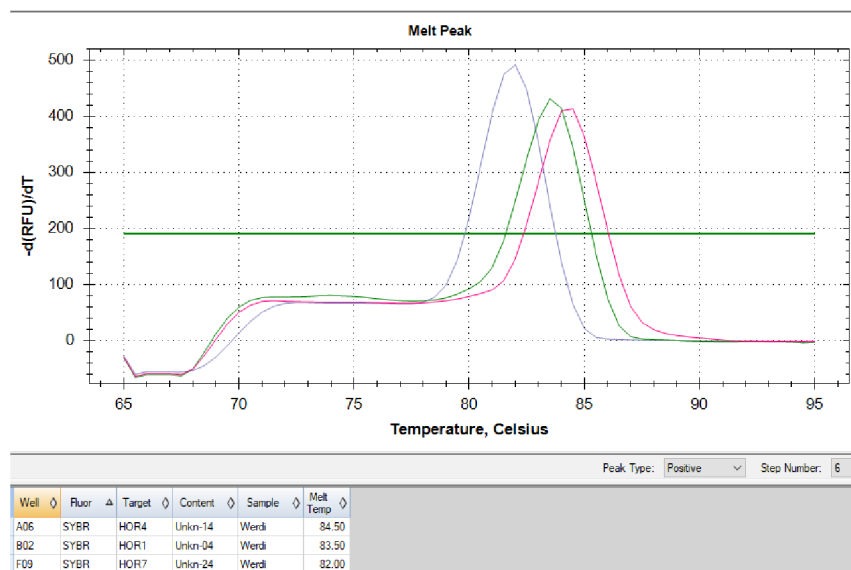
Tabulka 14 Parametry průběhu qPCR pro optimalizační fázi

název primeru	vzorek	efektivita (%)	r^2	sklon kalibrační křivky
HOR1	AR1B	103	0,996	-3,238
HOR1	AR2B	104	0,998	-3,21
HOR7	AR1B	101,5	0,992	-3,286
HOR7	AR2B	103,9	0,99	-3,233
HOR4	AR2B	110	0,988	-3,09

Ukázku grafického výstupu z programu CFX Maestro v4.1.24. (Bio-Rad, USA) je možné vidět na Obrázku 16 a 17, na základě analýzy křivky tání bylo potvrzeno, že dochází ke vzniku pouze specifických produktů.

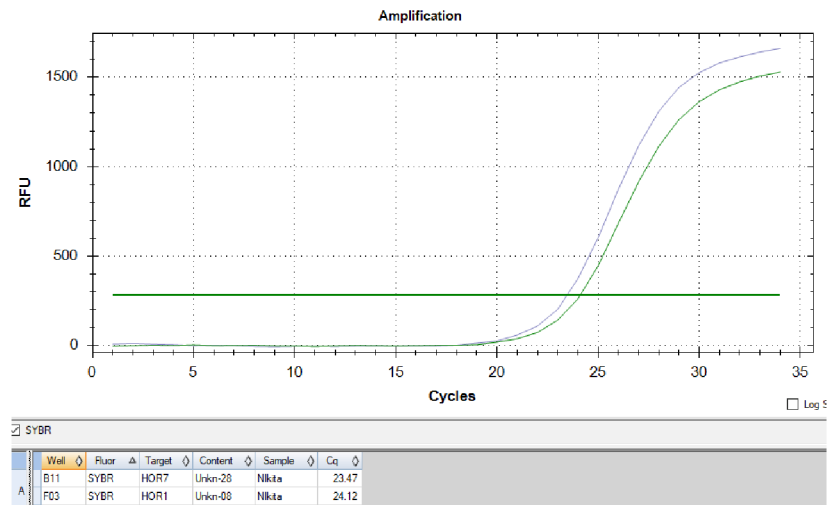


Obrázek 16 Graf křivek analýzy tání u jedince Nikita pro primery HOR1 a HOR7, HOR1 zeleně, HOR7 modře



Obrázek 17 Graf křivek tání pro samčí vzorek Werdi pro primery HOR1, HOR4 a HOR7, primer HOR1 zeleně, primer HOR4 červeně, primer HOR7 modře

Tvar amplifikačních křivek na Obrázku 18 poukazuje na vhodně navrženou amplifikační reakci.

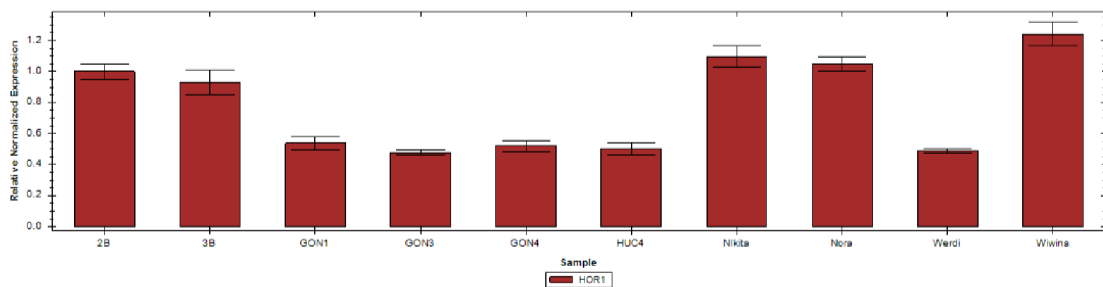


Obrázek 18 Graf amplifikačních křivek u vzorku Nikita pro primery HOR1 a HOR7, HOR1 zeleně, HOR7 modře

5.3.2 Real-time PCR pro geny *CYLC1*, *SRY* a *MCEE*

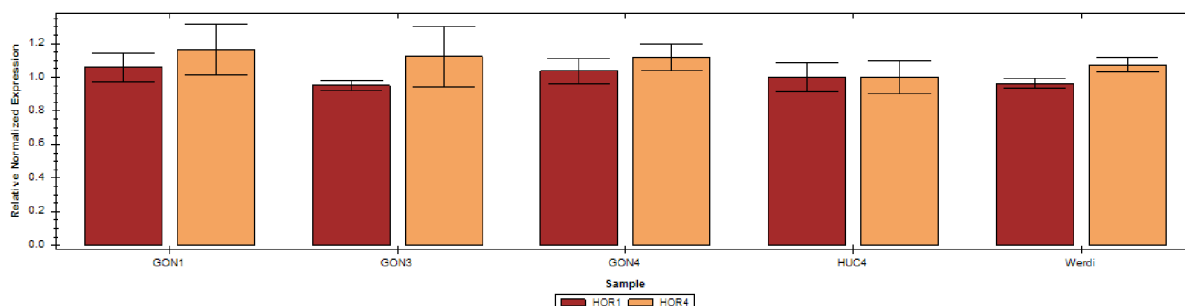
Vzhledem k tomu, že se hodnota eficeince u markerů HOR1 (gen *CYLC1*) a HOR4 (gen *SRY*) výrazně nelišila, bylo možné tyto markery v rámci relativní kvantifikace mezi sebou porovnávat. Pomocí metody hodnotící Ratio ΔC_T byla provedena relativní kvantifikace templátové DNA vztažená k autozomálnímu genu *MCEE* (marker HOR7).

Gen *CYLC1* se nachází na nehomologní části chromozomu X. Hodnota Ratio ΔC_T pro samice byla rovna přibližně 1,00, pro samce dosahovala hodnot přibližně 0,50. Bylo potvrzeno, že míra amplifikace genu *CYLC1* dosahuje u samců přibližně polovičního množství než u samic, protože mají oproti samicím poloviční dávku chromozomu X. Zároveň bylo prokázáno, že jedinec Nikita vykazuje relativní kvantitu amplifikovaného fragmentu genu *CYLC1* jako běžná klisna, jak je patrné z Obrázku 19.



Obrázek 19 Relativní kvantifikace genu *CYLC1* (marker HOR1) vůči referenčnímu autozomálnímu genu *MCEE* (HOR7) u samců a u samic

Dále bylo provedeno porovnání míry amplifikace fragmentů genů *CYLC1* a *SRY*. Oba geny by samci měli mít v jedné kopii, a tudíž by jejich kvantita měla dosahovat hodnoty 1,00. Z Obrázku 20 je patrné, že míra amplifikace těchto dvou genů byla u samčích vzorků shodná. Míra amplifikace obou genů se nelišila ani mezi jednotlivými jedinci.



Obrázek 20 Relativní kvantifikace fragmentů genů *CYLC1* a *SRY* u samců

5.4 Absolutní kvantifikace

Na základě výsledků absolutní kvantifikace pomocí ddPCR byly vypočítány hodnoty copy number variation (CNV) pro gen *CYLC1* (primer HOR1) vztážené k autozomálnímu genu *MCEE* (primer HOR7). Z Tabulky 15 lze vyčíst, že u klisen se hodnota CNV rovná přibližně hodnotě 1,00, což naznačuje, že klisny mají dvě kopie genu *CYLC1*, jednu na každém chromozomu X. Vzorky AR2B a GON1 jsou vzorky DNA odebrané od samců a mají oproti klisnám přibližně poloviční hodnotu CNV. Absolutní kvantifikace potvrdila u Nikity samičí pohlaví, hodnota CNV u jejího vzorku byla 0,9175.

Tabulka 15 Hodnoty copy number variation (CNV) vypočítané z poměrů genů *CYLC1/MCEE*

vzorek	HOR1/HOR7	copy number
AR1B	1449/1443	1,0042
Nora	1172/1206	0,9718
Nikita	990/1079	0,9175
AR2B	601/1345	0,4468
GON1	566/1188	0,4764

Tabulka 16 uvádí vypočítané hodnoty CNV u genu *SRY* (primer HOR4) vztážené k autozomálnímu genu *MCEE* (primer HOR7). Toto porovnání bylo možné provádět pouze u samčích vzorků, protože u samičích vzorků se gen *SRY* nenachází. U obou samčích vzorků AR2B i GON1 se hodnota CNV pohybuje kolem hodnoty 0,50. Tento výsledek naznačuje, že

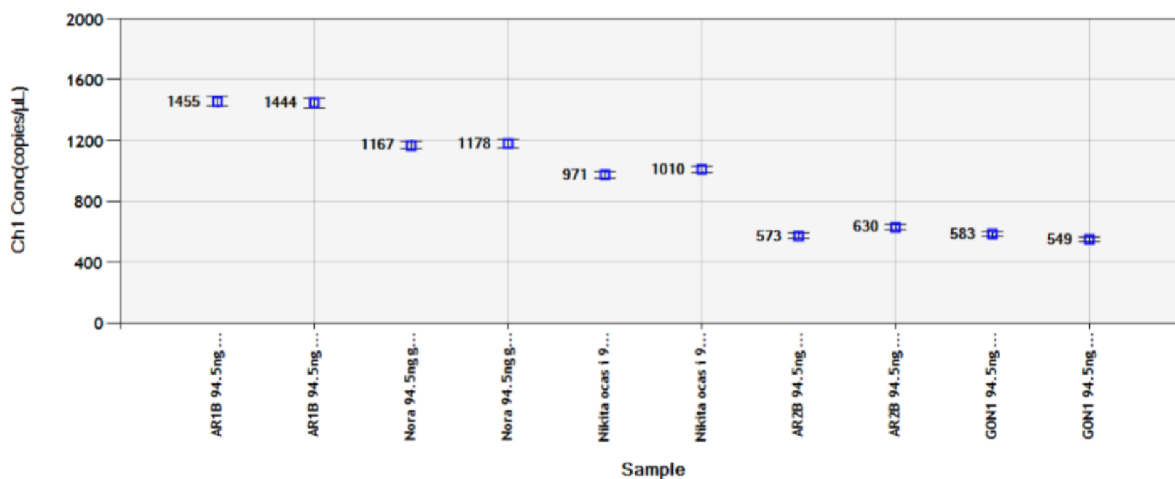
oproti genu *MCEE*, který mají samci ve dvou kopiích, se gen *SRY* u samců nachází pouze v jedné kopii na chromozomu Y.

Tabulka 16 Hodnoty copy number variation (CNV) vypočítané z poměrů genů *SRY/MCEE*

vzorek	HOR4/HOR7	copy number
AR2B	667/1345	0,4959
GON1	614/1188	0,5168

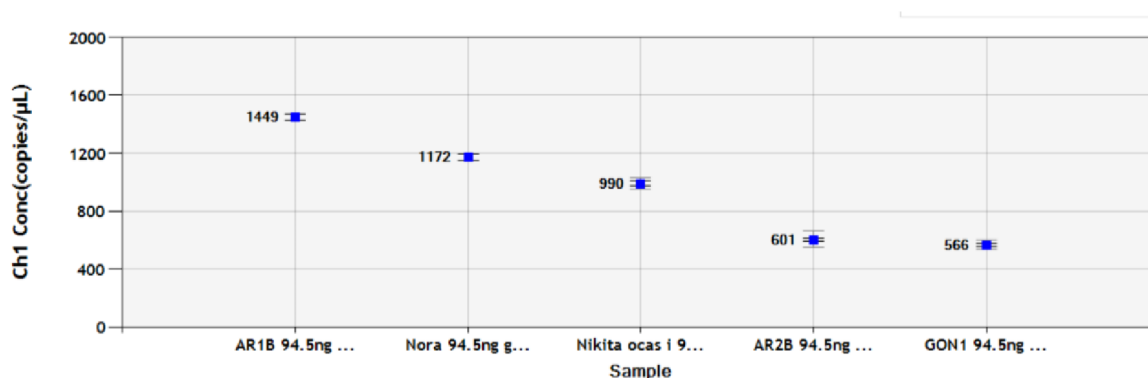
Výsledné hodnoty absolutní kvantifikace pro gen *CYLC1* u jednotlivých vzorků je možné vidět na Obrázku 21. Na ose X jsou u každého jedince zobrazeny dvě hodnoty, protože analýza probíhala v duplikátech. Osa Y zachycuje počet kopií DNA (tedy pozitivních dropletů) v 1 μ l. U jedince Nikity byl absolutní počet kopií roven u prvního vzorku 971 a u druhého vzorku 1010, tento výsledek potvrzuje, že se jedná o samici.

Odlíšný počet pozitivních dropletů v 1 μ l mezi různými jedinci je způsoben rozdíly ve vstupní koncentraci DNA u každého genotypu. Metodou spektrofotometrie nelze zcela přesně stanovit koncentraci vstupní DNA, a proto se CNV musí vztahovat vždy k referenčnímu genu u daného genotypu. Oba geny pak pochází z jednoho vzorku DNA a mají tak naprosto stejnou vstupní koncentraci.



Obrázek 21 Hodnoty absolutní kvantifikace pro gen *CYLC1*

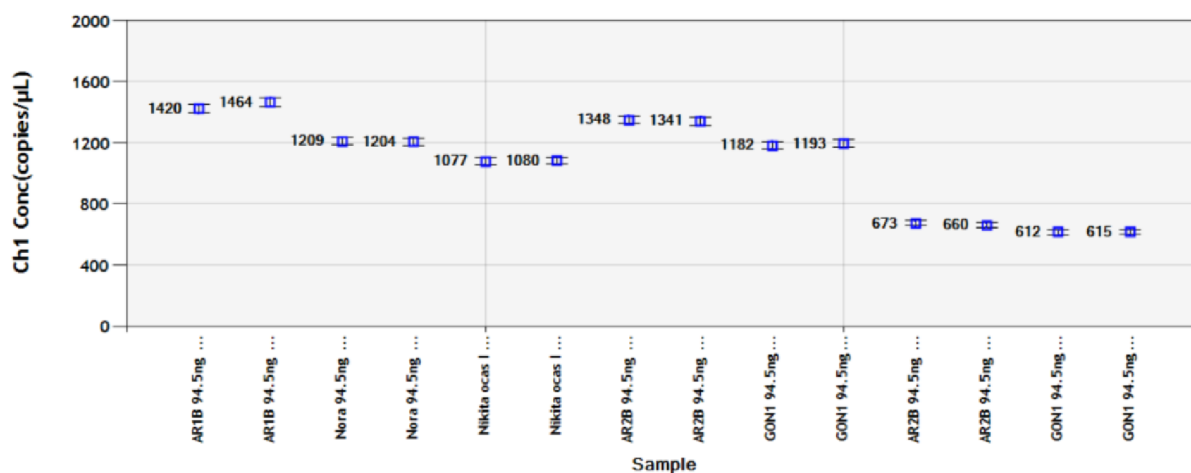
Graf na Obrázku 22 zobrazuje průměrné hodnoty absolutní kvantifikace pro gen *CYLC1*. Tyto hodnoty byly použity pro výpočet copy number variantion (CNV) (Tabulka 15).



Obrázek 22 Průměrné hodnoty absolutní kvantifikace pro gen *CYLC1*

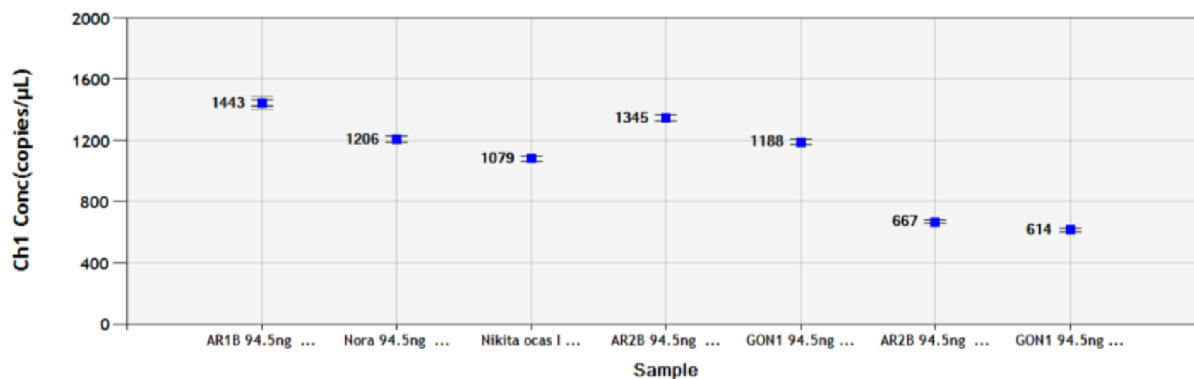
Obrázek 23 zobrazuje u testovaných jedinců absolutní počet pozitivních dropletů pro gen *MCEE*. Gen *MCEE* byl využit jako referenční gen, jelikož se nachází na autozomu a u obou pohlaví by měla být míra amplifikace tohoto genu přibližně stejná. Každému vzorku jsou opět přiřazeny dvě číselné hodnoty, protože byly vzorky analyzovány v duplikátech.

Poslední dva vzorky (AR2B a GON1) jsou vzorky samců, u kterých byl amplifikován gen *SRY*. Tyto vzorky obsahují oproti genu *MCEE* přibližně poloviční množství kopií DNA.



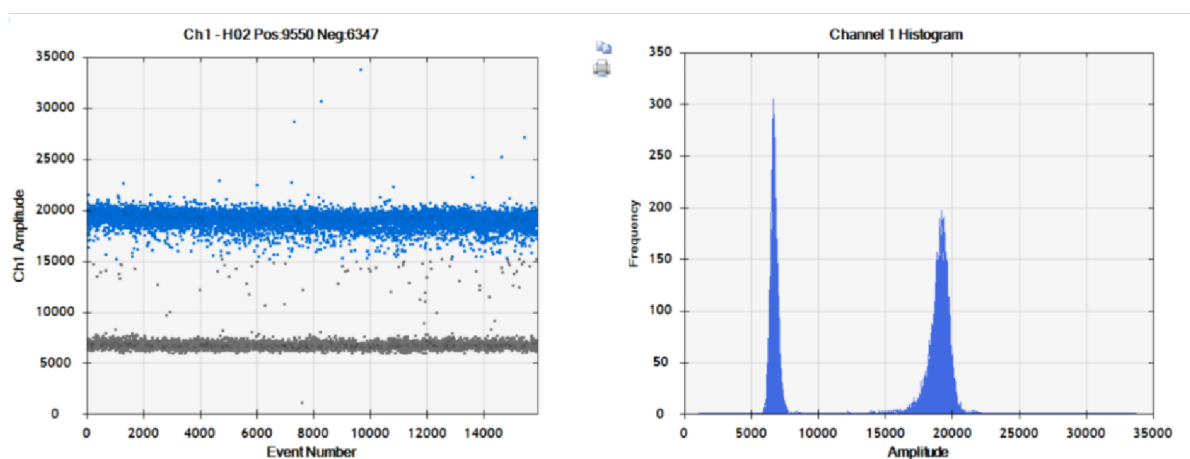
Obrázek 23 Hodnoty absolutní kvantifikace pro gen *MCEE* (AR1B, Nora, Nikita ocas I, AR2B, GON1) a pro gen *SRY* (AR2B, GON1)

Průměrné hodnoty absolutní kvantifikace pro gen *MCEE* (prvních pět vzorků) a *SRY* (poslední dva vzorky AR2B a GON1) jsou uvedeny na Obrázku 24. Tyto hodnoty byly využity k vypočítání CNV (Tabulka 15 a 16).



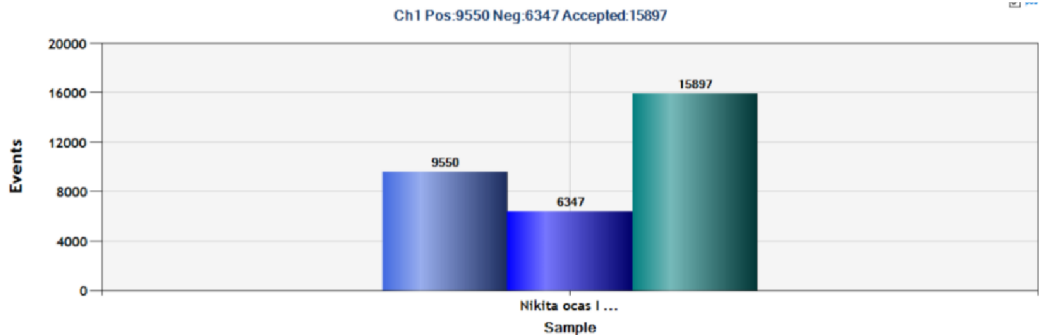
Obrázek 24 Průměrné hodnoty absolutní kvantifikace pro gen *MCEE* (AR1B, Nora, Nikita ocas I, AR2B, GON1) a *SRY* (AR2B, GON1)

Na obrázku 25 se nachází výstup z programu QuantaSoft v1.7.4. (Bio-Rad, USA) pro gen *MCEE* u jedince Nikita. Na schématu umístěném vlevo představuje každá tečka jeden droplet. Vodorovná osa zobrazuje počet událostí (výskyt každé amplitudy) a svislá osa představuje amplitudu fluorescence. Na obrázku je možné pozorovat dvě odlišné populace, v horní části grafu se nachází populace s vysokou intenzitou fluorescence (pozitivní droplety) a populace ve spodní části grafu obsahuje droplety s nízkou intenzitou (negativní droplety). Pravá část obrázku znázorňuje histogram zobrazující amplitudu fluorescence na ose X versus četnost dropletů na ose Y. Křivka pozitivních dropletů je symetrická a poměrně úzká, což naznačuje kvalitně provedenou reakci.



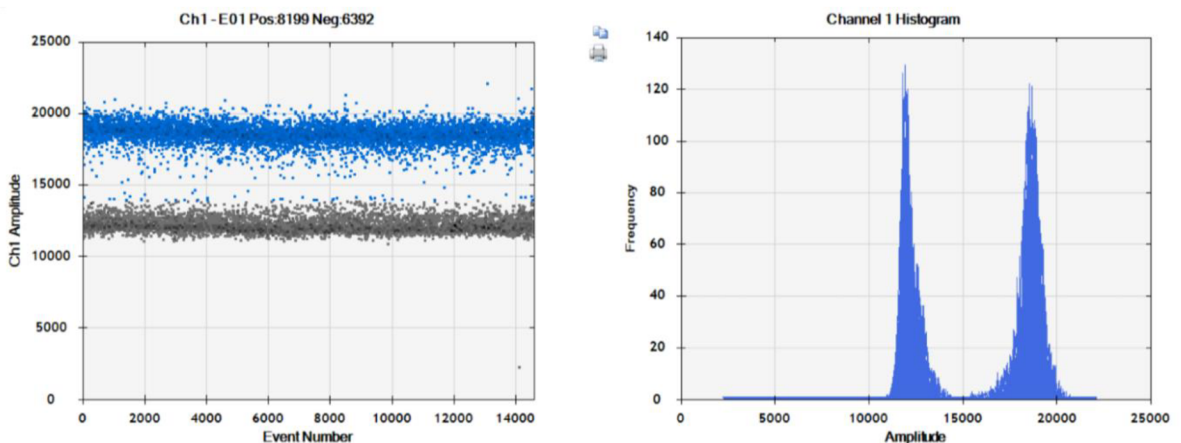
Obrázek 25 Výstup z ddPCR pro gen *MCEE* u jedince Nikita

Jak je patrné z Obrázku 26, celkem bylo pomocí ddPCR pro gen *MCEE* u jedince Nikity vytvořeno 15897 dropletů, z čehož bylo 9550 pozitivních a 6347 negativních.



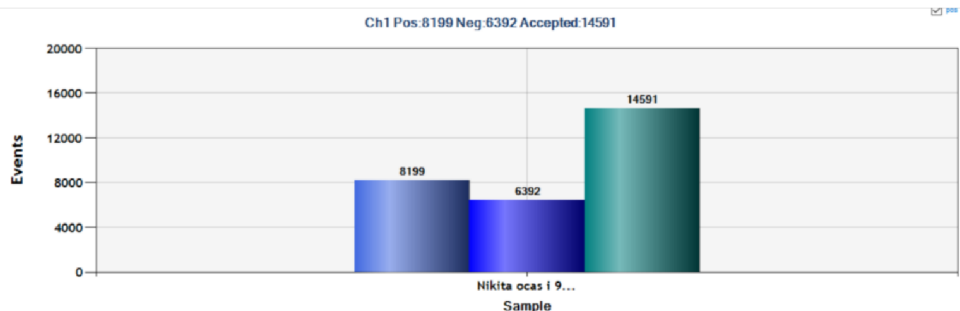
Obrázek 26 Celkový počet dropletů pro gen *MCEE* u jedince Nikita

Na obrázku 27 je zobrazena vizualizace absolutní kvantifikace pro gen *CYLC1* u jedince Nikity. V levé části obrázku se nachází schéma separace pozitivních a negativních populací dropletů. Modře jsou označeny pozitivní droplety a šedě negativní droplety. Histogram na pravé straně obrázku potvrzuje dvě oddělené populace dropletů.



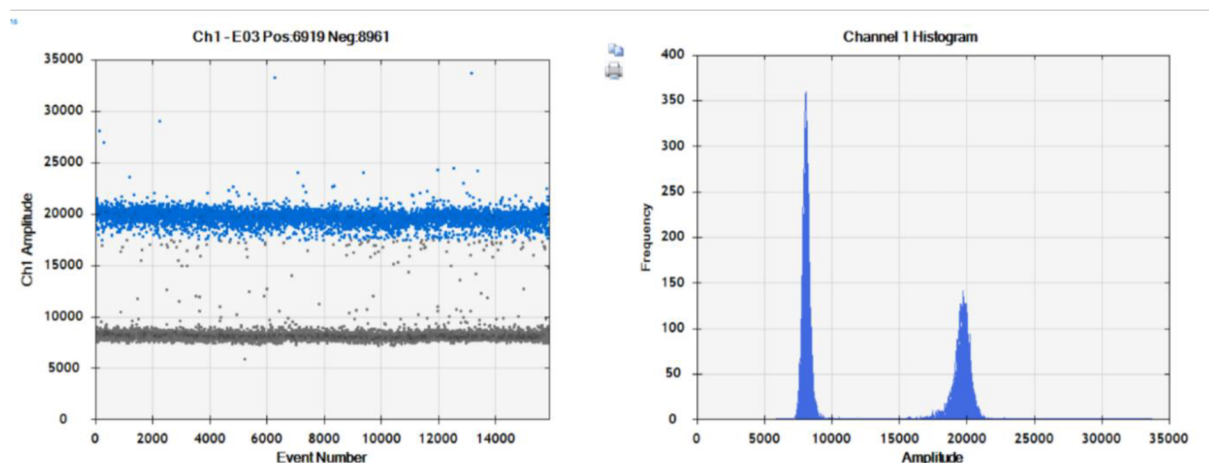
Obrázek 27 Výstup z ddPCR pro gen *CYLC1* u jedince Nikita

Na Obrázku 28 je zaznamenán celkový počet dropletů u jedince Nikity pro gen *CYLC1*. Z celkového počtu 14591 dropletů, bylo 8199 pozitivních a 6392 negativních.



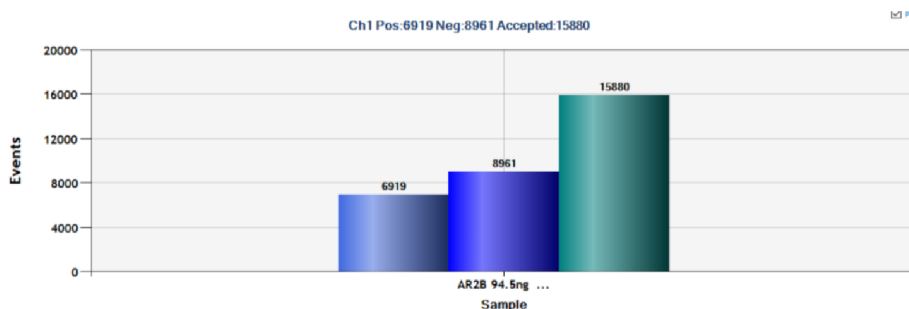
Obrázek 28 Celkový počet dropletů pro gen *CYLC1* u jedince Nikita

Obrázek 29 vizualizuje rozdělení populací pozitivních a negativních dropletů pro gen *SRY* u jedince AR2B. Modrá populace značí pozitivní droplety, šedě jsou znázorněny negativní droplety. Histogram v pravé části obrázku ukazuje, že primery HOR4F+R pro *SRY* gen amplifikovaly dobře, populace pozitivních a negativních dropletů jsou jasně oddělené.



Obrázek 29 Výstup z ddPCR pro gen *SRY* u jedince AR2B

Při absolutní kvantifikaci genu *SRY* pro jedince AR2B bylo získáno celkem 15880 dropletů, 6919 bylo pozitivních a 8961 negativních (Obrázek 30).

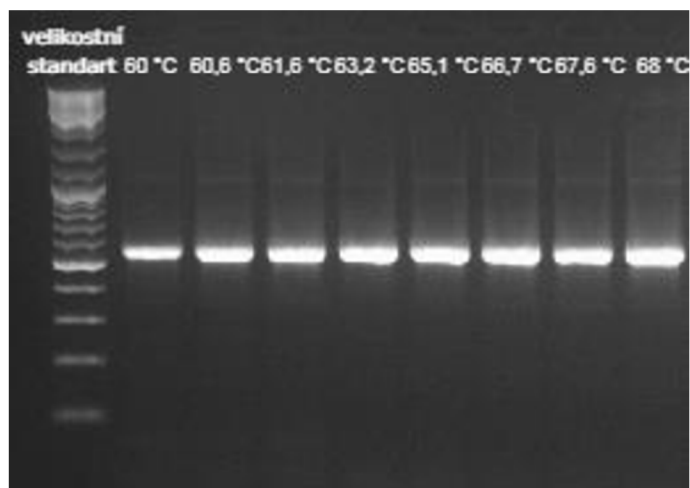


Obrázek 30 Celkový počet dropletů pro gen *SRY* u jedince AR2B

5.5 Sekvenační reakce genu pro androgenní receptor

5.5.1 Teplotní gradient pro nasedání primerů

Na základě elektroforeogramu (Obrázek 31) byla stanovena nejlepší teplota pro nasedání primerů HOR9F+R na 65,1 °C. Primery amplifikovaly dobře při všech teplotách, proto byla zvolena teplota přibližně uprostřed teplotního gradientu. U teploty 65,1 °C byl band výrazný a nebyl pozorován na elektroforeogramu šum, který by naznačoval kontaminaci nebo vznik nespecifických produktů.



Obrázek 31 Elektroforeogram pro primery HOR9F+R

5.5.2 Vyhodnocení výsledků sekvenace

V programu BioEdit version 7.2.5 byla sestavena konsenzus sekvence pro jedince Nikita. Tato sekvence byla porovnána s konsenzus sekvencí zdravého samce AR2B. Obě sekvence jsou uvedeny v Příloze 3. Na základě porovnání těchto sekvencí lze konstatovat, že u jedince Nikity se nenachází zkoumaná kauzální mutace na první pozici start kodonu c.1A>G způsobující syndrom androgenní insenzitivity.

U Nikity byla nalezena bodová mutace na pozici c.322, kde došlo k substituci alely C za alelu T. Alela C je na této pozici uvedena jako referenční v sekvenci GenBank (GCF_002863925.1) a byla detekována také u zdravého samce. Tato substituce vede k missense mutaci v proteinové sekvenci, triplet CGC je změněn na triplet TGC a dochází ke vzniku cysteinu místo původně vznikajícího argininu (Villagomez et al. 2020).

6 Diskuze

Chromozom Y se díky své složité struktuře a dynamickému vývoji v rámci evoluce řadí mezi nejméně prozkoumané části koňského genomu. Nižší míra rekombinace mezi pohlavními chromozomy vedla na chromozomu Y k nárůstu strukturálních přestaveb, postupné ztrátě některých genů a ke zmenšení jeho velikosti (Bellott et al. 2014; Waters & Ruiz-Herrera 2020). U koní dosud nebyla stanovena jeho sekvence, autoři Janečka et al. (2018) však představili anotovanou a assemblovanou sekvenci MSY oblasti. MSY je oblast na Y chromozomu, která je specifická pouze pro samce, je haploidní a neúčastní se crossingoveru. V této oblasti je lokalizován gen *SRY*, který hraje velmi důležitou roli při vývoji samčího pohlaví (Raudsepp et al. 2010). Tento gen je z obou stran ohraničen repetitivními sekvencemi a toto neobvyklé umístění může mít za následek vyšší pravděpodobnost delece genu a následnou poruchu ve vývoji pohlaví (Janečka et al. 2018).

Už v minulém století bylo u koní popsáno několik případů, u kterých se fenotypový projev pohlaví neshodoval s genotypem (Pailhoux et al. 1995; Mäkinen et al. 1999). Této problematice bylo dopřáváno postupem času stále více pozornosti a v současnosti je porucha jedinců se samičím fenotypem a karyotypem 64 XY jednou z nejčastěji se vyskytujících poruch sexuálního vývoje (Raudsepp et al. 2010). Tato porucha je označována jako syndrom androgenní insenzitivity, ačkoli u koní zatím nebyl nalezen konsenzus v názvosloví a často je možné tento syndrom najít také pod označením pseudohermafroditismus nebo intersex (Villagomez et al. 2020). Tento patologický stav se projevuje jako následek nedostatečného působení androgenů během ontogeneze u samčího pohlaví. Postižení jedinci vykazují samičí fenotyp, ale zároveň mají běžný karyotyp hřebce (Welsford et al. 2017).

Na počátku práce byla stanovena hypotéza, že jedinec Nikita by mohl trpět syndromem androgenní insenzitivity. Bylo tak tvrzeno na základě atypického chování podobnému chování samců a abnormalit vnějších pohlavních orgánů. Pro ověření této hypotézy proběhla prohlídka veterinárním lékařem, stanovení hladiny pohlavních hormonů a následně byla provedena molekulárně genetická analýza DNA za účelem určení genetického pohlaví jedince.

6.1 Veterinární vyšetření

U vyšetřovaného jedince byla prokázána nepřítomnost dělohy a byly popsány ambivalentní vnější pohlavní orgány (srostlé vnější stydké pysky, struktura podobná glans penis). V tříselném kanále byl nahmatán kulovitý útvar, který by mohl být považován za

zakrnělé varle, bohužel nebylo možné odebrat vzorky pro histologický rozbor a zjistit původ této struktury.

I přes projevy chování typického pro samce, mezi které patřilo agresivní chování vůči hřebcům a naskakování na klisny v říji, se hladiny hormonů u jedince Nikity pohybovaly v obvyklém rozmezí uváděném pro klisny. Hladina estradiolu byla stanovena na 4,9 pg/ml, což je hodnota typická pro klisny v proestru. Naměřená hodnota testosteronu byla 0,03 ng/ml a toto množství pouze nepatrně přesahuje obvyklé hodnoty uváděné pro klisny (<0,02 ng/ml) (Kent et al. 1988). Nízké až nedetekovatelné hladiny testosteronu byly popsány u jedinců s podobnými klinickými nálezy u plemene Lusitano (Torres et al. 2013) a arabský plnokrevník (Villagómez et al. 2011; Ciotola et al. 2012). Torres et al. (2013) upozorňují na možnost získání falešně negativních výsledků při měření testosteronu z důvodu jeho pulzační sekrece.

6.2 Izolace DNA

Základním krokem pro jakoukoli genetickou analýzu je kvalitně provedená izolace DNA. U koní je možné získat biologický materiál pro izolaci DNA několika způsoby, např. z krve, chlupových cibulek, stěrů bukalní sliznice nebo z exkrementů. Jak uvádí Alhaddad et al. (2019), nejlepší výtěžnosti i čistoty DNA je dosaženo izolací DNA z krve nebo z chlupových cibulek. Goossens et al. (1998) zmiňují, že mezi výtěžnostmi DNA izolované z krve a chlupových cibulek nejsou signifikantní rozdíly. Odběr chlupových cibulek je navíc neinvazivní metodou, která nemusí být prováděna veterinárním lékařem a zvíře při ní není nadměrně stresováno. Na základě výsledků bakalářské práce autorky bylo dříve zjištěno, že izolovaná DNA z chlupových cibulek nepodléhá degradaci a je možné ji dlouhodobě skladovat při teplotě -20 °C. Z těchto důvodů byla DNA v této práci izolována z chlupových cibulek pomocí komerčně dostupného kitu NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, Německo). Touto metodou izolace bylo získáno dostatečné množství kvalitní DNA pro následné kroky experimentu.

6.3 Genotypizace

Pro určení genetického pohlaví u jedince Nikity bylo přistoupeno k amplifikaci markerů pro geny *SRY* a *AMEL* pomocí PCR. Oba tyto geny jsou běžně využívány v laboratořích po celém světě jak pro obvyklé určení pohlaví u koní, tak pro prokázání pohlaví u jedinců, kteří vykazují netypické chování nebo neobvyklý fenotypový projev (Martinez et al. 2020).

Marker HOR4 pro určení pohlaví pomocí genu *SRY* byl navržen do nehomologní části Y chromozomu. K amplifikaci tohoto markeru dochází pouze u samců vznikem produktu

velkého 200 bp (Tabulka 1). U všech samčích vzorků v této práci proběhla amplifikace úspěšně a po vizualizaci na gelu byl dobře patrný band očekávané velikosti. U samičích vzorků nebylo možné na gelu pozorovat žádný produkt. Vzorek Nikity byl označen jako samičí, protože u ní opakovaně nedošlo k amplifikaci a je tedy možné konstatovat, že nemá gen *SRY*. Nepřítomnost genu *SRY* popsal také Torres et al. (2013) u klisny plemene Lusitano, která vykazovala anatomické abnormality pohlavních orgánů a projevy samčího chování podobně jako Nikita. Peretti et al. (2020) publikovali stejné výsledky u klisny arabského plnokrevníka, u kterého byla v břišní dutině nalezena varlata. Jedinci, kteří vykazují samčí chování a anatomické abnormality pohlavních orgánů a zároveň mají samičí genotyp, bývají v literatuře označováni jako XX, *SRY* negativní (Villagómez et al. 2011).

Jelikož při amplifikaci markeru HOR4 genu *SRY* u samičích vzorků nevzniká žádný produkt, je doporučeno provádět kontrolní amplifikaci jiného markeru pro potvrzení, zda reakce proběhla úspěšně (Hasewaga et al. 2000).

V případě této práce byl jako druhý marker pro určení pohlaví použit gen pro amelogenin (marker HOR10). Tento gen je jako marker pro účely identifikace pohlaví využíván u koní (Hasewaga et al. 2000; Kakoi et al. 2005; Martinez et al. 2020), prasat (Fontanesi et al. 2008), skotu (Das et al. 2019) i lidí (Dash et al. 2020). Gen pro amelogenin se u koní nachází na homologním úseku obou pohlavních chromozomů. U samců je přítomna delece o délce 24 bp, která je detekovatelná pomocí gelové elektroforézy (Hasewaga et al. 2000). V rámci této práce byly pro tento gen navrženy specifické primery HOR10F a R. Nově navržené primery amplifikovaly produkty jiné délky (146, 170 bp) než primery v práci Hasewaga et al. (2000) (160, 184 bp). Obě sady primerů však byly schopny rozeznat delecii 24 bp na chromozomu Y a je tak možné je pro rozlišení pohlaví využívat. Po amplifikaci markeru HOR10 u samců vznikly dva produkty očekávaných velikostí (Tabulka 1), *AMELY* dlouhý 146 bp a *AMELX* o velikosti 170 bp. U samic vznikl pouze jeden produkt *AMELX* o délce 170 bp. Nikita i v tomto případě odpovídala samičímu genotypu, protože u jejího vzorku bylo možné pozorovat na gelu jeden band o velikosti 170 bp (Obrázek 14). Martinez et al. (2020) upozorňuje na možnost chybné identifikace pohlaví pomocí genu pro amelogenin, v jejich práci byla popsána problematika falešné pozitivivity u XY *SRY* negativních jedinců. Zároveň však zmiňují, že míra chybovosti byla mezi všemi testovanými jedinci velmi nízká (0,0077 %).

6.4 Relativní kvantifikace

Většina molekulárních metod identifikace pohlaví spočívá v amplifikaci pohlavně specifických genů nebo homologních genů a následné detekci delecí na gelové elektroforéze.

Tyto metody jsou účinné, ale časově i finančně náročné (Ballester et al. 2013), proto byla navržena metoda stanovení pohlaví na základě relativní kvantifikace pomocí qPCR. Pro účely relativní kvantifikace byly navrženy tři markery pro geny Cylicin-1 (*CYLC1*), Sex-determining region Y (*SRY*) a autozomální gen Methylmalonyl-CoA epimerase (*MCEE*).

Pro ověření spolehlivosti metody byla využita DNA dvaceti jedinců, deseti samců a deseti samic. Pro gen Cylicin-1 byla u samců očekávána poloviční míra amplifikace genu než u samic, jelikož je tento gen umístěn na nehomologní části X chromozomu a tato hypotéza byla potvrzena. Ballester et al. (2013) využili tuto metodu k determinaci pohlaví u prasat pomocí genu *GPM6B*, který se nachází na nehomologní části X chromozomu stejně jako gen Cylicin-1. Autoři pozorovali stejné výsledky, u samců dosahovala míra amplifikace genu poloviční míry oproti samicím. U koní byla metoda relativní kvantifikace pomocí qPCR použita také pro stanovení pohlaví plodu z krve březích klisen Leon et al. (2012). Autoři vidí výhodu detekce pohlaví pomocí qPCR hlavně v citlivosti metody a také v eliminaci rizika kontaminace, jelikož vzorky nemusí být žádným způsobem dále analyzovány.

U jedinců samčího pohlaví bylo dále provedeno porovnání míry amplifikace genů *CYLC1* a *SRY*. Oba geny se u samců nachází v jedné kopii a míra jejich amplifikace by měla být přibližně stejná. Po úspěšné amplifikaci oba geny vykazovaly přibližně stejnou hodnotu relativní kvantifikace a bylo tak potvrzeno, že se u samců nachází jeden X a jeden Y chromozom. Stejná metoda byla využita v pracích Bolzon et al. (2016) a Welsford et al. (2017) k určení pohlaví u jedinců s podezřením na syndrom androgenní insenzitivity.

Analýza pomocí qPCR potvrdila předchozí výsledky genotypizace, u jedince Nikity byla prokázána přítomnost dvou chromozomů X.

6.5 Absolutní kvantifikace

Pro potvrzení výsledků získaných relativní kvantifikací bylo provedeno ověření pomocí dropletové digitální PCR (ddPCR). Tato metoda je schopná velmi citlivě detekovat absolutní počet molekul DNA a je využívána napříč obory pro absolutní kvantifikaci DNA (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006).

Castaneda et al. (2022) využili metodu absolutní kvantifikace ve své práci při stanovování počtu copy number variation (CNV) u genů nacházejících se v koňské MSY oblasti. Důležitým zjištěním této práce bylo, že u většiny z 209 testovaných jedinců se nacházel gen *SRY* ve formě single-copy. Multicopy forma genu *SRY* byla detekována pouze u 4 plemen koní (mongolský kůň, estonský klepper, jakutský kůň a Zemaitukai), která měla dvě nebo tři kopie tohoto genu.

V rámci této práce bylo provedeno porovnání množství kopií DNA fragmentu genu *SRY* (marker HOR4) s autozomálním genem *MCEE* (marker HOR7), u genu *SRY* bylo očekáváno přibližně poloviční množství kopií DNA. Výsledky získané pomocí ddPCR se shodovaly s výsledky získanými z qPCR, fragment genu *SRY* byl amplifikován oproti genu *MCEE* v polovičním množství.

Hodnota copy number variation (CNV) u genu *Cylicin-1* (marker HOR1) byla u samců přibližně poloviční než u samic, což potvrzuje přítomnost jedné kopie chromozomu X u samců a dvou kopií chromozomu X u samic. Stejnou metodu detekce využili ve své práci Szczerbal et al. (2020) k diagnostice X monosomie u klisen. Autoři nejprve detekovali počet X chromozomů pomocí klasické PCR a poté pomocí ddPCR hodnotili počet CNV u genu *AMELX*, který je vázaný na chromozom X.

6.6 Sekvenační reakce

Pro ověření výše uvedených výsledků byla provedena metoda sekvenace části genu pro androgenní receptor pomocí Sangerovy metody. V tomto genu bylo dosud popsáno u koní 5 kauzálních mutací.

V roce 2012 byla popsána první mutace autory Révay et al. (2012) u plemene americký quater horse. Jednalo se o záměnu adeninu za guanin v první pozici start kodonu AR genu (c.1A>G) a tato mutace byla označena jako první spojení mezi klinickými nálezy a AIS u koní. Tato kauzální mutace byla testována v této diplomové práci, její přítomnost se však neprokázala. U klisny Nikity byla nalezena bodová mutace c.322C>T, která má za následek změnu kódované aminokyseliny z argininu na cystein. Tato mutace byla popsána i autory Révay et al. (2012), ti ji označili za „tichou“ mutaci, která nezpůsobuje žádné problémy ve vývoji pohlaví. Autoři navíc zmiňují, že u jiných savčích druhů se na této pozici AR proteinu běžně nachází cystein a díky tomu, že oblast není příliš konzervovaná, nemá případná záměna aminokyselin takový dopad.

Tuto mutaci zmiňují ve své práci i Bolzon et al. (2016), kteří popsali na pozici c.322 alelu T u šesti jedinců plemene anglický plnokrevník trpících symptomy syndromu androgenní insenzitivity. Na základě studia rodokmenu jedinců autoři však vyloučili možnost, aby tato substituce byla kauzální pro vznik AIS. U rodiny koní popsané v práci Bolzon et al. (2016), byla za kauzální označena substituce v exonu 4 na pozici c.2042G>C, která vedla k záměně tripletu kódujícího tryptofan za triplet pro serin (p.Trp681Ser). Zaměněné aminokyseliny mají velmi rozdílné chemické vlastnosti a předpokládá se, že nahrazení tryptofanu serinem vede k nepříznivým změnám ve funkci proteinu.

První delece (c.1630_1654del) v genu pro androgenní receptor byla popsána autory Welsford et al. (2017). Předpokládá se, že delece koncových 25 bp v druhém exonu vede ke ztrátě 8 kódujících kodonů (p.Val544_Glu551del) a je kauzální pro vznik syndromu androgenní insenzitivity. Autoři ve své práci také zmiňují výskyt substituce c.322C>T u 4 teplokrevných jedinců trpících AIS. Shodují se však s názorem Bolzon et al. (2016) a označují tuto bodovou mutaci za nekauzální.

V roce 2020 byly popsány dvě nejnovější mutace v AR genu autory Villagomez et al. (2020). V prvním případě se jedná o delecii nacházející se v exonu 1 (c.183delT), která mění kodon kódující serin (AGT) na kodon (AG-). Posun čtecího rámce vede k vytvoření předčasného stop kodonu na pozici 452. nukleotidu a dává vzniknout zkrácené formě proteinu (Ser61SerfsTer89).

V druhém případě byla identifikována mutace v exonu 5 (c.2132C>T), která vedla k záměně kodonů (GCC)>(GTC). Jedná se o missense záměnu alaninu za valin (p.Ala711Val), která je lokalizovaná ve vysoce konzervované oblasti LBD domény. U lidí se nejvíce popsaných kauzálních mutací v genu pro androgenní receptor nachází právě v této oblasti, proto se autoři studie přiklání k názoru, že i u koní může tato mutace způsobovat syndrom androgenní insenzitivity (Villagomez et al. 2020).

V rámci této diplomové práce byla testována přítomnost mutace na první pozici start kodonu (c.1A>G), která byla publikována v práci Révay et al. (2012). Tato mutace byla zvolena, protože byla popsána u jedince stejného plemene jako je klisna Nikita. Přítomnost ostatních mutací nebyla v této práci ověřována a je tak možné v budoucnu navázat na tuto práci a pokračovat ve výzkumu příčiny netypického chování i ambivalentních pohlavních orgánů u klisny Nikity.

6.7 Shrnutí

Na základě klinického vyšetření a molekulární analýzy může být porucha sexuálního vývoje u jedince Nikity označena jako XX SRY negativní sex-reversal syndrom (Villagomez et al. 2011). Autoři Peretti et al. (2020) popsali podobné nálezy u klisny arabského plnokrevníka a Bannasch et al. (2007) u jedince plemene americký jezdecký kůň. Autoři se shodují, že není možné určit přesný genetický mechanismus, kvůli kterému dochází k vývoji varlat a maskulinizaci jedince bez přítomnosti genu *SRY*. Bannasch et al. (2007) popisují jako jednu z možných příčin autozomální mutací a zároveň zmiňují, že maskulinizace jedince by mohla být zapříčiněna i podáváním androgenů klisně v průběhu březosti. Podle Peretti et al. (2020) by dalším důvodem mohla být změna v expresi genu *SOX9*. Regulační doména, která je klíčová

pro gonadální expresi a normální funkci genu *SOX9*, zahrnuje více než 1 Mbp před samotným genem (Benko et al. 2011). Peretti et al. (2020) se domnívají, že narušení některé z regulačních oblastí před genem *SOX9* by mohlo vést ke zvýšení exprese genu a být jedním z důvodů poruchy sexuálního vývoje. Duplikace genu *SOX9* byly popsány u XX SRY-negativních jedinců s poruchami sexuálního vývoje u psů (Rossi et al. 2014; Albarella et al. 2020) i u lidí (Li et al. 2014).

Poruchy sexuálního vývoje mají jak genetickou, tak fenotypovou heterogenitu a je velmi těžké přesně určit, o jakou poruchu se jedná. U jedince Nikity byla prokázána přítomnost dvou chromozomů X a nepřítomnost chromozomu Y a lze tedy konstatovat, že se jedná o klisnu. Zároveň u ní nebyla nalezena vybraná kauzální mutace v genu pro androgenní receptor a není tak možné určit, z jakého důvodu vykazuje netypické projevy chování. Tato práce dokazuje, že oblast poruch sexuálního vývoje je nejen u koní velmi široká a je třeba ji dále věnovat pozornost.

7 Závěr

V literární rešerši byly shromážděny aktuální poznatky týkající se koňského genomu. Na základě studia odborné literatury byl charakterizován androgenní receptor, byla popsána jeho stavba a funkce. Mutace v genu pro androgenní receptor mohou vést k poruše sexuálního vývoje zvané syndrom androgenní insenzitivity (AIS). Tento syndrom byl detailně popsán včetně jeho výskytu u koní i u lidí. V závěru literární rešerše byly zmapovány metody využívající se k analýze a diagnostice syndromu androgenní insenzitivity.

Na základě bioinformatické studie gonozómů X a Y byly navrženy specifické markery do homologních (marker HOR10 pro gen *AMEL*) i nehomologních (marker HOR4 pro gen *SRY*) úseků gonozómů. Po optimalizaci metody a úspěšné amplifikaci byla provedena determinace pohlaví u testovaného jedince. První vědecká hypotéza byla vyvrácena, výsledky amplifikace obou markerů u jedince Nikity určily samičí pohlaví.

Pro potvrzení získaných výsledků byla navržena metoda relativní kvantifikace pomocí qPCR. Byla srovnávána kvantita amplikonů nacházejících se na gonozómech (geny *CYLC1* a *SRY*) s kvantitou referenčního genu *MCEE*. Gen *CYLC1* nacházející se na X chromozomu byl amplifikován u samčího pohlaví v poloviční míře oproti autozomálnímu genu *MCEE*. Byla tak potvrzena hypotéza předpokládající, že pomocí metody relativní kvantifikace je možné rozlišit pohlaví jedinců. Relativní kvantifikace zároveň potvrdila výsledky genotypizace, u jedince Nikity se chromozom X nacházel ve dvou kopiích a lze tedy prohlásit, že se jedná o klisnu.

V rámci kontroly výsledků pokusu byla použita metoda ddPCR, která je považována za jednu z nejpřesnějších metod absolutní kvantifikace. Po úspěšné amplifikaci byl stanoven absolutní počet molekul DNA ve vzorku klisny Nikity i ostatních kontrolních vzorků.

Dále byla provedena sekvenace části genu pro androgenní receptor z důvodu možné přítomnosti mutace na první pozici start kodonu. Po bioinformatické analýze získaných sekvencí bylo zjištěno, že v daném místě se mutace nenachází a byla tak vyvrácena hypotéza o přítomnosti kauzální mutace v tomto genu. Byla nalezena bodová mutace c.322C>T, která však podle dostupné literatury není kauzální pro vznik syndromu androgenní insenzitivity.

Ačkoli v diplomové práci nedošlo k potvrzení hypotézy přítomnosti kauzální mutace způsobující AIS, lze metody navržené v této práci využít k determinaci pohlaví u koní i v dalších výzkumech. Problematika poruch sexuálního vývoje je velice rozsáhlá a jak tato práce dokazuje, je těžké najít konkrétní příčinu vzniku poruchy. Je třeba pokračovat v systematickém výzkumu k lepšímu porozumění této oblasti a objasnění dalších příčin poruch sexuálního vývoje.

8 Bibliografie

Aiman J, Griffin J, Gazak J, Wilson J, MacDonald P. 1979. Androgen Insensitivity as a Cause of Infertility in Otherwise Normal Men. *New England Journal of Medicine* **vol. 300**:223-227. Available from <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197902013000503> (accessed 2022-11-06).

Albarella S, Lorenzi L, Rossi E, Prisco F, Riccardi M, Restucci B, Ciotola F, Parma P. 2020. Analysis of XX SRY-Negative Sex Reversal Dogs. *Animals* **vol. 10**. Available from <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/9/1667> (accessed 2023-01-22).

Alhaddad H, Maraqa T, Alabdulghafour S, Alaskar H, Alaqeely R, Almathen F, Alhajeri B, Palsson A. 2019. Quality and quantity of dromedary camel DNA sampled from whole-blood, saliva, and tail-hair. *PLOS ONE* **vol. 14**. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0211743> (accessed 2023-01-29).

Arya M, Shergill I, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel H. 2014. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **vol. 5**:209-219. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737159.5.2.209> (accessed 2023-01-11).

Audi L et al. 2010. Novel (60%) and Recurrent (40%) Androgen Receptor Gene Mutations in a Series of 59 Patients with a 46,XY Disorder of Sex Development. *J Clin Endocrinol Metab* **vol. 95**:1876-88. Available from <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2009-2146> (accessed 2022-11-06).

Ballester M, Castelló A, Ramayo-Caldas Y, Folch J. 2013. A Quantitative Real-Time PCR Method Using an X-Linked Gene for Sex Typing in Pigs. *Molecular Biotechnology* **vol. 54**:493-496. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s12033-012-9589-5> (accessed 2023-01-24).

Bannasch D, Rinaldo C, Millon L, Latson K, Spangler T, Hubberty S, Galuppo L, Lowenstine L. 2007. SRY negative 64,XX intersex phenotype in an American saddlebred horse. *The Veterinary Journal* **vol. 173**:437-439. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109002330500290X> (accessed 2023-01-22).

Bellott D et al. 2014. Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* **vol. 508**:494-499.

Benko S et al. 2011. Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *Journal of Medical Genetics* **vol. 48**:825-30.

Bio-Rad Laboratories, Inc. QX100 Droplet Digital PCR System Guide. Bio-Rad; Pleasanton, Calif: 2012.

Bio-Rad Laboratories, Inc. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad; Pleasanton, Calif: 2006.

Bolzon C, Joonè C, Schulman M, Harper C, Villagómez D, King W, Révay T. 2016. Missense Mutation in the Ligand-Binding Domain of the Horse Androgen Receptor Gene in a Thoroughbred Family with Inherited 64,XY (SRY) Disorder of Sex Development. *Sexual*

Development **vol. 10**:37-44. Available from <https://www.karger.com/Article/FullText/444991> (accessed 2022-11-06).

Brock T, Freeze H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. *Journal of Bacteriology* **vol. 98**:289-297. Available from <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.98.1.289-297.1969> (accessed 2023-02-02).

Brown C, Greally J. 2003. A stain upon the silence: genes escaping X inactivation. *Trends in Genetics* **vol. 19**:432-438. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016895250300177X> (accessed 2022-10-26).

Callewaert L, Christiaens V, Haelens A, Verrijdt G, Verhoeven G, Claessens F. 2003. Implications of a polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **vol. 306**:46-52. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X03009021> (accessed 2022-10-26).

Castaneda C, Radović L, Felkel S, Juras R, Davis B, Cothran E, Wallner B, Raudsepp T, Bannasch D. 2022. Copy number variation of horse Y chromosome genes in normal equine populations and in horses with abnormal sex development and subfertility: relationship of copy number variations with Y haplogroups: relationship of copy number variations with Y haplogroups. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **vol. 12**. Available from <https://academic.oup.com/g3journal/article/doi/10.1093/g3journal/jkac278/6760232> (accessed 2023-01-23).

Ciotola F, Albarella S, Pasolini M, Auletta L, Esposito L, Iannuzzi L, Peretti V. 2012. Molecular and Cytogenetic Studies in a Case of XX SRY-Negative Sex Reversal in an Arabian Horse. *Sexual Development* **vol. 6**:104-107. Available from <https://www.karger.com/Article/FullText/331480> (accessed 2023-02-12).

Dash H, Rawat N, Das S. 2020. Alternatives to amelogenin markers for sex determination in humans and their forensic relevance. *Molecular Biology Reports* **vol. 47**:2347-2360. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s11033-020-05268-y> (accessed 2023-01-22).

Das P, Krishnan G, Doley J, Bhattacharya D, Deb S, Chakravarty P, DAS P. 2019. Establishing gene Amelogenin as sex-specific marker in yak by genomic approach. *Journal of Genetics* **vol. 98**. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s12041-019-1061-x> (accessed 2023-01-22).

Davey R, Grossmann M. 2016. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev* **37**:3-15. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4810760/> (accessed 2022-10-26).

Dieffenbach C, Lowe T, Dveksler G. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Research* **vol. 3**:S30-S37. Available from <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.3.3.S30> (accessed 2023-01-11).

Ennis S, Gallagher T. 1994. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics* **vol. 25**:425-427. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2052.1994.tb00533.x> (accessed 2023-01-24).

Fialová E, Zdeňková K, Jablonská E, Demnerová K, Ovesná J. 2019. Digitální PCR: princip a aplikace. *Chemické Listy* **113**:545–552. Available from <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3452> (accessed 2023-01-12).

Fontanesi L, Scotti E, Russo V. 2008. Differences of the porcine amelogenin X and Y chromosome genes (AMELX and AMELY) and their application for sex determination in pigs. *Molecular Reproduction and Development* **vol. 75**:1662-1668. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.20903> (accessed 2023-01-22).

Fukushima Y, Mukoyama H, Sato F, Hasegawa T, Ishida N, Muramatsu S. 1999. Sex Determination of Equine Somatic and Germ Cells by PCR Amplification Based on the Sequence Polymorphism of X- and Y-Chromosomal Amelogenin Genes. *Nihon Chikusan Gakkaiho* **vol. 70**:6-10. Available from http://www.jstage.jst.go.jp/article/chikusan1924/70/7/70_7_6/_article/-char/ja/ (accessed 2022-11-06).

Gao W, Bohl C, Dalton J. 2005. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chemical Reviews* **vol. 105**:3352-3370. Available from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr020456u> (accessed 2022-11-05).

Gaunitz C et al. 2018. Ancient genomes revisit the ancestry of domestic and Przewalski's horses. *Science* **vol. 360**:111-114. Available from <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aao3297> (accessed 2022-10-26).

Goossens B, Waits L, Taberlet P. 1998. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Molecular Ecology* **vol. 7**:1237-1241. Available from <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-294x.1998.00407.x> (accessed 2023-01-29).

Gulía C et al. 2018. Androgen insensitivity syndrome. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **22**:3873-3887. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29949163/> (accessed 2022-11-06).

Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.

Hård T, Kellenbach E, Boelens R, Maler B, Dahlman K, Freedman L, Carlstedt-Duke J, Yamamoto K, Gustafsson J, Kaptein R. 1990. Solution Structure of the Glucocorticoid Receptor DNA-Binding Domain. *Science* **vol. 249**:157-160. Available from <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2115209> (accessed 2022-10-28).

Hasewaga T, Sato F, Ishida N, Fukushima Y, Mukoyama H. 2000. Sex Determination by Simultaneous Amplification of Equine SRY and Amelogenin Genes. *Journal of Veterinary Medical Science* **vol. 62**:1109-1110. Available from http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/62/10/62_10_1109/_article (accessed 2022-11-06).

Heemers H, Tindall D. 2007. Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex. *Endocrine Reviews* **vol. 28**:778-808. Available from <https://academic.oup.com/edrv/article/28/7/778/2355017> (accessed 2022-10-31).

Heid C, Stevens J, Livak K, Williams P. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **vol. 6**:986-994. Available from <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.6.10.986> (accessed 2023-01-11).

Hughes J et al. 2012. Strict evolutionary conservation followed rapid gene loss on human and rhesus Y chromosomes. *Nature* **vol. 483**:82-86. Available from <http://www.nature.com/articles/nature10843> (accessed 2022-10-26).

Chang C, Kokontis J, Liao S. 1988. Molecular Cloning of Human and Rat Complementary DNA Encoding Androgen Receptors. *Science* **vol. 240**:324-326. Available from <https://www.science.org/doi/10.1126/science.3353726> (accessed 2022-10-26).

Iannuzzi L, Meo G, Perucatti A, Incarnato D, Peretti V, Ciotola F, Barbieri V. 2014. An improved characterization of horse (*Equus caballus*, 2n =64) chromosomes by using replicating G and R banding patterns. *Caryologia* **vol. 56**:205-211. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00087114.2003.10589326> (accessed 2023-03-19).

Janečka J et al. 2018. Horse Y chromosome assembly displays unique evolutionary features and putative stallion fertility genes. *Nature Communications* **vol. 9**. Available from <http://www.nature.com/articles/s41467-018-05290-6> (accessed 2022-10-26).

Jenster G, van der Korput H, Trapman J, Brinkmann A. 1995. Identification of Two Transcription Activation Units in the N-terminal Domain of the Human Androgen Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **vol. 270**:7341-7346. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818717687> (accessed 2022-10-26).

Kakoi H, Hirota K, Gawahara H, Kurosawa M, Kuwajima M. 2005. Genetic diagnosis of sex chromosome aberrations in horses based on parentage test by microsatellite DNA and analysis of X- and Y-linked markers. *Equine Veterinary Journal* **vol. 37**:143-147. Available from <http://doi.wiley.com/10.2746/0425164054223787> (accessed 2023-01-22).

Kalbfleisch T et al. 2018. Improved reference genome for the domestic horse increases assembly contiguity and composition. *Communications Biology* **vol. 1**. Available from <http://www.nature.com/articles/s42003-018-0199-z> (accessed 2022-10-26).

Kent M, Schneller H, Hegsted R, Johnston S, Wachtel S. 1988. Concentration of serum testosterone in XY sex reversed horses. *Journal of Endocrinological Investigation* **vol. 11**:609-613. Available from <http://link.springer.com/10.1007/BF03350191> (accessed 2023-02-17).

Lee P, Houk C, Ahmed S, Hughes I. 2006. Consensus Statement on Management of Intersex Disorders. *Pediatrics* **vol. 118**:e488-e500. Available from <https://publications.aap.org/pediatrics/article/118/2/e488/69037/Consensus-Statement-on-Management-of-Intersex> (accessed 2022-11-05).

Lemma S, Avnet S, Salerno M, Chano T, Baldini N, Castresana J. 2016. Identification and Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis of Cancer Stem Cells. *PLOS ONE* **vol. 11**. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0149481> (accessed 2023-02-02).

- Leon P, Campos V, Dellagostin O, Deschamps J, Seixas F, Collares T. 2012. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). *Theriogenology* **vol. 77**:694-698. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X11004638> (accessed 2023-01-25).
- Lindzey J, Vijay Kumar M, Grossman M, Young C, Tindall D. 1994. Molecular Mechanisms of Androgen Action. *Advances in Research and Applications - Steroids*:383-432. Elsevier. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672908611516> (accessed 2022-10-31).
- Li T, Wu Q, Zhang C, Li W, Zhou Q, Jiang W, Cui Y, Xia X, Shi Y. 2014. 46,XX testicular disorder of sexual development with SRY-negative caused by some unidentified mechanisms: a case report and review of the literature. *BMC Urology* **vol. 14**. Available from <https://bmcurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2490-14-104> (accessed 2023-01-22).
- Lorenz T. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. Available from <http://www.jove.com/video/3998/> (accessed 2023-01-11).
- Mäkinen A, Hasewaga T, Mäkilä M, Katila T. 1999. Infertility in two mares with XY and XXX sex chromosomes. *Equine Veterinary Journal* **vol. 31**:346-349. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.1999.tb03829.x> (accessed 2022-11-05).
- Martinez M, Costa M, Ratti C. 2020. Molecular screening of XY SRY -negative sex reversal cases in horses revealed anomalies in amelogenin testing. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **vol. 32**:938-941. Available from <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638720952380> (accessed 2023-01-19).
- Matlock B. 2015. Assessment of Nucleic Acid Purity. Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA. Available from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- Mongan N, Tadokoro-Cuccaro R, Bunch T, Hughes I. 2015. Androgen insensitivity syndrome. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **vol. 29**:569-580. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X15000287> (accessed 2022-11-06).
- Monteiro da Silva E, Zanzarini Delfiol D, Fabris V, Mendonça Santos B, Nogueira G, Oliveira Guimarães G, Paulo de Oliveira Nogueira P, Lima Silveira da Mota L. 2020. Teratoma Associated With Testicular Tissue in a Female-Like Horse With 64,XY (SRY-Positive) Disorder of Sex Development. *Journal of Equine Veterinary Science* **vol. 92**. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080620302689> (accessed 2022-11-05).
- Morris J. 1953. The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphrodites. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **vol. 65**:1192-1211. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002937853903597> (accessed 2022-11-06).
- Murray JD. 2002. Horse genomics and reproduction. *Theriogenology* 58:281-293.

- Nagare S, Chaudhari R, Birangane R, Parkarwar P. 2018. Sex determination in forensic identification, a review. *Journal of Forensic Dental Sciences* **vol. 10**. Available from <http://www.jfds.org/text.asp?2018/10/2/61/249646> (accessed 2023-01-24).
- Pailhoux E, Crihiu E, Parma P, Cotinot C. 1995. Molecular Analysis of an XY Mare with Gonadal Dysgenesis. *Hereditas* **vol. 122**:109-112. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-5223.1995.00109.x> (accessed 2022-11-05).
- Paria N et al. 2011. A Gene Catalogue of the Euchromatic Male-Specific Region of the Horse Y Chromosome: Comparison with Human and Other Mammals. *PLoS ONE* **vol. 6**. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021374> (accessed 2022-10-26).
- Peretti V, Satué K, Ciotola F, Cristarella S, De Majo M, Biondi V, D'Anza E, Albarella S, Quartuccio M. 2020. An Unusual Case of Testicular Disorder in Sex Development of Arabian Mare (64,XX SRY-Negative). *Animals* **vol. 10**. Available from <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/11/1963> (accessed 2023-02-01).
- Petersen J et al. 2013. Genetic Diversity in the Modern Horse Illustrated from Genome-Wide SNP Data. *PLoS ONE* **vol. 8**. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0054997> (accessed 2022-10-26).
- Pfeiffer I, Brenig B. 2005. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Genetics* **vol. 6**. Available from <http://bmcbgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-6-16> (accessed 2023-01-24).
- Proverbs-Singh T, Feldman J, Morris M, Autio K, Traina T. 2015. Targeting the androgen receptor in prostate and breast cancer: several new agents in development. *Endocrine-Related Cancer* **vol. 22**:R87-R106. Available from <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/22/3/R87.xml> (accessed 2022-10-28).
- Quan P, Sauzade M, Brouzes E. 2018. dPCR: A Technology Review. *Sensors* **vol. 18**. Available from <http://www.mdpi.com/1424-8220/18/4/1271> (accessed 2023-01-12).
- Raudsepp T, Durkin K, Lear T, Das P, Avila F, Kachroo P, Chowdhary B. 2010. Molecular heterogeneity of XY sex reversal in horses. *Animal Genetics* **vol. 41**:41-52. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2052.2010.02101.x> (accessed 2022-11-05).
- Raudsepp T, Finno C, Bellone R, Petersen J. 2019. Ten years of the horse reference genome: insights into equine biology, domestication and population dynamics in the post-genome era. *Animal Genetics* **vol. 50**:569-597. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/age.12857> (accessed 2022-10-26).
- Raudsepp T, Chowdhary B. 2016. The Eutherian Pseudoautosomal Region. *Cytogenetic and Genome Research* **vol. 147**:81-94. Available from <https://www.karger.com/Article/FullText/443157> (accessed 2022-10-26).
- Raudsepp T, Santani A, Wallner B, Kata S, Ren C, Zhang H, Womack J, Skow L, Chowdhary B. 2004. A detailed physical map of the horse Y chromosome. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences **vol. 101**:9321-9326. Available from <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0403011101> (accessed 2022-11-06).

Raudsepp T, Chowdhary B. 2008. The horse pseudoautosomal region (PAR): characterization and comparison with the human, chimp and mouse PARs. *Cytogenetic and Genome Research* **vol. 121**:102-109. Available from <https://www.karger.com/Article/FullText/125835> (accessed 2022-10-26).

Révay T, Villagómez D, Brewer D, Chenier T, King W. 2012. GTG Mutation in the Start Codon of the Androgen Receptor Gene in a Family of Horses with 64,XY Disorder of Sex Development. *Sexual Development* **vol. 6**:108-116. Available from <https://www.karger.com/Article/FullText/334049> (accessed 2022-11-07).

Richer C, Power M, Klunder L, McFeely R, Kent M. 1990. Standard karyotype of the domestic horse (*Equus caballus*). *Hereditas* **vol. 112**:289-293. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-5223.1990.tb00069.x> (accessed 2022-11-05).

Rosewater S. 1965. Familial Gynecomastia. *Annals of Internal Medicine* **vol. 63**. Available from <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-63-3-377> (accessed 2022-11-06).

Rossi E et al. 2014. Sox9 Duplications Are a Relevant Cause of Sry-Negative XX Sex Reversal Dogs. *PLoS ONE* **vol. 9**. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0101244> (accessed 2023-01-22).

Rozen S, Skaletsky H. 1999. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols* **132**:365-386. Humana Press, New Jersey. Available from <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-192-2:365> (accessed 2023-02-01).

Seifi M, Ghasemi A, Heidarzadeh S, Khosravi M, Namipashaki A, Mehri V, Alizadeh A, Danaei N. 2012. Overview of Real-Time PCR Principles. *Polymerase Chain Reaction*:405-434. InTech. Available from <http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/overview-of-real-time-pcr-principles> (accessed 2023-01-11).

Senese C, Penedo M, Shiue Y, Bowling A, Millon L. 1999. A HaeIII PCR-RFLP in the ZFY/ZFX genes of horses. *Animal Genetics* **vol. 30**:390-391. Available from <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2052.1999.00526-10.x> (accessed 2022-11-06).

Shaffer P, Jivan A, Dollins D, Claessens F, Gewirth D. 2004. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **vol. 101**:4758-4763. Available from <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0401123101> (accessed 2022-10-28).

Shafi A, Yen A, Weigel N. 2013. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. **vol. 140**:223-238. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725813001496> (accessed 2022-10-28).

Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow P. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **vol. 346**:240-244. Available from <http://www.nature.com/articles/346240a0> (accessed 2022-10-26).

Skaletsky H et al. 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **vol. 423**:825-837. Available from <http://www.nature.com/articles/Art39> (accessed 2022-10-26).

Skinner B et al. 2016. The pig X and Y Chromosomes: structure, sequence, and evolution. *Genome Research* **vol. 26**:130-139. Available from <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.188839.114> (accessed 2022-10-26).

Soh Y et al. 2014. Sequencing the Mouse Y Chromosome Reveals Convergent Gene Acquisition and Amplification on Both Sex Chromosomes. *Cell* **vol. 159**:800-813. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414012409> (accessed 2022-10-26).

Szczerbal I, Nowacka-Woszek J, Kopp-Kuhlman C, Mackowski M, Switonski M. 2020. Application of droplet digital PCR in diagnosing of X monosomy in mares. *Equine Veterinary Journal* **vol. 52**:627-631. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evj.13214> (accessed 2023-01-26).

Tan M, Li J, Xu H, Melcher K, Yong E. 2015. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* **vol. 36**:3-23. Available from <http://www.nature.com/articles/aps201418> (accessed 2022-10-28).

Tiersch T, Chandler R, Wachtel S, Elias S. 1989. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry* **vol. 10**:706-710. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.990100606> (accessed 2023-01-07).

Torres A, Silva J, Bernardes N, Sales Luís J, Lopes da Costa L. 2013. 64, XX, SRY-negative, Testicular DSD Syndrome in a Lusitano Horse. *Reproduction in Domestic Animals* **vol. 48**:e33-e37. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12094> (accessed 2023-01-20).

Valasek M, Repa J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* **vol. 29**:151-159. Available from <https://www.physiology.org/doi/10.1152/advan.00019.2005> (accessed 2023-01-11).

Villagómez D, Lear T, Chenier T, Lee S, McGee R, Cahill J, Foster R, Reyes E, St John E, King W. 2011. Equine Disorders of Sexual Development in 17 Mares Including XX, SRY-Negative, XY, SRY-Negative and XY, SRY-Positive Genotypes. *Sexual Development* **vol. 5**:16-25. Available from <https://www.karger.com/Article/FullText/322811> (accessed 2022-11-06).

Villagomez D, Welsford E, King W, Revay T. 2020. Androgen Receptor Gene Variants in New Cases of Equine Androgen Insensitivity Syndrome. *Genes* **vol. 11**. Available from <https://www.mdpi.com/2073-4425/11/1/78> (accessed 2022-11-06).

Wade C et al. 2009. Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. *Science* **vol. 326**:865-867. Available from <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1178158> (accessed 2022-10-26).

- Wang L, Hsu C, Chang C. 2005. Androgen receptor corepressors: An overview. *The Prostate* **vol. 63**:117-130. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.20170> (accessed 2022-10-31).
- Warinner C, Korzow Richter K, Collins M. 2022. Paleoproteomics. *Chemical Reviews* **vol. 122**:13401-13446. Available from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.1c00703> (accessed 2023-01-24).
- Waters P, Ruiz-Herrera A. 2020. Meiotic Executioner Genes Protect the Y from Extinction. *Trends in Genetics* **vol. 36**:728-738. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952520301542> (accessed 2023-01-26).
- Welsford G, Munk R, Villagómez D, Hyttel P, King W, Revay T. 2017. Androgen Insensitivity Syndrome in a Family of Warmblood Horses Caused by a 25-bp Deletion of the DNA-Binding Domain of the Androgen Receptor Gene. *Sexual Development* **vol. 11**:40-45. Available from <https://www.karger.com/Article/FullText/455114> (accessed 2022-11-06).
- Wilfinger W, Mackey K, Chomczynski P. 1997. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques* **vol. 22**:474-481. Available from <https://www.future-science.com/doi/10.2144/97223st01> (accessed 2023-01-08).
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. (2012) “Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.” *BMC Bioinformatics* 13:134.
- Zhou D, Xu H, Shen X, Gu R, Chen Y, Chen G, Li P, Shi H, Sun X, Xin A. 2022. Complete androgen insensitivity syndrome caused by a novel mutation in the androgen receptor gene and its mechanism. *Clinica Chimica Acta* **vol. 531**:94-99. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898122001127> (accessed 2022-10-26).
- Zoubeidi A, Zardan A, Beraldi E, Fazli L, Sowery R, Rennie P, Nelson C, Gleave M. 2007. Cooperative Interactions between Androgen Receptor (AR) and Heat-Shock Protein 27 Facilitate AR Transcriptional Activity. *Cancer Research* **vol. 67**:10455-10465. Available from <https://aacrjournals.org/cancerres/article/67/21/10455/533583/Cooperative-Interactions-between-Androgen-Receptor> (accessed 2022-10-28).

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

- AIS – androgen insensitivity syndrome, Syndrom androgenní insenzitivity
- AR – androgenní receptor
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- RNA – ribonukleová kyselina
- MSY region – male specific region, oblast na Y chromozomu specifická pro samce
- bp – base pair, komplementární pár bází
- Gbp – giga-base pair, miliarda párů bází
- Mbp – mega-base pair, milion párů bází
- kb – kilo-base, tisíc párů bází
- kDa – kilodalton
- PAR – pseudoautozomální oblast
- L1 LINE - long interspersed element-1, dlouhé vmezeřené elementy-1
- DSD – disorder of sexual development, porucha sexuálního vývoje
- FISH – Fluorescenční hybridizace in situ
- ER – estrogenový receptor
- PR – progesteronový receptor
- GR – glukokortikoidní receptor
- MR – mineralokortikoidní receptor
- NTD – N-koncová doména androgenního receptoru
- DBD – DNA-vazebná doména androgenního receptoru
- LBD – ligand-vazebná doména androgenního receptoru
- AF-1, AF-2 – transkripčně aktivační oblast 1 a 2
- ARE – androgen responsive elements, androgen-responzivní elementy
- H – hinge region
- NLS – nuclear localization signal, jaderní lokalizační signál
- HSP – heat-shock proteins, proteiny teplotního šoku
- DHT – 5 α -dihydrotestosteron
- CAIS – kompletní syndrom androgenní insenzitivity
- PAIS – syndrom částečné androgenní insenzitivity
- MAIS – mírný syndrom androgenní insenzitivity
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce
- ddPCR – dropletová digitální PCR
- HMG – high mobility proteins
- CNV – copy number variation

10 Samostatné přílohy

10.1 Tabulka koncentrace a čistoty DNA všech jedinců

SAMCI			
označení vzorku	plemeno	koncentrace DNA [ng/μl]	čistota DNA A260/280
AR2B	arabský plnokrevník	82	1,80
HUC4	huculský kůň	17,5	1,84
HUC7	huculský kůň	18,5	1,85
HUC9	huculský kůň	13	1,62
HUC11	huculský kůň	17	1,89
APPA18	appaloosa	22,5	1,80
APPA19	appaloosa	13,5	1,69
GON 1	neznámý původ	465	1,81
GON 3	neznámý původ	383	1,82
GON 4	neznámý původ	1024	1,80
SAMICE			
označení vzorku	plemeno	koncentrace DNA [ng/μl]	čistota DNA A260/280
Nikita hřiva I	quater horse	14,5	1,80
Nikita hřiva II	quater horse	21,5	1,90
Nikita ocas I	quater horse	21,5	1,96
Nora	welsh pony	52,5	1,80
AR1B	arabský plnokrevník	47	1,80
2B	huculský kůň	24	1,77
3B	huculský kůň	52	1,89
4B	huculský kůň	37	1,89
5B	huculský kůň	16,5	1,73
6B	huculský kůň	129	1,96
8B	huculský kůň	23,5	1,88
9B	huculský kůň	30	1,87
HUC12B	huculský kůň	294	1,93
HUC13B	huculský kůň	31,5	1,91
HUC14B	huculský kůň	48	1,92
Escape Dona	neznámý původ	23,5	1,81

10.2 Veterinární zpráva

MVDr. Monika Aujezdská
Oulehla 527
Lysice
679 71
KVL: 6191
IČO: 01903799

Věc: Veterinární zpráva

anamnéza: typ: teplokrevný, pohlaví: hermafrodit /klisna?, datum narození: 26.4.2008, jméno: Nikita

Vyšetření 1.12.2022: Klinické vyšetření koně zaměřeno na účel určení pohlaví– jedná se o křížence plemene appaloosa, BSC 3, vyšetření zevních pohlavních orgánů: pod anem ventrálně ve vzdálenosti cca 25 cm se nachází struktura anatomicky podobná glans penis s vývodem močové trubice. V prostoru mezi „glans penis“ a anem je řasa pravděpodobně rudimentem srostlých vnějších stydkých pysků. V regio inguinalis rudiment obou mléčných žláz včetně obou ze stran oploštělých struků. Palpací v levém tříselném kanále nahmatán kulovitý útvar cca 6cm průměr, mohlo by se jednat o zakrnělé varle.

Koni byla odebrána krev pro vyšetření pohlavních hormonů s výsledkem:
Estradiol: <18 pmol/l
Progesteron: 0,29 nmol/l
Testosteron: <0,09 nmol/l

Vyšetření 25.1.2023 – rektální usg vyšetření přístrojem WED-300V, sondou 6.5 MHz prokázalo pouze nepřítomnost dělohy a vagíny. Pro potvrzení či vyvrácení přítomnosti rudimetárních vaječníků by bylo nutné udělat vyšetření na specializované klinice pomocí transdermálního ultrazvuku.

Závěr: Dle hormonální skladby se jedná s největší pravděpodobností o klisnu. Ovšem vzhledem k tomu, že jsme v terénních podmínkách nenašli dostupnou zobrazovací metodou pohlavní orgány, nelze to tvrdit s jistotou.

10.3 Sekvence části genu pro androgenní receptor

Sekvence Nikita

AGGACTACCGCATCA CAGCCTGTTGAACTCTTCTCAGCAAAGAAGGGGAGGCTGGATAAAGGAAT
TAGGTGGAAGATTCAGCCAAGCTCCAGGATG GAGGTGCAGTTAGGGCTGGGGAGGGTCTACCCCC
GGCCACCGTCCAAGACCTATCGAGGAGCTTTCCAGAACCTGTTCCAGAGTGTGCGCGAAGTGATCCA
GAACCCGGGCCCCCGGCACCCTGAAGCCGCGAGCGCAGCACCTCCCGGCGCCATTTGCAGCAGCA
ACAGGAGACCAGTCCCAGGCAGCAGCAGCAGCAGGGTGAGGATGGCTCACCTCAAACCCAGAGCA
GAGGCCCCACAGGCTACCTGGCCCTGGAGGAGGAACAGCAGCCTTACAACAGCCCTCAGCCCCG
AGGGCCACCCGGAGAGCGGTGCGTCCCAGAGGCCAGAGCCGCCTTGGCCGCCGCAAGGGGCTG
CAGCAGCAGCCACCAGCACCTCCGGACGAGGATGACTCAGCTGCCCCATCCACGTTGTCCCTGCTGG
GCCCACT

Sekvence AR2B (zdravý samec)

GACTACCGCATCA CAGCCTGTTGAACTCTTCTCAGCAAAGAAGGGGAGGCTGGATAAAGGAATT
AGGTGGAAGATTCAGCCAAGCTCCAGGATG GAGGTGCAGTTAGGGCTGGGGAGGGTCTACCCCCG
GCCACCGTCCAAGACCTATCGAGGAGCTTTCCAGAACCTGTTCCAGAGTGTGCGCGAAGTGATCCAG
AACCCGGGCCCCCGGCACCCTGAAGCCGCGAGCGCAGCACCTCCCGGCGCCATTTGCAGCAGCAA
CAGGAGACCAGTCCCAGGCAGCAGCAGCAGCAGGGTGAGGATGGCTCACCTCAAACCCAGAGCAG
AGGCCCCACAGGCTACCTGGCCCTGGAGGAGGAACAGCAGCCTTACAACAGCCCTCAGCCCCGA
GGGCCACCCGGAGAGCGGTGCGTCCCAGAGGCCAGAGCCGCCTTGGCCGCCGCAAGGGGCTGC
AGCAGCAGCCACCAGCACCTCCGGACGAGGATGACTCAGCTGCCCCATCCACGTTGTCCCTGCTGGG
CCCACCTTTCCAGGCTTAAGCAGCTGAAC

část sekvence primerů HOR9

start kodon s nenalezenou mutací na 1. místě tripletu

substituce na pozici c.322C>T