

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



Agronomická
fakulta

Mendelova
univerzita
v Brně



**Studium sekvencí genů zbarvení u činčil na základě
homologie se sekvencemi člověka a myši**

Diplomová práce

Vedoucí práce:
prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

Vypracovala:
Michala Poslušná

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci Studium sekvencí genů zbarvení u činčil na základě homologie se sekvencemi člověka a myši vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Nejprve poděkuji panu prof. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za ochotnou a odbornou spolupráci při procesu tvorby této diplomové práce, za rady, čas a nadšení pro danou problematiku. Dále děkuji paní chovatelce Žanetě Vondráčkové za pomoc v problematice barevných mutací činčil. Poslední poděkování patří rodině a blízkým přátelům za podporu a trpělivost během psaní této práce.

ABSTRAKT

U domestikovaných zvířat se vyskytují různá zbarvení srsti a množství mutací v různých genech, často spojených s pleiotropními efekty. Cílem této práce nazvané Studium sekvencí genů zbarvení u činčil na základě homologie se sekvencemi člověka a myši bylo popsat molekulárně genetickou podstatu pigmentace, uvést geny účastnící se melanogeneze a ovlivňující funkci melaninů, jejich strukturu, mutace a zmínit další mutace, které mění fenotyp. Informace o alelách *TYR*, *TYRP1*, *TYRP2/DCT*, *ASIP* (*agouti*), *AGRP*, skupině genů *MCR* (*MC1R-MC5R*) a dalších jsou zaměřeny na člověka (*Homo sapiens*), myš domácí (*Mus musculus*) a činčilu vlnatou (*Chinchilla lanigera*). U těchto tří druhů bylo provedeno porovnání sekvencí vybraných genů *TYR* a *TYRP2/DCT*, výsledky byly prostudovány, okomentovány a byly vyznačeny mutace, které jsou velice specifické, u některých však existují analogy mezi člověkem a myši.

Klíčová slova: barevná mutace, činčila vlnatá, člověk, melanogeneze, mutace, myš, pigment, sekvence, *TYR*, *TYRP2/DCT*, zbarvení srsti.

ABSTRACT

In domesticated animals there are many different coat colours and mutations, often connected with pleiotropic effects. The aim of this thesis named The study of colour genes sequences in chinchilla based on homology of human and mice sequences was describe molecular genetic principles of pigmentation, introduce genes involved in melanogenesis and influencing a melanin function, their structure, mutations and mention other mutations which change the phenotype. Informations about alleles *TYR*, *TYRP1*, *TYRP2/DCT*, *agouti*, *AGRP*, gene group *MCR* (*MC1R-MC5R*) and more are focused on human (*Homo sapiens*), mouse (*Mus musculus*) and chinchilla (*Chinchilla lanigera*). In these three species was compared selected genes sequences *TYR* and *TYRP2/DCT*, results were studied, commented and mutations, which are very specific, but there are some analogs between human and mouse, were highlighted.

Keywords: chinchilla lanigera, coat colour, colour mutation, human, melanogenesis, mutation, mouse, pigment, sequence, *TYR*, *TYRP2/DCT*.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární přehled	10
3.1	Zbarvení savců a příčiny fenotypové variability	10
3.1.1	Vliv domestikace na variabilitu zbarvení u zvířat	10
3.1.2	Genetická variabilita a příčiny jejího vzniku	11
3.1.2.1	Mutace dle vlivu na fenotyp	12
3.1.2.2	Mutace dle vlivu na genetický materiál	14
3.1.2.3	Reverze mutace	17
3.1.2.4	Epigenetické jevy ovlivňující fenotypovou variabilitu	19
3.1.2.5	Rekombinace	21
3.1.2.6	Reparace DNA	22
3.2	Molekulárně-genetické založení zbarvení savců	23
3.2.1	Buňky produkující melanin - melanocyty	24
3.2.2	Vznik melaninových buněk - melanogeneze	25
3.2.3	Vznik a produkce melaninů	27
3.2.4	Tyrosináza jako gen a enzym	29
3.2.5	Tyrosináze příbuzné proteiny	31
3.2.6	Další proteiny účastníci se melanogeneze	32
3.2.7	Mutace genů ovlivňujících zbarvení	33
3.2.7.1	Mutace <i>TYR</i> a dalších genů s vlivem na vznik pigmentace u člověka a dalších savců	33
3.2.7.2	Mutace genu <i>Tyr</i> a dalších genů s vlivem na fenotyp u myší	35
3.2.8	Hormonální stimulatory melanogeneze	38
3.2.9	Melanokortinové receptory	39
3.2.9.1	Gen <i>MC1R</i>	39

3.2.9.2	Geny <i>MC2R</i> - <i>MC5R</i>	40
3.2.10	Antagonisté melanokortinu	42
3.2.10.1	Agouti protein	42
3.2.10.2	Agouti příbuzný protein	43
3.3	Shrnutí genetiky zbarvení u studovaných druhů savců	44
3.4	Variabilita zbarvení činčil dle současných chovatelů	46
3.4.1	Základní barevné mutace činčil	46
3.4.1.1	Mutace <i>Beige</i>	47
3.4.1.2	Mutace <i>Black Velvet</i>	47
3.4.1.3	Mutace <i>Wilson White</i>	48
3.4.1.4	Základní mutace <i>Standard Grey</i>	48
3.4.1.5	Recesivní mutace <i>Sapphire, Violet a Charcoal</i>	48
3.4.1.6	„Carrier“ neboli nositel genu	49
3.4.1.7	Gen <i>Ebony</i>	49
3.4.1.8	Hybridní mutace	50
4	Materiál a metodika	52
5	Výsledky a diskuze	53
5.1	Studium sekvencí genu tyrosinázy (<i>TYR</i>)	53
5.2	Studium sekvencí dopachrom tautomerázy/tyrosin-příbuzného proteinu 2 (<i>DCT/TYRP2</i>)	69
6	Závěr	85
7	Zdroje	87
	Přílohy	

1 ÚVOD

Divoká zvířata v přírodě mívají takové zbarvení, aby byla co nejméně nápadná a splývala s okolím v rámci vlastního bezpečí. Člověk však domestikací způsobil, že se více začala objevovat zvířata s nápadnějším zbarvením srsti, mnoha barev či barevných vzorů a tyto populace se kvůli atraktivnosti stále rozšiřovaly. Změnil se tedy i genetický základ zbarvení a začalo se objevovat více mutací, které ovlivňují výsledný fenotyp. Výsledkem může být zajímavé zbarvení zvířete nebo atraktivní barevný vzor, který s sebou ale může nést negativní následky z důvodu provázanosti některých mutací s pleiotrofními efekty, které se u savců často vyskytují (například obezita, poruchy reprodukce, hluchota, citlivost kůže atd.). U člověka způsobují mutace genů ovlivňujících pigmentaci nejčastěji albinismus nebo červené vlasy, u myši se zase objevuje vedle albinismu i světlejší zbarvení oproti původnímu (wildtype) fenotypu, barevné vzory v srsti a mutace jsou provázeny hojnými pleiotrofními efekty. Pro přiblížení a lokaci těchto mutací bylo potřeba proniknout až do samé molekulárně genetické podstaty zbarvení savců a zmínit důležité geny, které jsou zahrnuty v melanogenezi, v procesu vzniku melaninů (eumelaninu a feomelaninu) a v metabolických drahách ovlivňujících tyto procesy. Jedná se hlavně o geny *ASIP*, *AGRP*, *TYR*, *TYRP1*, *DCT/TYRP2*, *MC1R*, *P/OCA2*, *PMEL17* a *SLC45A2*, které mají své homology u myši (ve stejném pořadí): *agouti*, *Agrp*, *albino*, *brown*, *slaty*, *extension*, *pink-eyed dilute*, *silver* a *underwhite* lokusy. Myš obecně slouží jako modelový organismus pro výzkumy všech různých zaměření a i v této práci byla použita pro porovnání sekvencí genů ovlivňujících zbarvení se sekvencemi genů člověka a činčily vlnaté, aby mohly být na konci vyvozeny závěry, na kolik jsou si genomy těchto tří savců podobné. Jednalo se konkrétně o geny *TYR* a *DCT*.

2 CÍL PRÁCE

Činčila vlnatá je zvíře mnoha barevných mutací, ale nikdo se zatím příliš nezabýval genetickou podstatou jejího zbarvení. Chovatelé se řídí hlavně fenotypem a pro geny mají vlastní systém pojmenování právě dle fenotypu. Genotyp zvířat tedy určují zpětně podle rodičů a řídí se principy mendelistické dědičnosti. Cílem této práce bylo vyhledat a zpracovat zdroje o zbarvení srsti u myši a činčil a o pigmentaci kůže a vlasů u člověka, sumarizovat informace z různých zdrojů ohledně molekulárně genetické podstaty zbarvení savců, genů, které zbarvení ovlivňují, dále ohledně mutací objevujících se v genomech savců a popsat barevné mutace činčil a systém, jakým se řídí chovatelé při určování genetické podstaty zbarvení jejich zvířat. Cílem experimentální části práce bylo pomocí bioinformatických nástrojů vyhledat na základě homologie sekvencí vybraných genů zbarvení srsti u člověka a myši stejné sekvence u činčily a zjistit podobnost mezi jednotlivými zkoumanými geny, identifikovat základní geny zbarvení u činčil a pomocí bioinformatických nástrojů identifikovat jednotlivé oblasti v těchto genech (s využitím databází NCBI, Mouse Genome Informatics, Next-Gen Chinchilla a jiné).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Zbarvení savců a příčiny fenotypové variability

Zástupce každého živočišného druhu prošel od počátku své existence na planetě dlouhým vývojem plným změn, buď rozsáhlých a zcela měnících anatomii i fyziologii zvířete či jen malých a zvíře se během miliónů let téměř nezměnilo. Vývojové změny jsou výsledkem evoluce a adaptace na prostředí a jedná se například o změnu tělesných rozměrů, změnu utváření končetin (např. kůň – z pětiprsté končetiny se evolucí vyvinula končetina zakončená jediným prstem) a ve většině případů je vývoj doprovázen změnou fenotypu a zbarvení zvířete. U šelem, které mají jako prioritu lovit kořist pro svou obživu, je typické maskovací zbarvení, přizpůsobené co nejlépe prostředí, ve kterém se pohybují a loví, aby byly co nejméně nápadné a zvýšila se tak jejich šance na úspěch. Proto je například většina kočkovitých šelem zbarvena skvrnitě, srst obsahuje černou a různé odstíny hnědé barvy, od tmavé po pískově žlutou či plavou, aby splynuly s prostředím savany. Stejně tak se býložravci (například zebra) chrání před predátory pruhovaným zbarvením, které má v kombinaci s vysokým počtem jedinců ve stádě opticky zmást nepřítele, aby se nemohl zaměřit na konkrétní zvíře. Podobně funguje u stádových zvířat i plášťové zbarvení. U mnoha ptáků zase můžeme pozorovat výrazný pohlavní dimorfismus, vyjádřený mimo jiné zbarvením, kdy samice je hnědá, co nejvíce splyvá s prostředím, aby mohla bezpečně sedět na vejcích, naproti tomu samec je co nejpestřeji zbarven, aby zaujal samici v době páření (ALDERTON, 2011; HARRIS a SWINNEY, 2011; LLEWELLYNOVÁ, 2011; ZIEGLER, 2014).

3.1.1 Vliv domestikace na variabilitu zbarvení u zvířat

Různorodost zbarvení je přímo ovlivněna domestikací a je tedy zásadním rozdílem mezi domestikovanými a divokými zvířaty. Divoká zvířata jsou ve svém fenotypu uniformní a objevují se v konkrétních, pro ně specifických zbarveních či vzorech srsti, zatímco pro domestikovaná zvířata je charakteristická velká alelická variabilita genů spojených se zbarvením, tedy i variabilita zbarvení a vzorů srsti. Genetická variabilita je předpokladem pro selekci, pro kterou je však potřeba kombinovat informace z různých oborů: šlechtění zvířat, zoologie či molekulární biologie a doplňovat je o údaje o pleiotropních efektech mutací spojených s barvou srsti, které mohou mít i patologické účinky. U mnoha druhů domácích či hospodářských zvířat probíhá řízená selekce zaměřená přímo na určité zbarvení (například starokladrubští koně jsou selektováni

výhradně na černou a bílou barvu srsti bez odznaků) nebo se provádí vyřazování z chovu zvířat s nežádoucím zbarvením nebo nepovoleným pro dané plemeno. Selekcce probíhá již od samého počátku domestikace a postupem času a vědeckého pokroku bylo možné selektovat ne jen na základě samotného fenotypu, ale i dle genetického založení jedince a vznikala spousta studií. Bylo objeveno a popsáno více než 300 lokusů a identifikováno přes 150 genů spojených s barvou srsti, na což má vliv i různý stupeň pigmentace. Bylo zjištěno, že podobná zbarvení srsti u různých druhů zvířat mohou být projevem několika stejných genů a zároveň různé geny mohou být zodpovědné za velice podobné zbarvení u různých jedinců či druhů. V současnosti je genetická rozmanitost redukována inbreedingem (ve šlechtění je kladen důraz na zvyšování homozygotnosti v populaci a tím co největší přiblížení se standardu daného plemene), podobně jako tomu bylo na počátku domestikace, kdy byla izolována malá skupina zástupců druhů z jejich předků, tudíž všechna domestikovaná zvířata byla ovlivněna úzkou genetickou základnou. Vliv měla také skutečnost, že domestikačních center bylo jen několik a z nich se pak zvířata šířila dál. Postupem času, rozšiřováním druhů do nových podmínek prostředí a s novými nároky kladenými člověkem na zvířata vznikaly nové alelické varianty pro adaptaci, změny vzhledu, konstituce a dalších, hlavně užitkových vlastností. Příkladem velkých změn je například kuň, který byl domestikován pro maso a mléko a s vývojem nároků na něj se stal transportním, válečným a následně sportovně využívaným zvířetem pro volný čas a rekreaci (CIESLAK *et al.*, 2011; HARRIS a SWINNEY, 2011).

3.1.2 Genetická variabilita a příčiny jejího vzniku

Mutace je většinou náhodný a neadaptivní proces, který je zdrojem genetické variability a bez ní by nedocházelo k evoluci. Evoluce je tedy řízena hlavně mutacemi v nekódujících částech genomu zodpovědnými za regulaci genové exprese (HEADON, 2015). Poprvé byl termín uveden Hugem de Vries, který použil termín v roce 1903 k popisu náhlých diskontinuálních změn během vývoje nových druhů živočichů. Mutace jakožto modifikace genů se mohou týkat jednoho genu (tzv. genové mutace), celého chromozomu (tzv. chromozomové mutace) nebo celého genomu (tzv. genomové mutace či aneuploidie). Ty jsou více zaznamatelné a zahrnují ztrátu či vznik celých chromozomů. Mutace genů jsou změny vázané k jednotlivému genu. Mnoho z nich je škodlivých, ale některé jsou neškodné či užitečné. Mohou se objevit u všech živých

organismů včetně virů. Mutace je dědičná a mění genetický materiál a to znamená, že vznikají nové genetické varianty. V podstatě dochází k chybám při přenosu genetické informace, přestože je proces tvořen velkým množstvím kontrol a oprav. Bez mutací by neexistovaly alely, všechny geny by byly ve stejné formě a živočichové by nebyli schopni evoluce a adaptace na prostředí. Může to být přímo změna genetického materiálu či proces, při kterém změna vzniká. Nejvýznamnějšími změnami jsou nukleotidové substituce (transice a transverze), inserce a delece (ROSYPAL *et al.*, 1989; SNUSTAD, 2009; WEAVER a HENDRICK, 1997).

3.1.2.1 Mutace dle vlivu na fenotyp

Mutace s účinkem na fenotyp lze rozdělit podle toho, v jakém stadiu vývoje živého organismu vznikají. Jejich účinky závisí na dominanci, typu buněk, ve kterých vznikají, a ve kterých obdobích života organismu se projeví. Mutace díky degenerovanému genetickému kódu nemají v mnoha případech na fenotyp vliv. Většinou jsou však recesivní a škodlivé. Například ty, které mutují geny řídící metabolismus, jsou škodlivé tím, že blokují některou z metabolických drah v důsledku toho, že změny v párování bází způsobují změny v sekvencích aminokyselin a tím mohou vznikat nefunkční produkty. Mutace může mít vliv na fenotyp mizivý, zjištělný jen biochemickými analýzami (geny, které obsahují tyto mutace, jsou tzv. izoalely) nebo také výrazný, kdy dochází k rozsáhlým morfologickým změnám, někdy až k letalitě. Mutace vzniká uvnitř genu vytvoří vždy novou alelu toho genu. Pokud se produkty mutovaných genů netvoří nebo nejsou funkční, pak se jedná o tzv. nulové alely (SNUSTAD, 2009; WEAVER a HENDRICK, 1997).

Buňky zárodečné (terminální) linie (gametické buňky) u vyšších organismů, ze kterých vznikají gamety, jsou na začátku vývoje organismu odděleny od buněk nezárodečných neboli somatických. Tedy podle toho, u jakých buněk se mutace vyskytují, se dělí na mutace gametické (u zárodečných buněk) a somatické (u buněk nezárodečných). Hlavními faktory, které určují pravděpodobnost projevu gametické mutace v organismu, jsou její dominance a stadium cyklu reprodukce. Vznikají u mnohobuněčných organismů, které se rozmnožují pohlavně. Mohou vznikat mutace v DNA pohlavních buněk a mutovaný fenotyp bude patrný na potomstvu. Efekt dominantní gametické mutace se projeví ihned na potomstvu. Pokud je recesivní, efekt je potlačen (diploidní stav). Mutace může vzniknout během celého cyklu reprodukce.

Když vznikne v gametě, mutantní alelu bude mít pravděpodobně jen jeden z potomků. Pokud vznikne v primordiální terminální linii pohlavních buněk, může se zmutovaná alela dostat i do několika gamet, což znamená vyšší pravděpodobnost jejího přetrvávání a následně přenosu do dalších generací. Historicky prvním příkladem gametické dominantní mutace je případ berana s výrazně kratšíma nohama na farmě v USA (1791), který následně založil novou linii. Výhodou totiž bylo, že takovéto ovce nepřeskočily ohradník. U mutací somatických (vznik ze somatických buněk, ne zárodečných), bude fenotypový projev patrný pouze u následníků přímo těchto buněk, takže mohou měnit fenotyp jedince, ale nebudou se přenášet zárodečnými buňkami na potomky. Z toho vyplývá, že pokud mutace nevznikne v pohlavních buňkách, nemůže být zděděna (SNUSTAD, 2009; WEAVER a HENDRICK, 1997).

Mutace dle vlivu na fenotyp lze rozdělit na mutace morfologické, nutriční, letální a podmíněné. Morfologické mutace mění tvar či vzhled částí těla, jsou viditelné a mohou tedy být lehce rozeznatelné od přirozeného vzhledu jedince. Například albíni mají zmutovaný gen zodpovědný pro tmavý pigment srsti či kůže (běžně geny pro tyrosinázu – klíčový enzym při procesu vzniku melaninu způsobující černý pigment srsti, kůže a očí). Melanin se v tomto případě neprodukuje a v kůži albínů tedy není pigment. Nutriční mutace vznikají u mikroorganismů, kdy nejsou schopny žít na jednoduchém mediu a potřebují k životu jednu a více dalších substancí k přežití (tzv. auxotrofové), na rozdíl od prototrofních organismů, které si umí vytvořit aminokyseliny, nukleotidy, vitamíny a další látky potřebné k životu. Dokáží tedy žít na minimálním mediu, které obsahuje pouze soli a zdroj energie ve formě glukózy. Organismy s nutriční mutací jsou tedy závislé na přídavku výživy, které nemutantní organismus nepotřebuje. Letální mutace jsou takové mutace, se kterými organismus, který je má v genetické výbavě, není schopný života. Příkladem je mutace, která inaktivuje jednu ze subjednotek RNA polymerázy v genu. Takto organismus nemůže vytvářet RNA a tedy nemůže ani existovat. Haploidní organismus s touto mutací ihned zaniká, protože nemá žádný nemutantní gen pro kompenzaci, zatímco diploidní organismus může být nositelem letální mutace, která je maskována tzv. wildtype alelou, po mnoho generací a neprojevuje se (neobjevíme ho). Projeví se letálně v případě, že se kříží dva heterozygotní organismy a mutace se projeví u recesivního homozygota. Mnoho letálních mutací je právě recesivních. Podmíněné mutace jsou v podstatě mutace letálního charakteru jen za určitých podmínek (podmíněně letální). Letální jsou v tzv.

restriktivním prostředí, v tzv. permissivním prostředí s nimi však organismus dokáže existovat či se zde množit. Z hlediska genetických analýz jsou nejužitečnější, protože jsou využívány k analýzám mnoha biologických procesů (fotosyntéza, embryonální vývoj, atd.). Existují 3 typy mutantů: auxotrofní nedokáží syntetizovat některé základní látky (např. aminokyseliny, vitamíny, pyridiny, atd.; prototrofní dokáží) a rostou jen v prostředí, kde je v médiu obsažen metabolit. Teplotně senzitivní mutace se projevují jen za určitých teplotních podmínek, například u Siamských koček, které mají zmutovaný gen pro tmavou barvu srsti. Srst má tmavou barvu na částech těla, které jsou chladnější než zbytek těla (končetiny, ocas, části obličeje, uši), zatímco tělo s vyšší teplotou je světlé. To znamená, že tělo je dost teplé na inaktivaci enzymu produkujícího barvu a je tedy světlé, zatímco chladné okrajové části dovolují projev mutace a jsou tmavé. Supresor-senzitivní mutace se projevují, pokud je zde další genetický faktor (supresor), který může napravovat či kompenzovat poruchu fenotypu v důsledku této mutace, nebo zařídí, aby mutantní genový produkt nebyl nutný (HEADON, 2015; SNUSTAD, 2009; WEAVER a HENDRICK, 1997).

3.1.2.2 Mutace dle vlivu na genetický materiál

Mutace lze také rozdělit dle toho, čím jsou způsobeny, jakou příčinou a jakého charakteru ta příčina je. Mutace s vlivem na genetický materiál mají vliv na DNA a zahrnují modifikaci, inzerci a delecii a jsou označovány jako bodové mutace (SNUSTAD, 2009; WEAVER a HENDRICK, 1997).

Mutace měnící smysl a mutace beze smyslu

Mutace může měnit smysl úseku DNA, kdy změněná báze mění kodon tím, že vznikne jiná aminokyselina než obvykle a následně je vložena nesprávná aminokyselina do proteinového produktu mutovaného genu (např. kodon CCG → CGG → zařazení jiné aminokyseliny). Může také vzniknout kodon, který nemá smysl, tzv. stop kodon, který způsobuje ukončení translace. Například kodon pro tryptofan UGG může být změněn na UGA nebo UAG a oba jsou stop kodony. Delece je ztráta jednoho či více nukleotidů ze sekvence a inzerce naopak vkládá jeden či více nukleotidů do sekvence. Delece a inzerce jednotlivých bází tedy mohou měnit translační čtecí rámec uprostřed genu. Jsou to tzv. „frameshift“ či posunové mutace (posunutí/změna čtecího rámce). Měnit se může také chemické složení jednotlivých bází, kdy jedna purinová báze nahradí druhou (A→G a naopak) nebo pyrimidinová báze nahradí tu druhou (C→T a naopak). Jedná se

pak o tzv. tranzici. Při transverzi pak nahrazuje pyrimidinová báze purinovou nebo naopak (ROSYPAL *et al.*, 1989; SNUSTAD, 2009; WEAVER a HENDRICK, 1997).

Spontánní mutace

Spontánní mutace se objeví bez přítomnosti mutagenu nebo bez činidla způsobujícího mutaci. Vznikají tedy bez zjevné příčiny, například v důsledku drobných poruch metabolismu nebo je může vyvolat nějaká látka z vnějšího prostředí. Moc často se neobjevují, ale existují odlišnosti mezi geny i mezi organismy. Působením chemických či fyzikálních látek s mutagenním účinkem (tzv. mutagenů) pak vznikají mutace indukované, kdy působením látek dochází ke změnám v DNA či u virů RNA. Do této skupiny patří ultrafialové záření, ionizující látky a široká škála chemických látek. Látkou, která poškozuje DNA a je potenciálním karcinogenem jater, jsou aflatoxiny (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Problém jak určit zda mutace vznikla spontánně nebo byla indukována mutagenní látkou lze řešit analýzami uvnitř populace a srovnáváním populací mezi sebou. Pokud se například mutace objeví u 99% jedinců z populace, je pravděpodobné, že mutace je indukována mutagenní látkou. Dále pak je vhodné postupovat srovnáváním populací vystavených mutagenní látce a kontrolních populací, které látce nebyly vystaveny. Typy spontánních mutací viz níže:

a) Mutace vzniklé při procesu replikace DNA

Replikace je velice přesný a precizní proces, během syntézy DNA se však mohou vyskytnout chyby. Příkladem jsou mutantní vlákna bakterie *E. Coli* zvané mutátory, která vytváří o mnoho vyšší počet chyb při replikaci než je obvyklé, takže počet mutací je v jejich případě vysoký. Tyto mutátory jsou zmapovány pro několik různých genů. Například *mutD*, který kóduje epsilonovou subjednotku holoenzymu DNA polymerázy III. Tento polypeptid dává holoenzymu jeho 3'→5' polymerázovou aktivitu. Bez této aktivity nedojde k opravě, tudíž nově replikovaná DNA je ponechána s přebytkem mutací. Díky jiným mutátorům probíhá replikace až moc přesně a organismy poté vykazují nízké evoluční pokroky. Dále mohou narušovat mechanismus pro opravy nesouladů v replikaci DNA, které opravný systém vynechal.

b) Chyby v replikaci způsobené DNA bázemi

Báze existují v jedné či dvou možných formách (tautomery; například báze thymin existuje v keto- a enol -formě). Pokud se báze vyskytuje v jiné formě následkem tautomerizace (záměna jedné formy za druhou), následně jí při replikaci přiřadí polymeráza jinou bázi než by přidělila normálně a vznikne mutace.

c) Spontánní posunové mutace během replikace (posunutí čtecího rámce)

Vznikají inzercí nebo delecí jedné nebo více bází uprostřed kódovací oblasti, což mění čtecí rámec pro translaci a vytváří tak rozsáhlé změny. Mění totiž každý kodon od místa mutace až po konec mRNA. Dokud jeden z nově vzniklých kodonů není stop kodon, předčasné ukončení je výsledkem posunové mutace.

d) Mutace způsobené deaminací

Během deaminace mají báze (hlavně cytosin) mírnou tendenci ztrácet své aminoskupiny. Cytosin místo své aminoskupiny přijme karbonylový kyslík, což ho přemění na uracil, který se páruje s adeninem místo guaninu. Adenin může být též deaminován a nese skupinu hypoxantin, která se páruje s cytosinem místo thyminu. V obou případech tedy může vzniknout mutace, jelikož se vytváří nová báze s jiným párováním. Přeměna cytosinu na uracil je častá, organismus má však mechanismus na odstranění uracilových bází, které se včleňují do DNA chybami. V mechanismu je zahrnut enzym uracil-DNA glykosyláza, která ruší vazbu mezi uracilem a jeho deoxyribózou, odstraňuje tedy uracil a zanechává DNA vlákno obsahující jeden cukr bez báze. Pro párování s guaninem na protějším vlákně pak cytosin zastoupí jiný enzym. Mutace tedy touto deaminací nevzniká, ale potenciálně by mohla. Vzniká však z modifikované báze přidané k základním čtyřem, kdy nejčastější je 5-methylcytosin, který se páruje s guaninem stejně jako normální cytosin, ale chová se jinak. Místa s touto bází jsou tzv. žhavá místa neboli „hot spots“ pro spontánní mutace deaminací. U savců je cytosin v určitých CG sekvencích terč pro metylaci a během evoluce vedla deaminace ke konverzi většiny CG sekvencí na TG, tedy docházelo k mutacím (ROSYPAL *et al.*, 1989; WEAVER a HENDRICK, 1997).

e) Tripletové repetice

Při mutaci dochází k opakování (repeticím) tripletu mnohem častěji než v normálním stavu. Tyto mutace způsobují závažná onemocnění člověka, například Huntingtonovu chorobu, myotonicou dystrofii, spinobulbární svalovou atrofií a další degenerativní onemocnění. Při syndromu fragilního X chromozomu se triplet CGG místo normálních 6-54 repetic vyskytuje v řádech stovek až tisíců repetic, přičemž tento počet může být individuální a není známo, jak tato mutace vzniká (FRIEDBERG *et al.*, 2006; ROSYPAL *et al.*, 1989; SNUSTAD, 2009; WEAVER a HENDRICK, 1997).

Indukované mutace

Typem těchto mutací je chemická mutageneze. Mutace vznikají daleko častěji než spontánní mutace a jsou způsobeny environmentálními vlivy, hlavně chemickými látkami a radiací. První látkou, u které byla prokázána mutagenní schopnost, byl hořčičný plyn neboli yperit (v podstatě olej, di(2-chloro-ethyl)sulfid) způsobující smrt masivním poškozením hematopoietického systému, jehož výzkum probíhal během druhé světové války. Látka měla schopnost vázat alkylové skupiny přímo na DNA. Některé chemikálie zvyšují počet mutací vzniklých spontánně, například deaminace se urychluje a rozšiřuje díky kyselině dusité nebo bisulfidu či teplem, posunové mutace zase akridinovými barvivy. Jejich vlivem dochází ke změně konformace dvoušroubovice a ta se v důsledku toho kroutí a prohýbá. Mění se také posloupnost bází ve vláknu vlivem adice či delecce a opět dochází k posunu čtecího rámce. Některé syntetické sloučeniny zase zvyšují frekvenci tautomerizace, což vede k mutacím. Kyselina dusitá působí mutačně na replikující i nereplikující část DNA a způsobuje oxidativní deaminaci aminoskupin u adeninu, cytosinu a guaninu, kdy jsou aminoskupiny převedeny na ketoskupiny a modifikované báze pak mají jiné vlastnosti vodíkových vazeb. Elektrofilní látky z prostředí vyhledávají elektrony (negativní náboj), vytváří vazby a mnohé jsou pak v těle metabolizovány na elektrofilní sloučeniny. DNA molekula obsahuje mnoho elektronů, kdy každý nukleotid obsahuje plný negativní náboj na fosfátu a částečné negativní náboje na bázích. Když se elektrofilní látka naváže na tato místa, obvykle přidá alkylovou skupinu (alkylace) (FRIEDBERG *et al.*, 2006; SNUSTAD, 2009; WEAVER a HENDRICK, 1997).

3.1.2.3 Reverze mutace

Mutace genu, která vede k mutantnímu fenotypu, tzv. přímá mutace, může někdy zmutovat zpět do formy standardní alely a obnovuje tak standardní fenotyp. Znamená to, že mutace je reverzibilní a je to tedy vratný proces. Jako reverzi či reverzní mutaci označujeme mutaci, která vrací fenotyp, změněný mutací přímou, do původní (standardní) formy. Tento proces buď prostřednictvím zpětné mutace (druhá mutace vzniklá ve stejném místě genu jako mutace původní, taková, obnovující původní sekvenci nukleotidů) nebo supresorové mutace (druhá mutace vzniklá v jiném místě genomu, ale efekt jejího účinku je stejný jako první mutace, neobnovuje však původní nukleotidovou sekvenci; může se nacházet v různých oblastech stejného genu jako

mutace standardní či v jiných genech, na jiných chromozomech). U některých mutací je pravidlem, že reverze u nich probíhá hlavně zpětnou mutací, u jiných zas primárně supresorovou mutací. Zda se jedná o jednu či druhou možnost se v analýzách zjišťuje pomocí křížení mezi jedincem s fenotypovou reverzí a standardem. Jestliže šlo o zpětnou mutaci, potomci po tomto křížení budou mít všichni standardní fenotyp. Jestliže se jednalo o supresorovou mutaci (obnovení standardního fenotypu touto cestou), původní mutace se v potomcích bude stále projevovat. Odlišíme ji od supresorové pomocí rekombinace (ROSYPAL *et al.*, 1989; SNUSTAD, 2009).

Existuje několik typů reverze: pravá reverze spočívá v úplné obnově zmutované nukleotidové sekvence na sekvenci původní a dochází k úplnému návratu fenotypu na standardní. Jev je typický pro bodové mutace, při nichž dochází k substituci jednoho nukleotidu či jednoho nukleotidového páru. Reverzí lze vrátit kodonu smysl, pokud jej při bodové mutaci ztratil tím, že se v kodonu vymění „nepatřičný“ nukleotid za původní pomocí transice nebo transverze, tzv. operační reverze a ke zpětné mutaci dochází tak, že kodon, který byl změněn původní mutací, se v mutantní alele strukturního genu změní v kodon synonymní s původním kodonem. Obnoví se tak funkce polypeptidového řetězce, který je kódovaný touto alelou. Genetická informace ve standardní alele se při tomto typu reverze obnovuje jinou formou jejího zápisu. Dochází k úplnému návratu do standardního fenotypu. Dalším typem je pseudoreverze, kdy dochází k obnovení funkce polypeptidu kódovaného touto alelou, ale má jiný smysl než původní kodon. Aminokyseliny v tomto případě navozují částečně nebo úplně biologickou funkci polypeptidového řetězce a dochází tak částečně nebo úplně k návratu ke standardnímu fenotypu. Intra- a intergenová supresorová mutace vzniká po recesivní mutaci, jejíž účinek suprimuje (potlačuje) a neúplně obnovuje původní standardní fenotyp. Tato recesivní mutace, jejíž účinek je potlačen supresorovou mutací je tzv. supresorsenzitivní. Intragenová vzniká ve stejném genu jako supresorsenzitivní mutace, intergenová v jiném. Alela potlačující fenotyp ovlivněný recesivní mutací je tzv. supresor (ROSYPAL, 2000).

3.1.2.4 Epigenetické jevy ovlivňující fenotypovou variabilitu

Epigenetická dědičnost je vědní obor zabývající se modifikací jaderných genů nebo chromozomů, které mění expresi genu, ale nemění sekvenci DNA. Jedná se o reverzibilní proces. Doslova termín znamená „mimo konvenční genetiku“ a v současné době je používán k popsání stálých změn v potenciálu genové exprese vznikající během vývoje a buněčné proliferace. Modifikace se objevují během oogeneze, spermatogeneze i v raných stádiích embryogeneze, kdy dochází k diferenciaci buněk v jejich totipotentním stádiu během embryonálního vývoje. Exprese jednotlivých genů se mění způsobem, který může být stálý během života jedince, mohou tedy permanentně ovlivňovat fenotyp. Nejsou však permanentní v průběhu generací. Gen tedy může být u jedince inaktivován vlivem epigenetické modifikace po celý život, avšak když tento jedinec produkuje gamety, gen se může stát aktivní a zůstat činný během života potomků, kteří zdědí aktivní gen (BROOKER, 2012; JAENISH a BIRD, 2003). Dále je používán pojem „epigeneze“, který znamená interpretaci genotypu během vývoje pro vytvoření fenotypu (JAENISH a BIRD, 2003). V populacích vznikají genetické změny závislé na schopnosti organismu udržet si daný genotyp ve stabilním prostředí a schopnosti se rozvíjet pomocí modifikací v reakci na podstatné změny prostředí. Tyto změny v genomu mohou být dvojí povahy: mohou řešit ustálené fyzikální změny v sekvencích DNA vedoucí k mutacím a nebo reverzibilní chemické modifikace nukleotidů nebo struktury chromatinu vedoucí k epimutacím (KOVALCHUK a KOVALCHUK, 2012).

Je charakterizováno několik mechanismů, které zprostředkovávají epigenetické jevy: DNA metylace, modifikace histonů a nekódující RNA. Epigenetické mechanismy jsou nezbytné pro vývoj a diferenciaci, ale mohou také vzniknout u dospělého člověka či myši buď náhodnou změnou nebo vlivem prostředí. Tyto mechanismy také chrání před virovými genomy, které mohou převzít („ukrást“) funkce buněk pro jejich vlastní potřebu. Zdá se, že umožňují organismu reagovat na životní prostředí prostřednictvím změn v genové expresi. Modifikace jsou interpretovány pomocí proteinů, které rozpoznávají jednotlivé modifikace a usnadňují adekvátní biologické efekty (JAENISH a BIRD, 2003).

Molekula DNA ve své chemické struktuře obsahuje dvě úložiště informací. DNA sekvenci, která nese dědičnou genetickou informaci a vzor distribuce kovalentně vázaných metylových skupin do cytosinových bází v DNA. Pokud je genetická

informace podobná ve všech tkáních jedince, je vzor distribuce metylace specifický ohledně typu buňky napříč genomem. DNA metylace je důležitým regulátorem funkce genu (CRAIG a WONG, 2011). U savců se jedná o postreplikační modifikaci nacházející se hlavně v cytosinové bázi dinukleotidových sekvencí CpG. Rozsah změn vlivem metylace během vývoje začíná vlnou demethylace během štěpení, následované novou (*de novo*) metylací po implantaci v celém genomu. Demethylace je aktivní proces, při kterém se odstraňuje metylace ze samčího genomu během prvních hodin při oplozování, přičemž mateřský genom je pouze pasivně demetylován během následujícího štěpení. Rozsah metylace v genomu gastrulujícího embrya je vysoký vzhledem k nové metylaci, ale během diferenciaci má ve specifických tkáních klesající tendenci (JAENISH a BIRD, 2003).

Byly pozorovány rozdílné fenotypy myši s mutacemi v různých genech enzymu DNA metyltransferázy (DNMT), metyl-vázajících proteinů (MBD1-4) a histony-modifikujících proteinů. Z této fenotypové analýzy vycházejí závěry o roli DNA metylace a vznik vzorů metylace během vývoje. Většina z mutací měla za následek celkovou demethylaci a letální vliv na embryo, dále také chromozomální nestabilitu, abnormality v chování, mutantní fenotyp, zvýšenou frekvenci mutací atd. Dále také analýza DNA metyltransferáz prokázala, že DNA metylace je nezbytná pro vývoj obratlovců (JAENISH a BIRD, 2003).

Další mechanismus epigenetiky se týká buněčných proteinů s malým jádrem zvaných histony, které jsou na rozdíl od jiných proteinů v buňce evolučně téměř konzervované, s minimálními změnami a které spočívají pouze v rozdílu několika aminokyselin mezi člověkem a kvasnicemi. Vysoký stupeň konzervace napovídá, že mají velmi důležité a podobné funkce u všech eukaryot, s největší pravděpodobností v obalu DNA v jádře a musí tedy hrát roli ve specifických procesech templátované DNA zahrnujících transkripci, replikaci, rekombinaci a opravy DNA. Histony se tedy účastní široké škály biologických procesů díky jejich rozdílným kovalentním modifikacím. První modifikaci zjistil Murray (1964), když objevil metylaci lysinu v histonech brzlíku u telete. Další výzkumy později odhalily ADP-ribosylaci, ubikvitinaci, fosforylaci serinu a acetylaci lysinu. Tyto kovalentní modifikace mohou nastat na všech histonech, preferované oblasti pro modifikaci však jsou amino- a karboxy-zakončení, nejspíš pro svou dostupnost v nukleozomu. Odlišné modifikace histonů a určité aminokyseliny, na kterých se typicky vyskytují, jsou spojené se

specifickými biologickými procesy. Ribosylace kvůli své velikosti je jedna z nejvíce dramatických posttranslačních modifikací. Poly-ADP-ribóza sestává z homopolymeru adenosin-difosfát-ribózy, která je kovalentně spojená s jadernými proteiny díky skupině poly-ADP-ribóza-polymeráz, které používají NAD⁺ jako kofaktor. Je to relativně přechodná modifikace regulující vazbu nukleárních proteinů na DNA. Studie prokázaly roli této modifikace v dějích zprostředkovávajících chromatin. Ubikvitinace je nejčastější modifikace histonů H2A a H2B (lysin) u vyšších eukaryot. Je spojena s transkripcí, kterou může aktivovat nebo utlumovat. Ubikvitinace lysinu 119 histonu H2A je katalyzována polykombinací proteiny (Bmi1/Ring1), čímž dochází k represí transkripce. Ubikvitin je uvolňován H2A a H2B během odpovědi na buněčný stres a je ligován na zničené proteiny a tyto ubikvitinované histony mohou sloužit jako sklad pro ubikvitin v jádře. Výzkumy zaměřené na fosforylaci histonů H1 a H3 serin 10 ukázaly, že oba histony byly během mitózy hyperfosforylovány na kondenzovaných mitotických chromozomech a dále se ukázalo, že fosforylace H3 je pro tento proces vyžadována, H1 však není nezbytný. Fosforylace histonů se také objevuje během apoptózy při genotoxickém stresu. Nejlepší funkce této modifikace je fosforylace serinu 13 na histonu 2A (varianta H2AX) v odpovědi na zlom vytvořený na dvouvláknové DNA. Fosforylovaný H2AX totiž zřejmě doplňuje mechanismus oprav DNA v místě poškození. H2AX byl také detekován v mitotických buňkách ne v roli oprav poškození DNA, ale s podobnou funkcí v kondenzaci chromatinu jako H3. Acetylace lyzinu je typicky spojena s transkripcí u všech eukaryot, účastní se celého multiproteinového komplexu regulace transkripce, konkrétně remodelace chromatinu pro faktory transkripce pro navázání DNA, které rozpoznávají odpovídající sekvenci. Účelem acetylace histonů je tedy zřejmě stabilizace navázání důležitých faktorů na chromatin pro zvýšení pravděpodobnosti iniciace transkripce (JEANTEUR, 2005; TOST, 2008).

3.1.2.5 Rekombinace

Rekombinace je nová kombinace sekvencí nukleotidů ve skupině způsobené crossing-overem a podílí se tedy stejně jako mutace na změně genetické informace. Crossing-over je výměna nukleotidových sekvencí mezi homologickými skupinami DNA a probíhá tak, že dojde ke zlomu a opětovnému spojení. Nejprve se naštěpí dva paralelní homologické polynukleotidové řetězce a fragmenty takto vzniklé se spojí do kříže, čímž vznikne organismus zvaný rekombinanta. Dle ROSYPAL *et al.* existují dva

typy rekombinace, (1) obecná rekombinace je výsledkem crossing-overu, který probíhá mezi jakýmkoliv geny či sekvencemi alel v rámci homologických vazbových skupin. Může probíhat mezi geny (intergenová) nebo mezi sekvencemi alel téhož genu (intragenová). Dochází k ní mezi virovými genomy, které infikovaly hostitelskou buňku, u prokaryot při transdukcii, transformaci a konjugaci a dále během mitózy a meiózy eukaryot. (2) Specifická rekombinace je výsledkem crossing-overu, který probíhá mezi homologickými sekvencemi dvou jinak nehomologických vazbových skupin, probíhá tedy jen na jejich určitých místech (ROSYPAL *et al.*, 1989; ROSYPAL, 2000).

3.1.2.6 *Reparace DNA*

Reparací DNA se označují mechanismy vyvinuté v živých soustavách pro ochranu genomu před poškozením a které mohou do určité míry poškození genomu opravit. Jedná se o enzymové odstranění chyb vzniklých při replikaci, rekombinaci nebo při působení exogenních vlivů. Opravy probíhají při chybném párování (zařazení nukleotidu při replikaci, který není komplementární), při mezeře v DNA o rozsahu jednoho či více nukleotidů uvnitř řetězce DNA (probíhá tzv. opravná syntéza, kdy je dle nepoškozeného vlákna mezera zaplněna) a dále při zlomu, kdy dochází k přerušení fosfodiesterové vazby mezi dvěma nukleotidy vedle sebe v nukleové kyselině díky endonukleázám. Zlom může nastat v jednom polynukleotidovém řetězci DNA (jednořetězcový) nebo v obou polynukleotidových řetězcích (dvouřetězcový). Pokud vzniknou zlomy na obou vláknech v místech sobě blízkých, označuje se zlom jako „posunutý“ a pokud jsou přímo naproti sobě, označuje se zlom jako „zarovnaný“ (ROSYPAL *et al.*, 1989).

3.2 Molekulárně-genetické založení zbarvení savců

Pigment v pokožce zvířat se obecně nazývá melanin a objevuje se ve všech formách organismů, přičemž je podobný pigmentům hub a bakterií, není však stejný. Barvu srsti u savců určují dva základní pigmenty eumelanin a feomelanin. Eumelanin je základem pro vznik černé až hnědé barvy a feomelanin dává vznik žlutému až červenému zbarvení. Jsou to dva chemicky odlišné melaninové pigmenty a jsou produkovány melanocyty savců. Eumelanin je vysoce heterogenní polymer složený z jednotek DHI (5,6-dihydroxyindol) a DHICA (5,6-dihydroxyindol-2-karboxylová kyselina) v redukované či oxidované formě a z jednotek pyrolu odvozených z jejich peroxidačního štěpení. Pheomelanin je složen převážně z benzothiazinových derivátů obsahujících síru. Lze je kvantitativně analyzovat acidickou manganistanovou oxidací nebo redukční hydrolýzou jodovodíku za vytvoření pyrol-2,3,5-trikarboxylové kyseliny či aminohydroxyfenylalaninu (LAMOREUX *et al.*, 2004; SOLANO, 2014).

Vedle eumelaninu a feomelaninu existují ještě neuromelanin a smíšený melaninový pigment. Neuromelaniny jsou makropolymery sestávající z amino- a noradrenalinochromů a stejně jako ostatní melaninové pigmenty jsou to hnědočerné pigmenty rozpustné v organických rozpouštědlech. Mají vlastnosti jako oba melaninové pigmenty, vytvářejí chelátovou vazbu s kovy a reagují s některými anorganickými a organickými sloučeninami. Další typy melaninu mohou vznikat enzymatickou oxidací serotoninu či tryptofanu prostřednictvím tyrosinázy a výsledně mají jinou strukturu než běžné melaniny. Struktury podobné melaninu také mohou vznikat transformací opioidních peptidů řízenou tyrosinázou, jejímž výsledkem jsou černé až hnědé pigmenty s paramagnetickými vlastnostmi téměř identickými s DOPA-melaninem (SLOMINSKI *et al.*, 2004; SOLANO, 2014).

Pigmentace pokožky je pod komplexní genetickou kontrolou regulovanou více než 150 alelami rozmístěnými na 90 lokusech, jejichž proteinové produkty se chovají jako enzymy, strukturální proteiny, regulátory transkripce, transportní prvky, receptory či růstové faktory se spoustou funkcí a zaměřením a právě mezi těmito produkty se nachází důležité strukturální, enzymatické a regulační melanosomální proteiny kódované lokusy *albino(c)/TYR*, *brown(b)/TYRP1*, *slaty (slt)/TYRP2/DCT*, *silver (si)/SILV*, *pink-eyed dilute (p)/P/OCA2*, *underwhite (uw)/OCA4*, *MART1* a *OAI* (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

3.2.1 Buňky produkující melanin - melanocyty

Melanocyty jsou dendritické pigmentové buňky produkující melanin, jsou tedy základem celého zbarvení a nachází se mezi keratinocyty v pokožce (druhý typ pokožkových buněk). Z fyziologického hlediska je syntéza v melanocytech omezena do melanosomů, což jsou zvláštní organelové struktury nacházející se v cytoplazmě melanocytů, vznikají odštěpováním z Golgiho aparátu a jejich enzymatické a strukturální elementy jsou v procesu připomínajícím utváření lysozomů organizovány a propojeny odděleně. Procesy membránového transportu se však mezi melanosomy a lysozomy liší. Obecně platí, že struktura melanosomu záleží na typu melaninu, který produkuje. Eumelanosomy jsou eliptické a obsahují fibrilární matrix, zatímco feomelanosomy mají různý tvar, převážně však kruhový obvod a obsahují vezikuloglobulární matrix (RŮŽIČKOVÁ JAREŠOVÁ, 2013; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Vývoj melanosomu zahrnuje čtyři kroky, přičemž první krok se shoduje s organizací raného matrixu. Ve druhém kroku je již matrix zorganizován, ale u eumelanosomů bez melaninové formace, ve feomelanosomech je melanin v tomto kroku již utvořen. Ve třetím kroku probíhá uložení melaninu a ve čtvrtém kroku jsou melanosomy plně melanizovány, tzn. kompletně naplněné melaninem. Při patologických podmínkách, tedy například u melanomu, je tento proces deregulován, tyrosináza může být aktivována již v prvním kroku, zatímco melanin může být uložen bez organel jako tzv. granulózní typ bez fibrilárního či vezikuloglobulárního matrixu. Tyto granulózní melanosomy produkují eumelanin. V biogenezi melanosomů není znám rozdíl mezi folikulárními a epidermálními melanocyty. Ve folikulech černého vlasu tedy melanocyty obsahují nejvyšší počet melanosomů (eumelanosomy), které mají zároveň nejvyšší koncentraci elektronů a každý má fibrilární matrix. V hnědém vlasu jsou melanocyty poněkud menší a v blond vlasu jsou melanosomy jen málo melanizované, často je viditelný jen melanosomální matrix. Červený či zrzavý vlas obsahuje vezikulární matrix, melanin je uložen nepravidelně ve skvrnách. V prvním kroku mohou melanosomy obsahovat melanogenezi-příbuzné proteiny („melanogenesis-related proteins“, MRPs), které jsou však katalyticky inaktivní, dokud je proces štěpení následujícího proteinu neuvolní dovnitř melanosomů. Tyto procesy jsou spojeny se změnou tvaru melanosomu (z kulovitěho na eliptický) a s formací intramelanosomální fibrilární sítě (eumelanosomy). Zajímavé je, že eumelanogenické i feomelanogenické melanosomy mohou koexistovat ve stejné lidské buňce, ale ne bez

stejně cesty vzniku. K syntéze eu- i feomelaninu jsou potřeba stejné melanosomy způsobující přepnutí („switch“). Tyto strukturální principy platí pro folikulární melanocyty a pravděpodobně i pro lidské epidermální melanocyty a kožní melanocyty hlodavců. Jelikož jsou melanosomy metabolicky aktivní orgány, jejich aktivita má vliv na funkci hostitelského melanocytu nebo keratinocytu a melanosomy tedy mohou modifikovat energeticky flexibilní metabolismus buňky přepínáním oxidativního katabolismu na anaerobní glykolýzu, měnící poměry NAD/NADH a NADP/NADPH uvnitř buňky a/nebo stimulující cestu pentózového fosfátu. Činnost hostitelské buňky může být také ovlivněna přítomností pigmentových granulů, které mohou regulovat koncentraci vápníku uvnitř cytosolu nebo mohou obousměrně vázat kationty nebo bioregulační sloučeniny jako jsou katecholaminy, serotonin a prostaglandiny (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

3.2.2 Vznik melaninových buněk - melanogeneze

Vznik melanosomů (melanogeneze) zahrnuje interakce mezi strukturami hrubého endoplasmatického retikula (RER) a vezikuly a kanály *trans*-Golgiho aparátu (TGN). Aby mohlo dojít k syntéze melaninu v melanosomech, musí být přítomen tyrosin a fenoloxidázový enzymový komplex (tyrosináza, fenoláza), za jehož syntézu odpovídají ribosomy RER. Fenoloxidáza přemění tyrosin na DOPA (dihydroxyfenylalanin), který dále oxiduje na dopachinon. Další kroky tvorby barviva (konverze dopachinonu na indolchinon a polymerace indolchinonu v melanin) probíhají spontánně (bez enzymové katalýzy). Melanosomy s hotovým pigmentem dále putují z buněčného těla do jeho výběžků a jimi ke keratinocytům, kterým jsou předány. Předání hotového produktu jednou buňkou druhé buňce je tzv. cytokrinní sekrece. V keratinocytech se melaninová zrna shromažďují nad buněčnými jádry, kde tvoří tzv. pigmentové čepičky a chrání je před účinky UV záření. V pokožce tedy existují tzv. epidermální melaninové jednotky, přičemž jeden melanocyt zásobuje melaninem asi 36 keratinocytů (RŮŽIČKOVÁ JAREŠOVÁ, 2013; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Dle SLOMINSKI *et al.* (2004) přítomnost tyrosinázy v melanocytech způsobuje rapidní oxidaci tyrosinu nebo L-DOPA na dopachinon, čímž je zahájen proces vzniku eu- nebo feomelaninu. Rychlou oxidaci DOPA na melanin též způsobuje vysoká koncentrace iontů kovů jako je Mn^{2+} nebo Cu^{2+} . Kovové kationty jako měď, zinek a železo jsou zahrnuty v přeměně dopachromu na DHICA. Formace eu- či feomelaninu

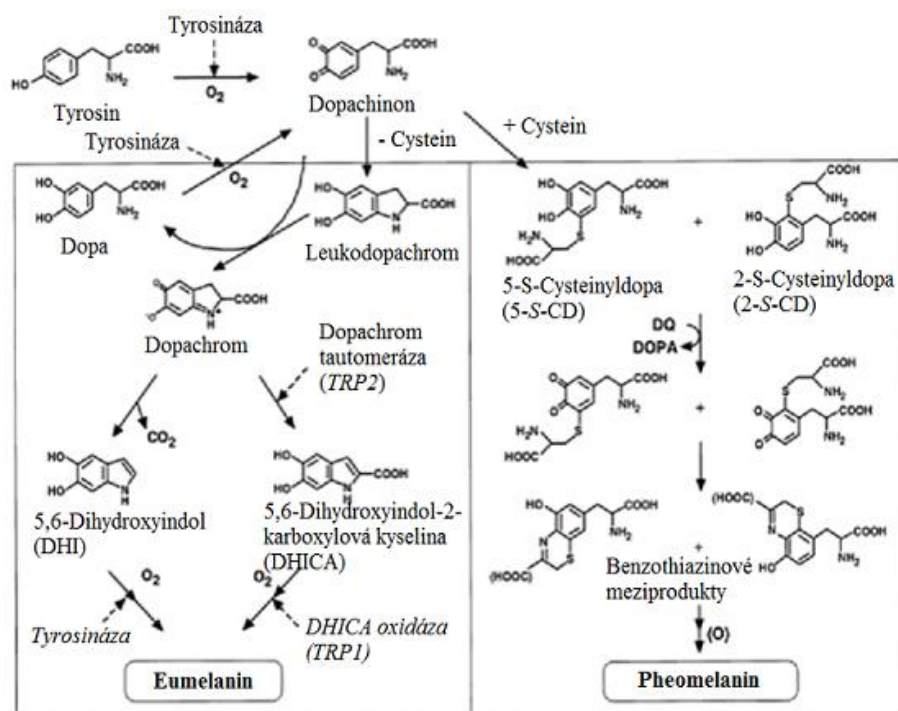
je přímo dána přítomností (nebo absencí) cysteinu, který je aktivně transportován přes melanosomální membránu, a GSH v plně redukovaném thiolátovém stavu a redoxním potenciálu (vysoká hladina GSH pro eumelanin a nízká pro feomelanin). Cesta procesu melanogeneze v melanocyту může být kvalitativně i kvantitativně pozměněna přítomností či aktuální aktivitou antioxidantních enzymů, například katalázou, glutathion-reduktázou, thioredoxin-reduktázou (thioredoxin), superoxid-dismutázou nebo glutathion-peroxidázou (HEARING, 2000; SŁOMINSKI *et al.*, 2004).

Melanogeneze začíná v okamžiku kdy je tyrosináza a další příbuzné enzymy odštěpeny, zahájení aktivity nejspíš záleží na kyselém prostředí zajištěném protonovými pumpami. Na kyselém pH totiž plně vyvinutá tyrosináza hydroxyluje L-tyrosin na L-DOPA a může tak začít syntéza melaninu formující melanosomy nacházející se ve třetí fázi vývoje melanosomu. O tomto procesu však existuje více teorií. Jakmile je přítomna L-DOPA, mohou spontánně nastat další fáze melanogeneze, tedy série oxidačně-redukčních reakcí a intramolekulární transformace, přičemž rozdílná rychlost reakcí záleží na iontové koncentraci, přítomnosti a koncentraci kationtů kovů, redukčních činidel, thiolů a kyslíku. Rychlost a specifita procesu vzniku je regulována hlavně melanogenezi-příbuznými enzymy (MREs), z nichž nejdůležitější je tyrosináza. Dále se s přítomností L-DOPA projeví efektivní formace melaninového pigmentu zvýšením pH (preferováno neutrální před bazickým), protože acidifikace inhibuje syntézu melaninu. Správné řazení a propojení MRPs v endoplasmatickém retikulu vyžaduje jejich interakci s kalnexinem (protein, který váže vápník vázaný v membráně), glykosylací v TGN a interakci tyrosinázy s TYRP1 (P protein). P protein se může chovat jako transportér tyrosinu, jako protein měnící ionty v melanosomální membráně a také jako protein regulující proces a řazení MRPs. Transport MRPs vyžaduje formaci speciálních vezikul s napojením obalových proteinů na cytoplasmické straně TGN, aby mohly být vybrány MRPs pro melanosomální přenos. Pro transport tyrosináze-příbuzných proteinů („tyrosinase-related proteins; TRPs) z TGN do melanosomů je důležitý tzv. adapter protein-3 (AP-3), který váže dileucinový motiv v cytoplasmatickém konci TRPs. Moderní model melanosomové formace a hospodaření MRPs zahrnuje tyrosinázu, TYRP1, TYRP2, P a další. Melanosomy dále obsahují membránové proteiny spojené s lysozymem (LAMP), které chrání lysozomální membránu a jejich přítomnost (LAMP-1, -2 a -3) v melanosomech podporuje společný rodový původ melanosomů a lysozymů. LAMP-1 též chrání integritu melanosomu

pohlčováním volných radikálů produkovaných během melanogeneze, zatímco kalnexin se účastní shlukování melanosomálních proteinů a regulace tyrosinázy. Melanosomy obsahují protonovou pumpu, která umožňuje regulaci intramelanosomálního pH a endocytickou cestou internalizují buněčný povrch receptorů melanocyt-stimulujících hormonů (MSH). Dodání MSH receptorů do melanosomů poukazuje na možný intracelulární mechanismus pro specifickou a precizní regulační funkci MSH. Mechanismus formace feomelanosomu je definován méně dopodrobna než u eumelanosomu. Zkrátka vezikuloglobulární orgány jsou začleněny do melanosomů v první fázi vývoje. Ve druhém kroku je feomelanin uložen na vezikuloglobulární matrix, indikující přítomnost aktivity tyrosinázy v dřívější fázi než při eumelanogenezi. Proces feomelanogeneze závisí na aktivitě tyrosinázy, která je poměrně nízká, a na schopnosti cysteinu konjugovat dopachinon tvořený působením tyrosinázy (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

3.2.3 Vznik a produkce melaninů

Oba pigmenty, eumelanin i feomelanin, vznikají z jednoho prekursoru - dopachinonu, který pomocí enzymu tyrosinázy (za působení O₂) vzniká z tyrosinu (viz schéma – obrázek č.1) (LAMOREUX *et al.*, 2004).



Obrázek č.1: Schéma vzniku melaninových pigmentů; převzato z LAMOREUX *et al.* (2004)

Tyrosin je jednou z 20 aminokyselin, které buňky využívají k syntéze proteinů. Je syntetizován dehydroxyací esenciální aminokyseliny fenylalaninu získané z potravy a patří mezi neesenciální aromatické aminokyseliny, rozpustné v zásaditých roztocích, které si zvířata mohou sama vytvořit. Biosyntéza tyrosinu (se zúčastněnými enzymy v závorce) probíhá následovně: chorismát → (chorismát mutáza) → prefenát → (prefekt dehydrogenáza) → 4-hydroxyfenyl pyruvát → (aminotransferáza s donorem glutamátu NH₃) → tyrosin. Chorismát je také prekurzorem biosyntézy tryptofanu, fenylalaninu a dalších derivátů. Tyrosin je prekurzorem pro norepinefrin (noradrenalin), epinefrin (adrenalin), 3,4-dihydroxy-fenylalanin (dopa), dopamin a katechol, který tvoří katecholaminovou rodinu hormonů u zvířat (RÉDEI, 2008; SCHWAB, 2011).

Dopachinon je vysoce reaktivní meziprodukt a pokud do procesu zasahují thiolové sloučeniny (např. cystein), vznikají výhradně thiolové adukty dopa (produkty adiční reakce mezi dvěma sloučeninami), zvané cysteinyldopas (5-S-CD a 2-S-CD). Tyto katecholaminy jsou tedy vytvářeny rapidní enzymatickou hydrolýzou 5-S-glutathiondopa, nacházející se v buňkách produkujících melanin. Dále bývají ve zvýšené míře obsaženy v plasmě a moči pacientů se zhoubným melanomem. Další oxidací thiolových aduktů dochází ke vzniku feomelaninu přes benzothiazinové meziprodukty (LAMOREUX *et al.*, 2004; NCBI, 2016a).

Naproti tomu při absenci thiolových sloučenin v procesu podléhá dopachinon intramolekulární cyklizaci, která může vést k vytvoření eumelaninu. Regulaci tvorby eumelaninu řídí kromě tyrosinázy, která je kódována na *albino* (*c*) lokusu, také dva příbuzné proteiny (*TRP1* a *TRP2/DCT*; *TRPs*). *TRP2* (*DCT*, dopachrom-tautomeráza) je produktem *slaty* (*Sl*) lokusu a katalyzuje tautomerizaci dopachromu na DHICA. Tyrosináza katalyzuje oxidativní polymeraci DHI, zatímco oxidace DHICA je katalyzována proteinem *TRP1* (*Tyrp1*, protein *brown* (*B*) lokusu). Tyto proteiny tedy silně ovlivňují kvalitu a kvantitu produkce eumelaninu a jsou společně s tyrosinázou kolokalizovány na vnitřní melanosomální membráně, může mezi nimi probíhat interakce v rámci multienzymatického komplexu, ve kterém je tyrosináza stabilizována. Na melanogenezi se podílí například i proteiny kódované na *silver* (*Si*) lokusu, mohou zde hrát důležitou roli kvůli tomu, že mutace na tomto lokusu mohou způsobovat předčasné šedivění srsti (u myši) v důsledku ztráty folikulárních melanocytů. *TRP* proteiny se netvoří ve feomelanických melanosomech, tudíž se předpokládá, že v nich chybí a proto nemají mutace na *brown* a *slaty* lokusech dopad na feomelanogenezi. Dále tedy lze říct,

že žádné enzymy kromě tyrosinázy nejsou přímo zapojeny do produkce feomelaninu (LAMOREUX *et al.*, 2004).

Dále jsou přítomny dva geny, které řídí přepínání („switch“) mezi produkcí eumelaninu a feomelaninu, gen *extension/Mc1r* nacházející se na *e* lokusu, který kóduje *Mc1r* (melanocortin-1-receptor). Protein se nachází na plasmatické membráně melanocytů. *Agouti* (*a*) lokus kóduje ASP (agouti signaling protein), který je produktem buněk přilehlých k melanocytům a chová se jako antagonist melanokortinu. Dle výzkumu BARSH *et al.*(2000) je syntéza feomelaninu vyvolána schopností *agouti* proteinu inhibovat signalizaci přes *Mc1r*. *Agouti* protein má dle studie dva efekty: kompetitivní inhibici obsazení receptoru adenokortikoidním hormonem α -MSH (melanocyt stimulující hormon) a regulaci (snížení) signalizace receptoru, které jsou samostatně zprostředkovávány doménami v oblastech amino- a karboxy-zakončení *agouti* proteinu (LAMOREUX *et al.*, 2004; RÉDEI, 2008).

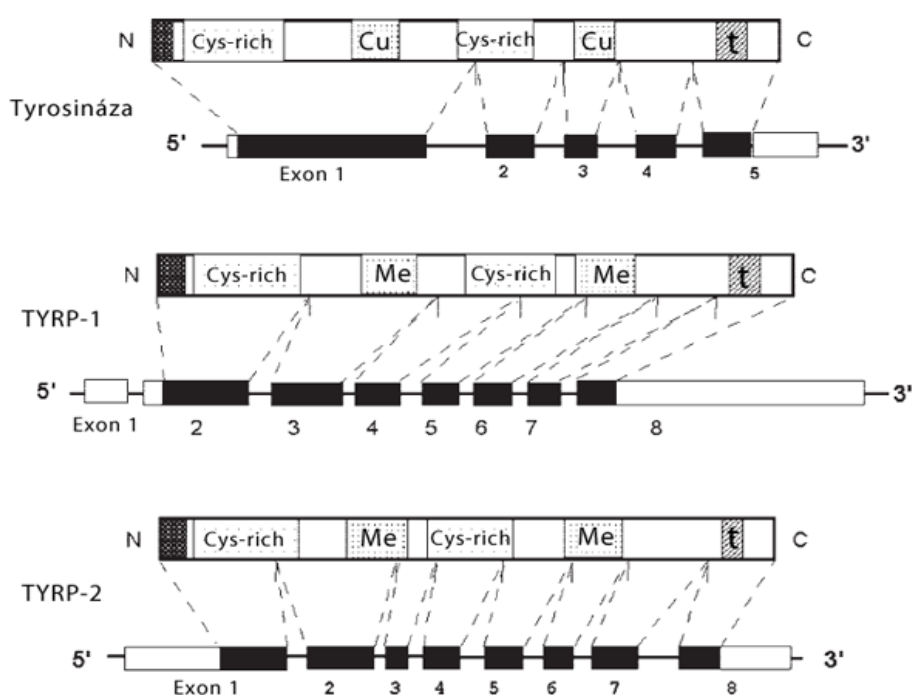
3.2.4 Tyrosináza jako gen a enzym

Tyrosináza je oficiálním názvem genu, který udává příkazy pro tvorbu enzymu zvaného stejně – tyrosináza, což je hlavní enzym regulující syntézu melaninu. Oficiální symbol tohoto genu je *TYR*, můžeme se u něj setkat i s jinými názvy, například LB24-AB, monofenol monooxygenáza, *OCA1A*, *OCA1A*, *SK29-AB* či *TYRO_HUMAN* (u člověka) nebo *OCA1*, *albino*, *c*, či *skc35* (u myši). Gen je zodpovědný za první krok v produkci melaninu. Převádí proteinovou stavební jednotku (aminokyselinu) zvanou tyrosin na dopachinon. *TYR* gen je kódován *albino* (*c*) lokusem (*TYR* lokus) a je u člověka lokalizován zde: NC_000011.10 (89177858..89295759), u myši na 7. chromozomu s přesnou lokalizací zde: NC_000073.6 (87425276..87493442, komplement) a u čínčily je dle NCBI udávána lokalizace zde: NW_004955414.1 (4244035-4314001). (NCBI, 2015a, b, c; NCBI, 2016b; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Produkty translace alternativně spojené tyrosinázové mRNA mohou sloužit jako regulační protein a chovat se například jako receptory pro L-tyrosin a L-DOPA. Enzymaticky nefunkční tyrosinázové proteiny se mohou projevit v nonmelanotických buňkách v místě původu nervové lišty (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Struktura tyrosinázového proteinu je mezi různými živočišnými druhy vysoce konzervativní a vykazuje homologii s dalšími proteiny (viz kapitola 3.2.5. Tyrosináze příbuzné protiny). Tyto proteiny mají několik oblastí a každá je z nějakého důvodu

důležitá. Část proteinu v cytoplasmě obsahuje oblast NH₂ signálního peptidu (důležitý pro intracelulární hospodaření s látkami a dění s nimi), dále doménu bohatou na cystein, dvě domény bohaté na histidin vázající měď mezi nimiž je důležitá katalytická oblast bohatá na cystein. Proteiny dále obsahují transmembránový hydrofóbní segment zakončený COOH. Transmembránová doména a cytoplazmatické domény jsou nutné pro zacílení enzymu na melanosom, zatímco NH₂ konec může sloužit jako protein vázající či regulační doména bez vztahu k enzymatické funkci. V obrázku č. 2 jsou posány tři výše uvedené proteiny a struktura jejich genů (exony).



Obrázek č.2: Struktury genů a proteinů tyrosinázy, TYRP1 a TYRP2/DCT. N a C jsou amino- a karboxy-zakončení proteinů, Cys-rich na cystein bohaté segmenty, Cu nebo Me měď či jiný kov vázající domény a t je transmembránový segment. Čísla ve struktuře genu reprezentují exony (převzato z SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Vyšší molekulární formy tyrosinázy mohou představovat dimery, těsné komplexy s dalšími melanogenními proteiny nebo vysokomolekulární těžké tyrosinázové proteiny (KUCHYNKA, 2007; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Pro správné zrání tyrosinázy, její správné cílení do melanosomů a tedy i produkci melaninu jsou nezbytným krokem správné procesy zpracování v rámci endoplasmatického retikula. V případě defektů v rámci OCA1-OCA4 je tedy zřejmé, že *in vivo* melanogenní aktivita závisí hlavně na posttranslačních procesech, ze kterých je nejdůležitější právě efektivní zpracování tyrosinázy (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

3.2.5 Tyrosináze příbuzné proteiny

Tyrosináze příbuzné proteiny (TRPs) stimulující syntézu eumelaninu, vykazují asi 40% homologii aminokyselin jako tyrosináza, se kterou mají i podobnou strukturu. Obsahují NH₂-koncovou signální sekvenci, oblasti bohaté na cystein, 2 oblasti bohaté na histidin, které vážou kovy (u *TYRP1* vážou železo, u *TYRP2* vážou zinek) a COOH-koncový transmembránový segment s krátkým cytoplazmatickým zakončením, který je důležitý pro zacílení enzymu do melanosomu. TRP1 je u člověka produktem *TYRP1* a u myši *b* lokusu (u myši též známý jako *b*, *isa*, *oca3*, *brown*). *TYRP1* je 37 kD dlouhý a sestává z 8 exonů a 7 intronů, přičemž exon 1 je nekódující sekvencí a exony 2-8 jsou kódující. Při funkční analýze lidského *TYRP1* se však ukázalo, že region obsahující intron a exon 1 měly posilující aktivitu pro gen. Alternativní spojování *TYRP1* pre-mRNA vytváří minimálně 2 izoformy, jednu kódující správný protein a druhou obsahující delecí 103. bazického páru na 5' konci exonu 8 vytvářející rozpustný TYRP1 protein bez transmembránové domény kvůli posunutí čtecího rámce. Potenciál pro produkci vícenásobných alternativně spojených izoform byl zjištěn analýzou sekvence genu *TYRP1*. U myši se TYRP1 chová jako DHICA oxidáza k tvorbě indol-5,6-chinonkarboxylové kyseliny. Aktivita TYRP1 proteinu je zjevně důležitá pro eumelanogenezi, jak napovídá jeho její nedostatek či defektivní exprese v buňkách vykazujících aktivní feomelanogenickou dráhu. Doplňková funkce TYRP1 může být zabezpečení správného zpracování tyrosinázy a stabilizace její enzymatické aktivity a zřejmě také udržování integrity melanosomální struktury. TRP2 je u člověka produktem *TYRP2/DCT* a u myši *slaty* lokusu (u myši též jako *slt*, *slaty*, *DT* aj.) (NCBI, 2016c). *TYRP2* je 60 kD dlouhý membránový protein typu 1 a sestává z 8 exonů a 7 intronů, přičemž všechny exony kódují finální protein. Jeho transkripce a další zpracování též může vytvářet několik alternativně spojených forem, zahrnující správnou TYRP2 mRNA a izoformy TYRP2-6b (inzerce 2 nových exonů z exonu 6 ve čtecím rámci; kóduje protein se sekvencí téměř stejnou jako TYRP2 s inzercí 33 aminokyselin ve čtecím rámci; pravděpodobně tak vzniká plně funkční enzym), TYRP2-LT (prodloužený 3' konec bez translace; kóduje protein identický jako TYRP2), TYRP2-INT2 (intron 2 se stop kodonem) a TYRP2-8b (nový exon 8b nahrazující exon 8). Tyto 2 izoformy odpovídají zkráceným enzymaticky inaktivním rozpustným proteinům bez transmembránových domén. TYRP2 se chová jako dopachrom-tautomeráza katalyzující transformaci dopachromu na DHICA a podobně jako TYRP1 je považován za eumelanogenický enzym a stabilizátor

tyrosinázové aktivity. Oba proteiny se mohou chovat jako enzymy modifikující rychlost eumelanogeneze jako regulátory či stabilizátory eumelanogenického systému *in vivo* a pravděpodobně jako regulátory ostatních funkcí melanocyty (COSTIN *et al.*, 2005; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

3.2.6 Další proteiny účastníci se melanogeneze

Přídavné enzymatické regulátory melanogeneze zahrnují peroxidázu, PMEL17/HMB45/gp100/SILV protein (proteiny) a katechol-*O*-methyltransferázu (COMT). Peroxidáza katalyzuje oxidaci DHI na DHICA. Lidský gen *PMEL17/HMB45/gp100/SILV* je u myši homologní se *silver* lokusem a je zmapován v chromozomu 12q12-q13. Gen obsahuje 11 exonů a 10 intronů s délkou 9,1 kb a během transkripce mRNA vznikají alespoň dvě alternativně spojené izoformy kódující proteiny PMEL17 a GP100. PMEL17 je protein složený ze 668 aminokyselin s potenciálem signálního peptidu a jednoduchou transmembránovou doménou blízko COOH zakončení. GP100 je protein složený z 661 aminokyselin s molekulární hmotností asi 100 kDa, čímž se liší od PMEL17 jednou substitucí (P274L) a delecí heptapeptidu (588VGILLT594) umístěného před transmembránovou doménou. PMEL17 katalyzuje polymeraci DHICA na melanin. PMEL17 a GP100 mohou také působit v melanosomech jako mřížka/rám pro ukládání melaninu stabilizující melaninové meziproducty. Jejich transkripty se projevují v mnoha tkáních, ale exprese proteinu je omezena na normální a maligní melanocyty, indikující omezenou translační regulaci (NCBI, 2016d; SOLANO *et al.*, 2000). Skupina proteinů COMT je zodpovědná *O*-metylací DOPA a její dihydroxyindolických meziproductů a je prezentována jako rozpustné a na membránu vázané izoformy. Působí hlavně jako inaktivátor toxických meziproductů melanogeneze a také může regulovat rychlost ranných kroků melanogeneze. Indolické melanogeny mohou být spojeny s kyselinou glukoronovu a sírovou k vytvoření indolických sulfátů a glukoronátových komplexů. Dále melanogenezi nepřímo ovlivňují enzymy jako glutation-reduktáza, glutation-peroxidáza, kataláza či MIF (faktor inhibující migraci makrofágu) jako přídavný modifikátor melanogeneze, který projevuje aktivitu *D*-dopachrom tautomerázy. Projev této aktivity mohou zastávat 2 enzymy - *D*-dopachrom tautomeráza (DDT), která přetváří *D*-dopachrom na DHI a další je sám MIF, který transformuje *D*-dopachrom na DHICA. Tyrosináza a GP100 jsou melanogenezi příbuzné proteiny (MRPs), které

reprezentují diagnostické markery a terapeutické doplňky managementu melanomu. Tyrosináza, TYRP1, TYRP2/DCT, GP100 a MART1 jsou klasifikovány jako hlavní histokompatibilní komplex (MHC) (NCBI, 2015; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

3.2.7 Mutace genů ovlivňujících zbarvení

Mutace spojené se zbarvením srsti u savců jsou velice často provázené pleiotrofními efekty, jejichž charakteristika poukazuje na skutečnost, že senzorické orgány a nervy jsou ovlivněny těmito poruchami kvůli stejnému původu melanocytů a neurocytů v neurální liště. Pigmentové buňky jsou nezbytně důležité pro vjemové orgány, hlavně pro smysly očí a uší a jejich počet, utváření a kvalita melaninu v jednotlivých vrstvách oka předurčuje nejen zbarvení oka, ale i ostrost vidění. Redukce pigmentu v oku ovlivňuje jeho funkci a vývoj a také ovlivňuje vzory duhovky, které bývají spojovány s očními onemocněními. V důsledku je tedy zbarvení očí dobrým indikátorem poruch v produkci pigmentu a očních dysfunkcí. Další poruchy spojené s těmito alelami se také projevují v reprodukčním systému a způsobují letalitu (mutace genu *KIT*), poruchy kůže (melanomy) a imunitním systému a individuálně se projevují v chování a tělesné kondici jedince. Některé mutace způsobují hluchotu (mutace genů *EDN3/EDNRB*, *MITF*, *PAX* a *SNAI2*). Poruchy vidění způsobují mutace genů *OCA2*, *RAB38*, *SLC24A5*, *SLC45A2*, *TRPM1* a *TYR* (REISSMANN a LUDWIG, 2013).

3.2.7.1 Mutace *TYR* a dalších genů s vlivem na vznik pigmentace u člověka a dalších savců

Nejčastější poruchou pigmentace způsobenou mutacemi genů, které mají vliv na zbarvení a pigmentaci, je albinismus. Je to genetický stav popisovaný jako několik specifických deficitů ve vizuálním systému způsobujících špatné vidění a spojených s fenotypem, který vykazuje různou míru hypopigmentace. Tato redukovaná produkce pigmentů může ovlivnit oči, kůži a vlasy, kdy se jedná o tzv. okulokutánní albinismus (OCA) nebo ovlivní jen oči, což je okulární albinismus (OA) u myší způsobený mutací genu *SLC45A2*. Dále existuje několik syndromických forem albinismu, kdy se k hypopigmentovanému fenotypu přidávají patologické alterace, a sice Hermansky-Pudlak syndrom (HPS) a Chediak-Higashi syndrom (CHS, mutace genu *LYST*). OCA má několik typů a každý je způsoben mutací konkrétního genu: tyrosinnegativní okulokutánní albinismus typu 1 (OCA1; mutace genu *TYR*), okulokutánní albinismus typu 2 (OCA2; mutace genu *OCA2*), okulokutánní albinismus typu 3 (OCA3; mutace

genu *TYRP1*), okulokutánní albinismus typu 4 (OCA4; mutace genu *SLC45A2*), další nedávno objevený typ okulokutánní albinismus typu 5 (OCA5; gen identifikovaný v lidském lokusu v chromozomálním regionu 4q24) a dva nově identifikované geny, které při mutaci způsobují OCA, *SLC24A5* (OCA6) a *C10orf11* (OCA7). OCA1 vzniká v důsledku nedostatečné produkce enzymu tyrosinázy způsobené mutací *TYR*. Je to nejčastější forma albinismu s typickými projevy na očích, vlasech a kůži (bílé vlasy, růžovo-bílá kůže, transparentní duhovka) a vykazuje autozomálně-recesivní dědičnost. U člověka dále mutace způsobuje nystagmus a hypoplazii ve spojení s nízkou ostroť vidění. U myši (a dalších hlodavců) s albinismem však nepozorujeme žádné negativní pleiotropní efekty, protože pro pigmentaci epitelu rohovky jim stačí 35% aktivita funkce *Tyr*. Mohou se objevit jen retinální funkční abnormality nebo ztráta fotoreceptorů a barva očí bývá červená. Okulokutánní albinismus typu 2 (OCA2), což je druhá nejčastější forma albinismu, je způsoben mutacemi či delecemi v *OCA2/P proteinu* (u myši homologu *pink-eyed dilution*) a jedinci s touto mutací mají tmavší oči, kůži a lepší ostrost vidění oproti těm s OCA1. Změny v důsledku OCA3 (mutace *TYRP1*) nebyly podrobně zkoumány, vlivem mutace však dochází k degradaci tyrosinázy a ke značné redukci pigmentace. V genu *SLC45A2* bylo identifikováno několik patogenních mutací, způsobujících okulokutánní albinismus typu 4 (OCA4) a stejně jako u OCA2 dochází k poruše řazení tyrosinázy z TGN do melanosomů. U zvířat obecně je identifikováno mnoho mutací *OCA* genů a často je jejich efektem depigmentace srsti a světlejší barva očí, nevykazují však většinou dysfunkce či těžké poruchy (například slepota) na rozdíl od člověka. Spíše způsobují jakési nevýhody v přežití spočívající ve špatné kamufláži, selekci při sexuálním a sociálním chování v přírodě atd. Tabulka v příloze č. 1 udává mutace genu *tyrosinázy* spojené s OCA1. Tabulka v příloze č.2 popisuje souhrn mutací souvisejících se zbarvením srsti a jejich pleiotropní efekty u člověka a myši. Je potřeba brát na vědomí, že specifický efekt mutace záleží na jejím stavu, tzn. jestli je homozygotní nebo heterozygotní, a barva fenotypu je kvantitativní genetická vlastnost, kterou ovlivňuje i mnoho jiných genů (KUCHYNKA, 2007; MONTOLIU *et al.*, 2014; REISSMANN a LUDWIG, 2013; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Buňky produkující pigment jsou také důležité pro sluch. Není přesně znám mechanismus, ale melanocyty se zdají být nezbytné pro vývoj hlemýždě (součást středního ucha), jehož poruchy mohou být způsobeny nedostatkem intermediálních buněk ve *stria vascularis*. Tyto poruchy jsou příčinou vrozené hluchoty a depigmentace.

Příkladem u psů je mutace *PMEL* spojená se zbarvením merle a hluchotou (u homozygotů) (REISSMANN a LUDWIG, 2013).

3.2.7.2 Mutace genu *Tyr* a dalších genů s vlivem na fenotyp u myši

Mutace ovlivňující zbarvení u myši se týkají více genů stejně jako u člověka, je to hlavně *Tyr*, dále *DCT* a *Tyrrp1* a každý produkuje enzym. Enzym DCT je u myši kódován na *slaty* lokusu (*Dct*), TYRP1 je kódován na *black/brown* lokusu (*Tyrrp1*). Tyto tři enzymy fungují společně či se navzájem ovlivňují. Pokud jeden z nich je mutovaný, ovlivňuje fenotyp spojený s tím druhým. TYRP1 může také ovlivnit stabilitu tyrosinázy a oba proteiny jsou společně transportovány z endoplasmatického retikula do melanosomu. Myši s chybějícím *Tyrrp1* (delece) nebo *Dct* (knockout) mají pigmentaci ovlivněnou jen málo. Při nedostatku *Tyrrp1* vykazují myši spíše hnědé zbarvení srsti, při nedostatku *Dct* tmavě šedé. Mutantní melanocyty této alely nesou *slaty* a *slaty light* mutace. *Slaty* mutace R194Q mění schopnost enzymu transformovat substrát. *Slaty light* mutace G486R způsobuje posun transmembránové domény k N-konci, takže zasahuje do funkce *Dct*. Obě mutace zvyšují produkci feomelaninu a redukují produkci eumelaninu. Na *slaty* lokusu jsou dvě recesivní alely: *slaty* (*Dct^{sl}*) and *slaty2J* (*Dct^{sl-2J}*) a jedna semidominantní mutace *slaty light* (*Dct^{sl-lt}*). Mutace způsobují zesvětlení barvy srsti z černé na různé odstíny šedé. *Dct* zvyšuje aktivitu Tyr stabilizací proteinu. Mutace se více projevují ve zbarvení u myši než u člověka, u kterého nebyla nalezena spojitost s poruchami pigmentace (ITO a WAKAMATSU, 2011). Předpokládá se však, že existuje spojitost s jemnou formou OCA. U myši způsobují mutace *Dct* zánik melanocytů, pravděpodobně kvůli cytotoxickým meziproduktům vzniklým při absenci, melanocyty jsou tedy u mutantů extrémně křehké (COSTIN *et al.*, 2005). U myši s mutací na *Tyr* (kromě „platinum“) dochází spíše k redukci množství feomelaninu než eumelaninu. Dopad mutací tohoto lokusu je tedy větší u feomelanotických myši než u eumelanotických a je vyšší ve feomelanotických oblastech (břicho). Další lokusy, které při mutaci ovlivňují pigmentaci, již nejsou tak úzce spojené s tyrosinázou, přesto mají určitý vliv. Jedná se o *pink-eyed dilution/p* (u člověka způsobuje OCA2), *underwhite/uw/Matp* (u člověka způsobuje OCA4) a *Mitf*. Tyto modulují expresi spousty melanocyt-specifických genů včetně *Tyr* a *Tyrrp1* a také ovlivňují přepínání mezi eu- a feomelaninem. *Extension/e* lokus u myši kóduje MC1R, který je zodpovědný za prostředí vlasového folikulu, kde se melanocyt nachází. Mutace na tomto lokusu

způsobuje, že melanokortinové receptory nejsou citlivé na prostředí a jsou konstitučně aktivní, což má za následek produkci pouze eumelaninu (mutanti *sombre/Mc1r^{E-so}*). Receptory mohou být také konstitutivně inaktivní, kdy je pak produkován pouze feomelanin, což můžeme vidět u vlasových folikulů *yellow/Mc1r^e* mutantů u myši. Wildtype MC1R je aktivní, dokud není blokován proteinem kódovaným na *agouti* lokusu (přepínání eumelaninů). U žlutých myši s mutací *agouti* lokusu k tomuto přepínání nedochází, protože stále pokračuje produkce jeho proteinu. Přepínací mechanismus ovlivňují i lokusy *mahogany (Atrn)* a *mahoganoide* a u mutantních myši způsobují zvýšenou produkci eumelaninu (BEERMAN *et al.*, 2004).

Množství alel myšího *Tyr* lokusu s různými typy genetických defektů poukazují na dynamické interakce v procesech dějících se mezi transkripcí *Tyr* včetně a výsledným fenotypem zvířete, jako jsou transkripce, translace, post-translační úpravy, transportní mechanismy a interakce s produkty jiných lokusů (BEERMAN *et al.*, 2004). Již méně mutantních alel, ale též měnících fenotyp, se vyskytují na blízké příbuzném genu *Typr2/Dct*. Konkrétní alely, mutace a fenotypy vyskytující se u genu *Tyr* u myši jsou uvedeny v tabulce č. 1. Již zmíněné a některé další mutantní alely genu *Typr2* s popisem mutace a změnou fenotypu u myši jsou popsány v tabulce č. 2. Jsou lokalizovány na pozici Chr14:118012792-118052246 bp, genetická pozice je Chr14, 61.6 cM a jsou na mínusovém vlákně.

Tabulka č. 1: Mutantní alely genu *Tyr* u myši

Alela	Mutace (pozice)	Substituce aminokyseliny (pozice)	Fenotyp
<i>wild-type, Tyr</i> (<i>Tyr⁺/Tyr⁺, a/a</i>)	-	-	Plně pigmentovaný; tmavě šedá až černá srst, černé oči
<i>Tyr^{c-6H}, Tyr^{c-14CoS}</i> <i>Albino (Tyr^c)</i>	Delece C>G (+387)	- Cys>Ser (103)	depigmentovaný Albinotický; kompletní absence pigmentu kůže i očí, aberantní zkřížení zrakového nervu na úrovni chiasmu
<i>Albino</i> (<i>Tyr^{c-2J}/Tyr^{c-2J}</i>)	G>T (+309)	Arg>Leu (kodon 77)	Identický k <i>Tyr^c</i>
<i>Chinchilla</i> (<i>Tyr^{c-ch}/Tyr^{c-ch}</i>)	Bodová mutace G>A (+1523)	Ala>Thr (+482)	Jako „wild-type“ <i>Tyr</i> , ale nižší produkce pigmentu
<i>Platinum</i> (<i>Tyr^{c-p}/Tyr^{c-p}</i>)	Spontánní mutace G>A (+1523)	Nahrazení zbytku Lys terminačním kodonem	Velmi světlá srst, růžové oči

<i>Extreme dilution</i> (<i>Tyr^{c-e}/Tyr^{c-e}</i>)	Bodová mutace G>A (+1523)	Ala>Thr – úplně stejná mutace jako u <i>chinchilla</i> (A482T)	„midgray“-intenzita zbarvení srsti přesně mezi <i>wildtype</i> a <i>albino</i> , oči blíže k černé
<i>Himalayan</i> (<i>Tyr^{c-h}/Tyr^{c-h}</i>)	Spontánní mutace A>G (nukleotid 1338)	His>Arg (420)	Běžové tělo, tmavě béžové končetiny, tmavě červené oči (jako u koček a králíků-více pigmentu na chladnějších částech těla)
<i>Acromelanic</i> (<i>Tyr^{c-a}/Tyr^{c-a}</i>)	Spontánní mutace	Nedetekován protein, málo RNA	Běžové tělo, tmavé oči, tmavší končetiny, uši, ocas
<i>Dark-eyed albino</i> (<i>Tyr^{c-44H}/Tyr^{c-44H}</i>)	Bodová mutace G>T (+515)	Ser>Ile (+146)	Bílá srst, červené oči, které se stanou černými ve 3-4 měsících věku
<i>Chinchilla-mottled</i> (<i>Tyr^{c-m}/Tyr^{c-m}</i>)	Změněná chromatinová struktura a exprese Tyr; přeskupení zahrnující 30 kb v 5' regionu		Skvrnitá pigmentace připomínající chimerismus <i>chinchilla</i> barvy, světější odstín; tmavě a světle šedé pruhy na těle, tmavé oči se skvrnami
<i>Chinchilla-mottled</i> (<i>Tyr^{c-1R}/Tyr^{c-1R}</i>)	Inzerce 5,4-kb na -225 bp promotoru <i>Tyr</i> vlivem intracisternálního A- částicového genu (IAP); IAP izoluje promotor <i>Tyr</i> od kontrolní oblasti lokusu, promotor se vzdaluje od enhanceru → ovlivnění exprese		Skvrnitá pigmentace připomínající chimerismus <i>chinchilla</i> barvy, světější odstín
<i>Extreme-dilution mottled</i> (<i>Tyr^{c-em}/Tyr^{c-1R}</i>)	Bodová mutace C>T (+1220)	Thr>Ile (+373)	Světle šedá srst, černé oči se skvrnami

Převzato z: BEERMAN *et al.* (2004)

Tabulka č. 2: Mutantní alely genu *Dct* u myši

Alela	Mutace (pozice)	Substituce (pozice)	Fenotyp
<i>Slaty</i> ; <i>Dct^{Slt}/Dct^{Slt}</i>	Spontánní bodová mutace G>A (985)	Výsledek – missense mutace	S nonagouti zesvětlení černé na tmavě šedou/hnědou, uši nažloutlé
<i>Slaty 2 Jackson</i> ; <i>Dct^{Slt-2J}/Dct^{Slt-2J}</i>	Spontánní nukleotidová substituce C>T (1764)	-	S non-agouti je černá zesvětlená na tmavě šedou/hnědou, uši nažloutlé
<i>Slaty light 3 Jackson</i> ; <i>Dct^{Slt-lt3J}/Dct^{Slt-lt3J}</i>	Spontánní bodová mutace G>A	Arg>Gly v transmembránové doméně kódované exonem 8	Srst světle šedá místo černé; po 8 měsících známky rozptýlení pigmentu duhovky
<i>Slaty light 3 Jackson</i> ; <i>Dct^{Slt-lt3J}/Dct⁺</i>	Spontánní bodová mutace G>A	Arg>Gly v transmembránové doméně kódované exonem 8	Světle šedá srst místo černé

<i>Slaty light</i> ; <i>Dct^{Slt-It}/Dct^{Slt-It}</i>	Spontánní bodová mutace	Gly>Arg (486)	Srst tmavě hnědá; u heterozygotních agouti je barva světlá agouti; u homozygotních agouti je srst žluto-hnědá
<i>Slaty light</i> ; <i>Dct^{Slt-It}/Dct⁺</i>	Spontánní bodová mutace	Gly>Arg (486)	Nonagouti myši tmavě hnědé, podobné jako homozygoti <i>Dct^{Slt}</i> nebo heterozygoti <i>Dct^{Slt-It}</i>
<i>Targeted mutation 1, Fridrich Beermann</i> ; <i>Dct^{tm1(cre)Bee}/Dct^{tm1(cre)Bee}</i>	Rekombinace, inzerce, intragenová delece	Exon 1 nahrazen kazetou obsahující cre a neo	Srst zesvětlená na agouti i nonagouti pozadí; mwlanin redukován oproti wildtype, ale vyšší než u <i>Dct^{Slt}/Dct^{Slt}</i> myši

Převzato z: MGI (2016)

3.2.8 Hormonální stimulatory melanogeneze

Melanokortiny (melanocyt stimulující hormony, MSH) a adrenokortikotropiny (ACTH) hrají důležitou roli v regulaci melanogeneze, konkrétně v purifikaci a plném sekvenování α - a β -MSH peptidů. α -, β -MSH a ACTH jsou peptidy derivované z proopiomelanokortinového genu (*POMC*) s výrazně melanogenní aktivitou (DESSINIOTI *et al.*, 2011). Strukturálně mají s ACTH společnou aminokyselinovou sekvenci, v níž část je kritická pro melanotropickou aktivitu. U savců jako jsou hlodavci stimulují MSH peptidy eu- i feomelanogenezi a zároveň přepínají feomelanogenickou dráhu na eumelanogenickou, dále α -MSH u myši a křečků stimuluje folikulární melanogenezi, záviselá na genotypu a cyklu srsti, a stimuluje aktivitu tyrosinázy na transkripční, translační a posttranslační úrovni, což je podobné cyklem srsti omezené expresi genů příbuzných melanogenezi, koncentraci proteinů a enzymatické aktivitě. β -MSH také stimuluje aktivitu tyrosinázy, jak se ukázalo v kůži křečků a černých a hnědých myši a také má aktuální melanogenickou aktivitu u dospělých morčat a bezsrstých myši. U člověka stimulují melanokortiny pigmentaci kůže, hlavně v oblastech vystavených slunci. Při zvýšené hladině ACTH při některých onemocněních je také vyšší vznik hyperpigmentace a atrofie kůže. U pacientů s mutacemi *POMC* proteinů podvěsku mozkového (produkce vadných proteinů) se objevují zrzavé vlasy a časný nástup obezity. Polymorfismus *MC1R* je tedy spojen s pigmentací kůže a vlasů a mutace, které snižují jeho aktivitu, vedou ke světlejší kůži a zrzavým vlasům. Co se týká melanomů u hlodavců, α - a β -MSH stimulují melanogenezi aktivováním tyrosinázy stejně jako u kroků post-dopa oxidázy, stimulačně se projevují v těchto melanocytech silněji než ACTH a v regulaci funkcí melanocytů u maligních hlodavců byla též prokázána role *MCR*. Na buněčnou proliferaci mají MSH různý vliv, například u amelanotických

buněk ji inhibují. Dále stimulují formaci dendritů. Protein γ -MSH nemá kromě stimulace produkce cAMP (cyklický adenosinmonofosfát, derivát ATP, fungující jako vnitrobuněčná posila v řadě signálních drah) žádný či jen malý efekt na stimulaci nebo proliferaci melanogeneze (CATANIA, 2010; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

3.2.9 Melanokortinové receptory

Receptory hormonálních stimulatorů melanogeneze neboli melanokortinové receptory hrají velkou roli ve fyziologii, také byly studovány efekty jejich mutací a polymorfismů. Jsou kódovány geny ze skupiny *MCR* genů („melanocortin receptor genes“) sestávající z pěti zástupců o jednom exonu loklizovaných na autozomech, přičemž jejich počet aminokyselin se pohybuje od 296 po 332. *MC2R*, *MC4R* a *MC5R* jsou lokalizovány na jednom chromozomu (u člověka a myši na 18.). V genomech člověka, krávy, psa a myši jsou synténní geny *MC2R*, *MC4R* a *MC5R*, u prasete jsou synténní *MC1R*, *MC2R* a *MC5R* geny. Geny *MC1R* a *MC4R* jsou konzervativně organizovány u pěti výše zmíněných druhů savců ve smyslu kódovaných sekvencí aminokyselin. Největší pozornost při analýzách týkajících se fenotypu a zbarvení je věnována genům *MC1R* a *MC4R*, o fenotypových efektech polymorfismů u ostatních zástupců genů *MCR* jsou jen vzácné vědomosti, jelikož se u nich tyto efekty příliš nevyskytují a nejsou tedy zkoumány (SWITONSKI *et al.*, 2013). Melanokortinový systém je regulován endogenními antagonisty (agouti protein, AGRP aj.) (CATANIA, 2010).

Kódované receptory vážou čtyři ligandy: α -, β - a γ -MSH a ACTH (POMC), přičemž jejich spřízněnost s *MCR* závisí na zkoumaném druhu, například u klonovaných hlodavců je *MC1R* vysoce spřízněn s α -MSH, ale málo s β -MSH a ACTH, ještě méně s γ -MSH. U člověka vykazuje *MC1R* vysokou afinitu s α -MSH a ACTH a nižší pro β - a γ -MSH. *MC2R* vykazuje absolutní specifitu pro ACTH (SLOMINSKI *et al.*, 2004). Exprese *MCR* genů je tkáňově specifická - *MC1R* se hlavně projevuje v melanocytech, *MC2R* v kůře nadledvin, *MC3R* a *MC4R* v nervovém systému a *MC5R* v mazových žlázách a jiných tkáních (mozek, plíce, ledviny a svaly) (YANG, 2011).

3.2.9.1 Gen *MC1R*

Melanokortinový receptor typu 1 má klíčovou úlohu v melanogenezi, jelikož funguje jako přepínač pigmentu při produkci melaninu. Když je aktivován α -MSH, zahajuje syntézu eumelaninu prostřednictvím cyklického adenosin monofosfátu (cAMP)

a při absenci či úplné inhibici stimulace je produkován feomelanin. Dominantní mutace způsobující neschopnost vazby α -MSH způsobují stálou produkci eumelaninu a tedy celočerné zbarvení (GONÇALVES *et al.*, 2013). Polymorfismus *MC1R* je zodpovědný za různorodost pigmentace a má vliv na zbarvení vlasů a kůže u lidí a srsti a kůže u zvířat. Je kódovaný *e* lokusem (*extension*) u myši na 8. chromozomu (u člověka je gen lokalizován na chromozomu 16q24.3) (DESSINIOTI *et al.*, 2011), přičemž dominantní mutace tohoto lokusu jsou spojovány s celočerným fenotypem recesivní *agouti* mutace a recesivní mutace *extension* lokusu způsobují celožluté zbarvení jako při dominantní *agouti* mutaci. Výsledkem mutací *MC1R*, které způsobují nepřístupnost melanocytů pokožky pro MSH, je zrzavý fenotyp (SLOMINSKI *et al.*, 2004). Polymorfní varianty genu s účinkem na pigmentaci byly popsány u lidí, domestikovaných savců (kráva, kůň, prase, ovce, pes) i u farmově chovaných a polárních lišek. Hojně studované polymorfismy u domestikovaných zvířat ukazují unikátní zbarvení srsti. U člověka je pigmentace pokožky, vlasů i očí řízena asi 120 geny, ale hlavní roli hraje právě *MC1R*, pro který bylo identifikováno více než 100 polymorfismů beze smyslu, avšak funkční či fenotypové efekty byly popsány pouze pro 15 z nich. Dle STURM (2009) se mutace tohoto genu vyskytují jen u evropské populace. U myši se jedná o lokus *Mclr* (*extension/recessive yellow*), jehož mutace způsobující ztrátu funkčnosti (tzv. loss-of-function) dávají myším predominantně žlutou srst. Znovunabytí funkčnosti pak způsobuje tmavou srst (BENNETT a LAMOREUX, 2003; DESSINIOTI *et al.*, 2011; STURM, 2009; SWITONSKI *et al.*, 2013).

3.2.9.2 Geny *MC2R* - *MC5R*

Gen *MC2R* (*ACTHR*) kóduje receptor pro adrenokortikotropní hormon (ACTH), který je primárně zodpovědný za regulaci glukokortikoidní sekrece (SLOMINSKI *et al.*, 2004). ACTH aktivuje *MC2R* a navozuje produkci glukokortikoidů a sekreci v kůře nadledvin. Pro expresi *MC2R* a pro jeho transport do plasmatické membrány jsou nezbytné doplňkové proteiny melanokortinového receptoru (MRAP, MRAP2; malé transmembránové proteiny) (NOVOSELOVA *et al.*, 2013). Výzkum dle CHIDA (2007) ukázal, že zásadní pohled na roli *MC2R* pochází od myši, jejichž DNA byla geneticky upravena, tudíž se u ní neprojeví jednotlivé proteiny (tzv. knockout mice) a bylo prokázáno, že u většiny těchto myši způsobuje neonatální letalitu. Tyto myši jsou dobrým modelem pro vzácnou autozomální dědičnou nemoc u člověka, familiární

glukokortikoidní nedostatek (FGD). Ve spojení s touto nemocí bylo identifikováno 25 mutací bez smyslu v lidském *MC2R*. Většina těchto mutací vedla k neúspěšné cestě proteinu na buněčný povrch. Jiné mutace mají také vztah k onemocnění u člověka, u domestikovaných savců však nikoliv (SWITONSKI *et al.*, 2013).

Melanokortinový receptor typu 3, stejně jako *MC4R*, je důležitý v energetické homeostázi, jeho polymorfismy či mutace však nemají prokázáný vliv na obezitu u člověka jako *MC4R* a u domestikovaných savců je tento gen studován jen málo. Například CIVÁŇOVÁ *et al.* (2004) popsala dva tiché jednonukleotidové polymorfismy (SNP) u prasečího *MC3R* (SWITONSKI *et al.*, 2013). Na všechny POMC reaguje se stejnou silou a účinností a je unikátní v síle aktivaty γ -MSH. Projevuje se v mozkové, placentární a střevní tkáni, nikoliv u melanocytů melanomů ani v kůře nadledvin, tudíž nemá vliv na pigmentaci (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Melanokortinový receptor typu 4 má hlavní úlohu v kontrole příjmu potravy a ve výdeji energie, čímž zodpovídá za uložení tukové tkáně a je také kandidátním genem pro obezitu u člověka. Reaguje stejně na α -MSH i ACTH, primárně se projevuje v mozku (SLOMINSKI *et al.*, 2004). Oproti vysokému polymorfismu *MC1R* u domestikovaných zvířat je *MC4R* vysoce polymorfní spíše u člověka, kde existuje ve více než 150 variantách, z nichž některé jsou příčinou monogenní obezity či výrazně přispívají k rozvoji polygenní obezity. Nízký počet polymorfismů u prasat či krav může odrážet selekční tlak na nižší podíl tuku ve svalovině. U některých plemen *MC4R* (konkrétně substituce bez smyslu 298Asp \rightarrow Asn) významně přispívá k akumulaci tukové tkáně, ovlivňuje míru konverze krmiva a denní přírůstek. Jeho varianty jsou rozděleny do několika skupin dle jejich fenotypového efektu. Třída I způsobuje velice sníženou expresi, třída II způsobuje zadržení receptoru uvnitř buňky, mutace třídy III se projevují na buněčném povrchu. Třída IV způsobuje špatnou signalizaci, čímž se snižuje síla a účinnost a třída V jsou varianty s neznámým efektem. Některé varianty poskytují ochranu před obezitou, naopak určité SNP vytváří pro obezitu predispozici či jsou významně spojené s vyšším BMI (NOWACKA-WOSZUK *et al.*, 2012; SWITONSKI *et al.*, 2013).

Melanokortinový receptor typu 5 váže především α -MSH a projevuje se v centrální nervové soustavě a v různých periferních tkáních, hlavně však v kůži. Kódovaný protein je zahrnut v různých fyziologických procesech včetně metabolismu tuků, exokrinních funkcí a protizánětlivé aktivity. Je to funkční kandidátní gen pro obezitu

u lidí i domestikovaných zvířat. Má tedy mnoho funkcí, ale jen několik polymorfismů u člověka a domestikovaných zvířat. Například v genomu prasete byl lokalizován blízko markeru S0059, což je uvnitř QTL pro tloušťku a kvalitu masa. U člověka jsou polymorfismy tohoto genu spojovány s obezitou, dále se stavem kůže, metabolickými či mentálními poruchami, diabetem 2. typu, šizofrenií atd (SLOMINSKI *et al.*, 2004; SWITONSKI *et al.*, 2013).

3.2.10 Antagonisté melanokortinu

3.2.10.1 *Agouti* protein

Antagonisté melanokortinu patří mezi hormonální inhibitory melanogeneze (společně se serotoninem, melatoninem, který se transformuje ze serotoninu, dopaminem a acetylcholinem). Jedním z nich je *agouti* protein, produkováný v kožních papilárních buňkách a kódovaný genem *a/nonagouti/Asip* (*agouti* signální protein) (NCBI, 2016e). Antagonizuje akci α -MSH přes *MC1R*, *MC3R* a *MC4R* přímým či inverzním antagonizmem. *Agouti* locus (*a*) u myši na 2. chromozomu reguluje cyklickou produkci granul černého a žlutého pigmentu, čímž vytváří typické *agouti* zbarvení a vlas při tomto zbarvení je černý se žlutými pruhy. Působí tedy v rámci mikroprostředí vlasového folikulu v průběhu růstu vlasu a střídavě přepíná syntézu eumelaninu a feomelaninu tím způsobem, že střídavě aktivuje a inaktivuje *MC1R*. *Agouti* gen kóduje polypeptid sestávající ze 131 aminokyselin a projevuje se ve varlatech a kůži, ale ne v melanocytech. Dominantní *agouti* mutace (*lethal yellow*, *A^y*) je způsobena delecí 120 kb v *agouti* genu a dohromady s celožlutým fenotypem způsobuje u heterozygotů těžkou obezitu, diabetes a náchylnost k rozvoji nádorů kvůli přeorganizování chromozomů, v důsledku čehož dochází k produkci chimerického genu a mRNA. Recesivní mutace *agouti* (*a*, *nonagouti*) způsobují u myši celočerné zbarvení (při ztrátě funkce *agouti* genu), dominantní alely celožluté (při konstatní expresi *agouti* proteinu). Tyto „žluté“ mutace způsobuje přeskupení či inserce chromozomu, které řadí aktivní promotor vedle *agouti* genu (BLACK a REEVE, 2001; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Gen *agouti* má 2 promotory, jeden vytváří pulzní expresi prostřednictvím kůže divoce zbarvených myši (typické *agouti* zbarvení, pruhovaný vlas), druhý je aktivní jen na ventrální ploše těla, tedy na kůži břicha. Stálá exprese genu zde potlačuje pulzní expresi a vytváří tak žluté břicho (bělobřichý *agouti* fenotyp). Mutantní fenotyp *black*

and tan má inaktivní pulzní promotor, což způsobuje černé zbarvení, a aktivní venrální promotor, tudíž má břicho žluté nebo tan barvy (BLACK a REEVE, 2001).

Existují 2 modifikátory agouti proteinu, atraktin (*Atrn*) či mahogany (*mg*) a mahoganoid (*md*) či mahogunin (*Mgrn1*), což jsou v podstatě mutace s podobným pleiotropním efektem na zbarvení srsti a hospodaření s energií u *A(y)* myši. Mutace v obou genech modifikátorů se chovají epistaticky k *A(y)* a tím potlačují žluté zbarvení srsti a obezitu, které jsou způsobené přílišnou expresí *ASP* („agouti-signalling protein“) (DONOHOUE, 2008). *Mahogany* lokus byl identifikován jako zdroj pro recesivní supresi agouti proteinu, funkční protein je tedy zodpovědný za akci agouti proteinu, která modifikuje zbarvení srsti antagonizmem k *MC1R*. Je tedy doplňkovým receptorem agouti proteinu a projevuje se v mnoha tkáních včetně pigmentových buněk a hypotalamu. Jeho extracelulární oblast je ortologem atraktinu (*Atrn*) u člověka, což je cirkulující molekula produkovaná aktivovanými T buňkami (molekulární základ komunikace mezi MCR signalizací a funkcí imunity). Atraktin se také účastní kontroly metabolismu a potravního chování vzhledem k jeho supresi agouti proteinu. Mahoganoid je mutantní alela, která ztmavuje barvu srsti, snižuje obezitu u *A(y)* myši s výrazně vyšší expresí agouti proteinu a zabraňuje melanocytům vlasového folikulu reagovat na *agouti* protein. Homolog genu u člověka je z 81% identický tomu myšimu. Stejně jako u mutace atraktinu způsobující spongiformní neurodegeneraci, nulová mutace (bez exprese) mahoganoidu způsobuje neuropatologii závislou na věku (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

3.2.10.2 Agouti příbuzný protein

AGRP (agouti-příbuzný protein) je silným apetit-stimulujícím neuropeptidem, který se projevuje hlavně v obloukovitém jádru hypotalamu a kůře nadledvin. Byl identifikován na základě podobnosti genomické velikosti a struktury s agouti proteinem. Agouti protein i AGRP jsou parakrinní signální molekuly, které blokuje akci melanokortinových agonistů *MC3R* a *MC4R*, přičemž AGRP je k *MC4R* inverzním agonistou. Blokací *MCR* regulují v hypotalamu tělesnou hmotnost, což je příčinou obezity u myši s mutací *lethal yellow* (*A^y*), u kterých je agouti protein přehnaně vyjádřen v mnoha tkáních včetně mozku (CATANIA, 2010). AGRP dále inhibuje vazbu agouti proteinu na *MC1R* a společně s agouti proteinem mohou sdílet místo vazby na *MC1R*, u transgenních myši však AGRP nemá na pigmentaci žádný vliv. U člověka vykazuje

polymorfismy promotorů i kódujících oblastí, což ovlivňuje stupeň exprese AGRP a expresi fenotypu (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

3.3 Shrnutí genetiky zbarvení u studovaných druhů savců

Literární přehled má za úkol ukázat, rozdělit a popsat všechny důležité geny, procesy a souvislosti, které ovlivňují zbarvení savců. Zaměřuje se na myš domácí jako modelový organismus, dále na člověka a na činčilu vlnatou a porovnává zjištěné údaje mezi nimi. Tabulka č. 3 uvádí souhrn nejdůležitějších genů ovlivňujících zbarvení, jejich symboly, další označení a protein, který kódují. V tabulce č. 4 jsou pro tři zkoumané živočišné rody uvedené konkrétní geny a jejich ID (identifikační číslo), kdy pouze u genu *Mc1r* nebyla u činčily vlnaté zatím konkrétně zjištěna lokace.

Dále existuje velké množství genů, které přímo i nepřímo ovlivňují pigmentaci a jsou zapojeny do mnoha metabolických či jiných drah v organismu. Účastní se například vývoje organismu, transportu melanosomů, jsou součástí melanosomů, jejich struktury, transportu a prekurzorů, dále ovlivňují funkci melanocytů, eumelaninu a feomelaninu. Mutace, které ovlivňují zbarvení se často projeví zároveň s jinými jevy jako například onemocnění ledvin a nadledvin, defekty neurální lišty, mikroftalmie, anoftalmie, celková absence srsti a další a také ovlivňují vývoj organismu a mohou způsobovat předčasné stárnutí s brzkým šedivěním. V příložených tabulkách jsou uvedeny vybrané mutantní alely u klonovaných (příloha č.3) a neklonovaných (příloha č.4) myší s popisem funkcí v pigmentaci a dalších změn v organismu spojených s mutacemi. U člověka je symbol genu stejný, jen velkými písmeny.

Tabulka č. 3: Souhrn nejdůležitějších genů ovlivňujících zbarvení

Lokus/gen	Symbol	Jiné názvy	Protein
<i>agouti</i>	<i>a</i>	<i>ASIP, ASP, nonagouti, A3, A^(y)</i>	Aguti signální protein
<i>Agrp</i>		<i>AGRT, ART, ASIP2, Agrt, Art</i>	Aguti příbuzný protein
<i>albino</i>	<i>c</i>	<i>color, TYR, OCA1</i>	Tyrosináza (TYR)
<i>brown</i>	<i>b</i>	<i>TYRP1, TRP-1, OCA3, isa, TRP1, Tyrp</i>	Tyrosináze příbuzný protein (TYRP1)
<i>extension</i>	<i>e</i>	<i>MC1R</i>	Melanokortin 1 receptor
<i>pink-eyed dilute</i>	<i>p</i>	<i>P, OCA2</i>	OCA2
<i>silver</i>	<i>si</i>	<i>SILV, PMEL 17, gp87, gp100</i>	PMEL 17
<i>slaty</i>	<i>slt</i>	<i>TYRP2, Dct, DT, Tyrp2</i>	Tyrosináze příbuzný protein 2, dopachrom teutomeráza
<i>underwhite</i>	<i>uw</i>	<i>Solute carrier family 45, OCA4, member 2LOC51151, Dbr, SLC45A2, blanc-sale</i>	OCA4

Tabulka č. 4: Geny pro zbarvení a jejich ID u rodů *Homo sapiens*, *Mus musculus* a *Chinchilla lanigera*.

Gen	<i>Homo sapiens</i>		<i>Mus musculus</i>		<i>Chinchilla lanigera</i>	
	Gen	ID genu	Gen	ID genu	Gen	ID genu
<i>MC1R</i>	<i>MC1R</i>	4157	<i>Mc1r</i>	17199	-	-
<i>TYR</i>	<i>TYR</i>	7299	<i>Tyr</i>	22173	<i>Tyr</i>	102005248
<i>TYRP1</i>	<i>TYRP1</i>	7306	<i>Tyrp1</i>	22178	<i>Tyrp1</i>	102012890
<i>TYRP2/DCT</i>	<i>TYRP2/DCT</i>	1638	<i>Tyrp2/Dct</i>	13190	<i>Dct</i>	102020410
<i>ASIP</i>	<i>ASIP</i>	434	<i>Asip/a/ nonagouti</i>	50518	<i>Asip</i>	102024692
<i>AGRP</i>	<i>AGRP</i>	181	<i>Agrp</i>	11604	<i>Agrp</i>	102030198
<i>PMEL</i>	<i>PMEL</i>	6490	<i>Pmel</i>	20431	<i>Pmel</i>	102025878
<i>OCA2</i>	<i>OCA2</i>	4948	<i>Oca2</i>	18431	<i>Oca2</i>	102023950
<i>SLC45A2</i>	<i>SLC45A2</i>	51151	<i>Slc45a2</i>	22293	<i>Slc45a2</i>	102027881

Převzato z: NCBI (2016)

3.4 Variabilita zbarvení činčil dle současných chovatelů

U činčil je základ zbarvení stejný jako u všech savců, jak je popsáno výše. Geny pro zbarvení sice byly zkoumány a sekvenovány, ne však všechny a stále se jedná pouze o podobnost s genomem myši. Konkrétní geny určující přímo barevné mutace zkoumány nebyly. Zájmoví chovatelé si tedy i kvůli zjednodušení (bez genetických analýz) vytvořili vlastní systém pojmenování genů a alel, který je však založený na stále stejném základě. Geny neurčují podle genotypu zvířete, jak lze zjistit například u koní či u myši, tedy přímo při laboratorním rozboru genomu a konkrétních sekvencí, ale podle toho, jaký fenotyp vykazují potomci. Pak tedy zpětně určí pravděpodobný genotyp rodičů, či jakých alel mohou být nositeli („carrier“). Také však může dojít k projevu genu (zvláště těch recesivních) až po několika generacích a potom záleží na chovateli, zda je dobře informován o zvířeti a jeho rodokmenu nebo zda dobře vede evidenci chovu, aby určil mutaci a genotyp správně.

Genetika barevných mutací používá termíny známé z obecné genetiky. Termín heterozygot znamená, že činčila má ve své genetické výbavě dominantní a recesivní alelu (Aa), kdy dominantní je plně vyjádřena a recesivní může být dále vyjádřena u potomků. Homozygot má buď dvě dominantní (AA) nebo dvě recesivní (aa) alely. Geny se tedy mohou chovat dominantně, kdy překryjí expresi recesivních genů, recesivně, kdy se mohou projevit až u části potomků, nebo mohou být neúplně dominantní a tyto pak ovlivňují bílé zbarvení (viz kapitola *White*). Dále existují ko-dominantní a ko-recesivní geny, kdy mohou dva a více dominantních nebo dva a více recesivních genů existovat společně u jednoho zvířete. Například *White+Beige=Pink White*, u recesivních například *Standard Grey+Sapphire=Standard Grey SC* a zde záleží na tom, který z recesivních genů bude více „dominantní“ (více v kapitole 3.3.1.8. Hybridní mutace).

3.4.1 Základní barevné mutace činčil

Základní barevné mutace činčil mohou být dominantní nebo recesivní, dle jejich schopnosti projevu. U těchto zbarvení není většinou problém určit fenotyp dané mutace, jelikož jsou natolik specifické, že si je nelze splést a lze je od sebe lehce odlišit. Původní divoká činčila měla jako většina divokých hlodavců zbarvení zvané aguti, tedy šedivé s žiháním, které je u činčil nazýváno *Standard Grey*. Je základem pro všechny další mutace, které jsou k němu buď dominantní nebo recesivní, přičemž *Standard Grey*

je recesivní vůči genům *Beige*, *Black Velvet*, *White* a *Ebony* dominantní vůči recesivním genům *Charcoal*, *Recessive Beige*, *Sapphire* a *Violet*. Mezi dominantní barevné mutace tedy patří *Beige*, *Black Velvet*, *Wilson White* a řadí se k nim i *Standard Grey*. Mezi recesivní barevné mutace patří *Charcoal*, *Sapphire*, *Violet* a další, které jsou však u nás vzácné, například *Lowel White* (*Lovelova Bílá*, *Goldbar*), *Kalifornská bílá* a *Recesivní Bílá* (CHINCHILLA CHRONICLES, 2016; HOMOLKOVÁ, 2014; VONDRÁČKOVÁ, 2016).

3.4.1.1 Mutace *Beige*

Mutace *Beige* nebo také *Tower Beige* má základ v genu zvaném *Beige*. *Tower Beige* je označení pro tmavší variantu *Beige* z několika typů (světlý, střední, tmavý a extra tmavý). Má dvě varianty (dle genetiky), a sice *Hetero Beige*, což je heterozygot a geneticky je vyjádřen jako *Beige+Standard*, a *Homo Beige*, který je homozygotní a geneticky je vyjádřen jako *Beige+Beige*. Jedná se o neúplnou dominanci, jak vykazují na svém zbarvení recesivně homozygotní jedinci (MILLER, 2010; VONDRÁČKOVÁ, 2016).

3.4.1.2 Mutace *Black Velvet*

Dominantní gen, někdy nazýván jen „*black*“ nebo *TOV* („*Touch of velvet*“ neboli „*dotek velveta*“), což se ale spíše používá při kombinacích s jinými mutacemi (popsáno níže). Označení *TOV* se používá hlavně u mutací, které jsou geneticky „*Velvet*“, ale nemají všechny znaky typické pro tento gen. Například mutace *TOV Ebony* nemá typický přechod mezi černou a bílou barvou na bocích a bílé kroužky kolem uší. Stejně jako *Ebony* je to spíše gen pro barevný vzor na těle zvířete než přímo pro barvu. V podstatě ztmavuje a sjednocuje jakékoliv zbarvení, se kterým je kombinován, přičemž si stále zachovává svůj typický fenotypový vzhled, resp. vzor. Jedná se o velmi specifické zbarvení, kdy černá barva vytváří na hlavě zvířete masku ve tvaru „*T*“ a dále pokračuje přes hřbet až k ocasu a splývá po bocích k břichu. Na bocích v určitém místě přechází do šedé barvy, která tvoří přechod mezi černou barvou na hřbetě a bílou barvou na břichu. Ocas má ze spodní strany černý pruh, delší štětinovité chlupy jsou šedé. Typické jsou malé černé skvrny či proužky na hrudních končetinách (na každé jedna) a bílé kroužky kolem uší. Standard pro exteriér zvířete je co se týče barvy velice přesně definován a jakákoliv odchylka znamená buď vyřazení z bonitace či snížení bodového hodnocení. Stejně jako *White* nemůže existovat v homozygotní formě kvůli letálnímu faktoru (HOMOLKOVÁ, 2014; MILLER, 2010; VONDRÁČKOVÁ, 2016).

3.4.1.3 *Mutace Wilson White*

White je gen s neúplnou dominancí, což znamená, že někdy může vytvářet množství různých vzorů bílé a šedé srsti na jinak normálním podkladu. Gen pro bílou barvu se chová jako inhibitor pigmentu, tedy že se bílé zbarvení neprojeví samo, ale vlivem genu dojde k inhibici projevu jiné barevné mutace a vznikne tak bílá srst. Základní bílá mutace se nazývá *Wilson White* a pro individuální vzory srsti existují pojmenování jako *White Mosaic*, *Silver*, *Silver Mosaic*, *Reverse Mosaic* a další. Všechny varianty mají genetický základ *White+Standard*, na fenotypu je pak projev variant patrný na základě stupně vlivu genu *Standard* i *White*. Gen nemůže existovat v homozygotní formě kvůli letálnímu faktoru (CHINCHILLA CHRONICLES, 2016; MILLER, 2010).

3.4.1.4 *Základní mutace Standard Grey*

Zbarvení nazývané také jen *Standard* je originální pro divoké činčily, je to v podstatě agouti fenotyp stejný pro jiné savce. Tato mutace je recesivní vůči mutacím *Beige*, *Black Velvet* a *Wilson White* a v některých případech dominantní vůči genu *Ebony*. Dominantně se chová vůči mutaci *Charcoal*, *Recessive Beige*, *Violet* a *Sapphire*. *Standard* je geneticky *Standard+Standard* a gen je prezentován i v základních mutacích: základní *Wilson White* = *White+Standard*, základní *Beige* = *Beige+Standard*, základní *Black Velvet* = *Black Velvet+Standard* a u mutace *Hetero Ebony* je genetickým základem *Ebony+Standard*. V heterozygotní formě u recesivních mutací (*Charcoal*, *Recessive Beige*, *Sapphire*, *Violet*) je pak genetickým základem *Standard/Charcoal Carrier*, *Standard/Recessive Beige*, *Standard/Sapphire Carrier*, *Standard/Violet Carrier* (pojem „carrier“ vysvětlen níže) (MILLER, 2010).

3.4.1.5 *Recesivní mutace Sapphire, Violet a Charcoal*

Tyto tři recesivní mutace jsou geneticky jednoduše *Sapphire+Sapphire*, *Violet+Violet* a *Charcoal+Charcoal*. V heterozygotním stavu je zvíře pouze jeho nositelem („carrier“). *Violet* a *Sapphire* vypadají jako světlejší mutace *Standard*, přičemž *Sapphire* je poněkud světlejší s modrým nádechem a růžovými ušima, které jsou na konečcích modré, a *Charcoal* vypadá jako činčila se zbarvením *Medium Hetero Ebony*. U těchto zvířat bývá obtížné rozpoznat pravý základ zbarvení (HOMOLKOVÁ, 2014; MILLER, 2010).

3.4.1.6 „Carrier“ neboli nositel genu

Pokud je zvíře jen nositelem genu, znamená to, že je heterozygot a recesivní gen se u něj neprojeví, ale může ho předat potomkům. Takový jedinec je zbarven jako běžná barevná mutace a v případě, že bude křížen s jiným jedincem-nositelem, čtvrtina jejich potomků bude geneticky recesivní homozygot a budou mít zbarvení recesivní mutace. Nositel tedy může mít v označení své mutace AVC, DVC, EC nebo SC („afro violet carrier“, „Deutsch violet carrier“ – německý typ *Violet*, „ebony carrier“ či „sapphire carrier“). Například činčila *Beige EC* bude mít geneticky dominantní alelu *Beige* a recesivní *Ebony*. Pokud bude činčila nositelem *sapphire* genu a její základní zbarvení bude *Standard Grey*, mutace bude nazvána *Standard Grey SC* (CHINCHILLA CHRONICLES, 2016; HOMOLKOVÁ, 2014; VONDRÁČKOVÁ, 2016).

3.4.1.7 Gen *Ebony*

Na hranici mezi dominantními a recesivními geny je slabě dominantní gen zvaný *Ebony*. Není genem pro jednu barvu, ale mění odstín základní barvy a výsledkem je kombinace základní barvy a stupně *Ebony* genu. Má akumulativní povahu, tzn. že síla barvy a intenzita ztmavení roste s počtem generací, tedy se stupněm prošlechtění, což se projevuje skutečností, že úspěšné generace křížení těchto zvířat produkují stále tmavší a tmavší jedince. Jednoduše čím více generací, tím tmavší zvířata. Fenotyp je také ovlivněn tím, v jaké ze čtyř forem gen existuje. V podstatě tvoří stupnici od nejsvětlejší po nejtmaší variantu základní barvy a poznáme je podle toho, že zvíře je zbarvené celé, nemá tudíž bílé břicho, jako je tomu u všech základních mutací. Dalším charakteristickým znakem genu *Ebony* je šedá kůže bez srsti na čenichu zvířete, který je obvykle růžový, stejně jako uši. Obojí pak může mít různé odstíny šedé. Nejsvětlejší variantou je *Light Ebony Hetero (Eeee)*, kdy má základní zbarvení jen nepatrně tmavší odstín. Tmavší je *Medium Ebony Hetero (EEee)*, pro kterou je typická černá maska ve tvaru „T“ na hlavě zvířete. Dále ve stupnici pokračuje *Dark Ebony Hetero (EEEe)*, kdy jinak celému černému zvířeti jen lehce prosvítají světlejší boky, mnohdy rozeznatelné jen na speciálním světle. Nejtmaší variantou je *Extra Dark Ebony Homo (EEEE)*, kde prosvětlení boků chybí a zvíře je tak jednolitě černé. Takovéto zvíře nemá nikdy v potomstvu mutaci *Standard*. Potomci jsou vždy jen *Ebony* v různé škále tmavosti. Pokud má gen *Ebony* mutace *White*, na fenotypu se projeví tmavými skvrnami, které mutace *White* normálně nemá. V podstatě kdekoliv na těle zvířete mohou být tmavé

(šedé) nepravidelné skvrny. Výsledkem křížení jedinců *Ebony* s jedinci *Beige* vzniká hnědé zvíře, opět s různým stupněm ztmavení. Nejtmavší variantou je v tomto případě *EDE Beige* (*Extra Dark Ebony Beige* neboli *Chocolate*, u nás chovateli pracovně nazývaný *Čoko*). Klasičtí *Ebony* jedinci musí být vždy černí, proto je třeba si dávat pozor na nahnědlou barvu srsti nebo na hnědé skvrny nejčastěji na hlavě, které mohou být mylně považované za skvrny v důsledku *Ebony* genu. To je považováno za vadu zbarvení a zvíře by nemělo být zařazeno do chovu (CHINCHILLA CHRONICLES, 2016; HOMOLKOVÁ, 2014; MILLER, 2010; VONDRÁČKOVÁ, 2016).

3.4.1.8 Hybridní mutace

Křížením základních mutací vznikají jejich hybridy, tzn. různé kombinace základních barev, u kterých už více záleží na znalostech chovatele i o rodičích jedinců a mnohdy je jediné takto schopeno určit genotyp jejich potomka. Také musí dbát na určitá pravidla, která platí pro křížení základních barevných mutací. Jedná se hlavně o letální faktor. Pro křížence některých základních mutací existuje zvláštní označení či pojmenování, například kříženci mutace *Black Velvet* mají v názvu TOV neboli „touch of velvet“ (například *TOV White*), kříženci s kombinací genů *Beige* a *Ebony* jsou označováni jako *Tan* (například *Tan White=Beige+Ebony+White*). *Ebony* je v názvu mutace zvířete vždy uvedeno. Dalším křížením hybridů vznikají velice zajímavé barevné mutace se složitějšími názvy, zdědí totiž po rodičích více genů a buď proběhne exprese v jejich fenotypu nebo jsou nositeli genu (například *TOV Tan Violet = Beige+Ebony+Black Velvet+Violet*). Pro křížence určitých mutací existují speciální názvy, například *Pink White/Beige Mosaic/Golden Mosaic (White+Beige)*, *Pearl (Beige + Violet)*, *Brown Velvet (Black Velvet+Beige)*, *Blue Diamond/Ice Blue (Sapphire AVC+ Violet SC)*, *Ultra Violet (Black velvet+Violet)*, *Chocolate (Beige Ebony Extra Dark)* a další. (BENEŠOVSKÁ, 2008; HOMOLKOVÁ, 2014; VONDRÁČKOVÁ, 2016).

V chovu a křížení různých mutací činchil platí pravidlo, že čím složitěji se mutace mezi sebou kříží, tím je horší kvalita chovných zvířat. Snižuje se kvalita barvy, hustota vlasu, zvířata mají horší tvar těla a hlavy atd. Chovní jedinci by se proto měli pečlivě vybírat, chovatel by měl zvolit správný management šlechtění a neměl by chtít za každou cenu kombinovat mutace co nejsložitěji a chtít co nejrychleji požadovaný výsledek v podobě kříženého potomstva. Doporučuje se zvolit například postup rozumného pročištění barvy základní šedou mutací *Standard Grey* či mutací *Black*

Velvet. Výsledkem je potom vyrovnanější chov, kvalitnější chovná zvířata jak tvarem těla tak i srstí a celkově kvalitnější a propracovanější chov (VONDRÁČKOVÁ, 2016).

Mnozí majitelé činchil a bohužel ani někteří chovatelé však nezacházejí ani takto daleko, aby si zjistili, jaké mohou očekávat výsledky křížení svých zvířat a vztahují myšlení činchily k lidskému, co se týče potomků. Není to však správné, protože křížením různých mutací přichází v lepším případě zklamání z neočekávaného zbarvení potomků, v horším případě k letalitě, tzn. ztráty potomků nebo i matky. Při rozhodnutí rozmnožovat činchily se také jedná o péči o mláďata a jejich matku, což vyžaduje určité znalosti a zkušenosti. Proto by měli začínající chovatelé prostudovat co nejvíce materiálů a nejlépe se zeptat zkušených chovatelů na veškeré informace, než aby dělali zbytečné chyby, které stojí úsilí nejen lidí, ale i zvířat. Pokud není vůle se chovu opravdu věnovat naplno, je lepší podniknout opatření, aby k produkci potomků nedocházelo, tedy nechat samce, kteří mají přístup k samici/samicím, nechat vykastrovat nebo je chovat odděleně.

4 MATERIÁL A METODIKA

Experimentální část této práce srovnává jednotlivé sekvence genů tyrosinázy (*TYR*) a dopachrom tautomerázy (*DCT/TYRP2*) u tří druhů savců, a sice člověka (*Homo sapiens*), myši (*Mus musculus*) a činčily vlnaté (*Chinchilla lanigera*). Pomocí databází NCBI a Ensembl byly nalezeny odpovídající sekvence vhodné pro srovnávání, tedy kódující DNA (cDNA) v podobě mRNA ve formátu FASTA a u činčily vlnaté úseky celogenomového skenu, kde se pravděpodobně nachází *TYR* (ChiLan1.0 scaffold00013) a *Dct* (ChiLan1.0 scaffold00003) a dále predikovaná mRNA těchto genů. Sekvence genu *TYR* a *DCT* u člověka a myši spolu byly postupně srovnávány pomocí programu BLAST („The Basic Local Alignment Search Tool“), konkrétně megablast (nalézá vysoce podobné sekvence). Je to online nástroj, který se nachází na serveru NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), pro hledání podobných oblastí biologických sekvencí. Srovnává nukleotidové nebo proteinové sekvence s databází sekvencí a vypočítává statistické ukazatele shodných úseků. Může být použit pro funkční a evoluční vztahy mezi sekvencemi nebo může pomoci identifikovat zástupce genových rodin. Program byl vyvinut týmem ZHANG *et al.* (2000). Byl proveden multiple sequence alignment pomocí programu Clustal Omega na serveru EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), kde bylo zjišťováno, na kolik jsou si geny podobné. Program vyvinul tým LI *et al.* (2009). Porovnané úseky byly podrobně prostudovány, byla pečlivě prozkoumána podobnost sekvencí činčily se sekvencemi myši a člověka, dále byly vyznačeny mutace a polymorfismy, které mají vliv na pigmentaci kůže a vlasů u člověka a na zbarvení srsti u myši. Výborným nástrojem a zdrojem informací byla databáze NCBI (National Center for Biological Information) provázaná s databází Ensembl, která taktéž poskytovala mnoho informací s výborným grafickým zpracováním a jednoduchou orientací v systému informací.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Studium sekvencí genu tyrosinázy (*TYR*)

Tyrosináza je jedním z nedůležitějších genů, který má vliv na vznik pigmentů u savců. *TYR* u člověka dle NCBI leží na 11. chromozomu, u myši na 7. chromozomu a u obou obsahuje pět exonů. U činčily není chromozom znám, bylo pouze zjištěno, že *Tyr* obsahuje 5 exonů. Gen u člověka i u myši obsahuje četné mutace, které mají vliv na fenotyp. Jsou vyznačeny níže. Gen činčily dosud nebyl exaktně popsán, existují pouze úseky možného výskytu genů, jako například predikovaná mRNA používaná v této práci. Bylo provedeno 6 porovnání mezi sekvencemi genu člověka, myši a činčily postupně mezi sebou a všechna jsou uvedena a okomentována níže. Query vždy označuje sekvenci, ke které je přiřazovaná druhá sekvence a je v horním řádku každého alignmentu, Subject označuje sekvenci vyskytující se ve spodním řádku každého alignmentu. U obou je vždy uvedeno číslo dle NCBI pro snadné dohledání a přehlednost.

1. BLAST – činčila - činčila

- Query: *Chinchilla lanigera*: tyrosinase predicted mRNA (**XM_005379730.2**)
- Subject: *Chinchilla lanigera* isolate Chin_1 unplaced genomic scaffold, ChiLan1.0 scaffold00013, whole genome shotgun sequence (**NW_004955414.1**)

Výsledkem srovnání predikované mRNA *Tyr* u činčily vlnaté č. XM_005379730.2 a sekvence celého genomu činčily vlnaté č. NW_004955414.1 v programu BLAST je pět oblastí, které jsou řazeny sestupně dle velikosti. V genu nejsou v tomto pořadí, čemuž odpovídají čísla bází u výsledků. Jednotlivé úseky jdou tedy po sobě v pořadí: Range 1, 3, 5, 4 a 2 a v tomto pořadí většinou odpovídají exonům myšního *Tyr*, tzn. že Range 1 = exon 1 u myši, Range 2 = exon 5 u myši, Range 3 = exon 2 u myši, Range 4 = exon 4 u myši a Range 5 = exon 3 u myši. Pět úseků (Range 1-5) prozrazuje skutečnost, že činčilí *Tyr* obsahuje pět exonů, což bylo ověřeno v databázi Ensembl (www.ensembl.org). Všechny úseky jsou 100% identické až na Range 5 (98 %). To může být způsobeno skutečností, že podobnost s myším 3. exonem končí na pozici 1184 (Query) a na základě této podobnosti posledních 9 bází k exonu zřejmě nepatří a úsek je jen náhodně podobný. Vlastní alignment zobrazen níže.

Range 1: 4313183 to 4314001 (Exon 1)

		Alignment statistics for match #1				
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1513 bits(819)	0.0	819/819(100%)	0/819(0%)	Plus/Minus	
Query	1		ATGATCCTGGCTGTTTTGTTCTTCTCCTGTGCAGTTTCCAGACCTCCGCCGGCCATTC			60
Sbjct	4314001		ATGATCCTGGCTGTTTTGTTCTTCTCCTGTGCAGTTTCCAGACCTCCGCCGGCCATTC			4313942
Query	61		CCCCGAGCTTGACAGTCTCTTCGGAACCTGATAGAGAAGGAATGCTGCCCGCGTGAAG			120
Sbjct	4313941		CCCCGAGCTTGACAGTCTCTTCGGAACCTGATAGAGAAGGAATGCTGCCCGCGTGAAG			4313882
Query	121		GGGGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCCGTGTCAGGACATCCTTCTG			180
Sbjct	4313881		GGGGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCCGTGTCAGGACATCCTTCTG			4313822
Query	181		TCCAGTGCACCATTTGGGCCACAATTCCTTTTACAGGGGTGGACGACAGGGAATCCTGG			240
Sbjct	4313821		TCCAGTGCACCATTTGGGCCACAATTCCTTTTACAGGGGTGGACGACAGGGAATCCTGG			4313762
Query	241		CCCTCCGTCTTTTATAACAGAACCTGCCAGTGTCTGGCAACTTCATGGGATTGAGCTGT			300
Sbjct	4313761		CCCTCCGTCTTTTATAACAGAACCTGCCAGTGTCTGGCAACTTCATGGGATTGAGCTGT			4313702
Query	301		GGACGTTGCAAGTTTGGATACTGGGACCAAAGTGCACACAGAAAAGAGTCTTGGTGAGA			360
Sbjct	4313701		GGACGTTGCAAGTTTGGATACTGGGACCAAAGTGCACACAGAAAAGAGTCTTGGTGAGA			4313642
Query	361		AGAAACATCTTCGATTTGAGTGTCCAGAGAAGGACAAGTTCCTCGCCTACCTCACTTTA			420
Sbjct	4313641		AGAAACATCTTCGATTTGAGTGTCCAGAGAAGGACAAGTTCCTCGCCTACCTCACTTTA			4313582
Query	421		GCAAAGCATAACCATCAGTGCAGACTATGTCATCCCGACAGGCACGTATGGCCAAATGAAG			480
Sbjct	4313581		GCAAAGCATAACCATCAGTGCAGACTATGTCATCCCGACAGGCACGTATGGCCAAATGAAG			4313522
Query	481		AACGGATCAACCCCATGTTTAAACGATGTTAACGTTTATGACCTCTTTGTCTGGATGCAT			540
Sbjct	4313521		AACGGATCAACCCCATGTTTAAACGATGTTAACGTTTATGACCTCTTTGTCTGGATGCAT			4313462
Query	541		TACTATGTGTCAAGAGACACACTGCTTGGGGGGTCTGAAATATGGAGAGACATTGATTTT			600
Sbjct	4313461		TACTATGTGTCAAGAGACACACTGCTTGGGGGGTCTGAAATATGGAGAGACATTGATTTT			4313402
Query	601		GCCCATGAAGCACCAGGTTTCTGCCTTGGCATAGACTTTTCTTGCTTCTGTGGGAAGAA			660
Sbjct	4313401		GCCCATGAAGCACCAGGTTTCTGCCTTGGCATAGACTTTTCTTGCTTCTGTGGGAAGAA			4313342
Query	661		GATATCCGGGAGCTTACAGGGGATGAGAAGTTCCTACTATTCATACTGGGACTGGCGAGAT			720
Sbjct	4313341		GATATCCGGGAGCTTACAGGGGATGAGAAGTTCCTACTATTCATACTGGGACTGGCGAGAT			4313282
Query	721		GCGGAAAGCTGTGACATTTGCACAGACGAGTACATGGGAGGTCGGCACCTACAAGCCCT			780
Sbjct	4313281		GCGGAAAGCTGTGACATTTGCACAGACGAGTACATGGGAGGTCGGCACCTACAAGCCCT			4313222
Query	781		AACCTGCTCAGCCAGCATCGTTCTTCTCCTCTGGCAG	819		
Sbjct	4313221		AACCTGCTCAGCCAGCATCGTTCTTCTCCTCTGGCAG	4313183		

Range 2: 4244035 to 4244545 (Exon 5)

Alignment statistics for match #2					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	944 bits(511)	0.0	511/511(100%)	0/511(0%)	Plus/Minus
Query	1362	TTCAGATCTAAGCTTCTTTCAA	ACTACATTGAGCCTTACTTGA	ACAAGCACGTCGGAT	1421
Sbjct	4244545	TTCAGATCTAAGCTTCTTTCAA	ACTACATTGAGCCTTACTTGA	ACAAGCACGTCGGAT	4244486
Query	1422	CTGGCCGTGGCTGGTTCGGAG	CAGCCTTGGTAGGAGCCGCC	CTCGCTCAGTGGTGGG	1481
Sbjct	4244485	CTGGCCGTGGCTGGTTCGGAG	CAGCCTTGGTAGGAGCCGCC	CTCGCTCAGTGGTGGG	4244426
Query	1482	GTTTACCAACCTACTGTGCC	CGTCACAAGAGGAAGCAG	CTCCCCGAGGAAAGGC	1541
Sbjct	4244425	GTTTACCAACCTACTGTGCC	CGTCACAAGAGGAAGCAG	CTCCCCGAGGAAAGGC	4244366
Query	1542	GCTCATGGAAAAGGAGGACT	TACAACAGCTTATTGTAC	CAAAGCCATTTGTAAA	1601
Sbjct	4244365	GCTCATGGAAAAGGAGGACT	TACAACAGCTTATTGTAC	CAAAGCCATTTGTAAA	4244306
Query	1602	AGCAGTAGAGTGGGACCAGA	AACACATGTCTCACTGT	AACTCAGAGTGTGCGG	1661
Sbjct	4244305	AGCAGTAGAGTGGGACCAGA	AACACATGTCTCACTGT	AACTCAGAGTGTGCGG	4244246
Query	1662	CCGGGAGCTACCCCCAGCA	GAGACCCCTGTGTGTCA	GAGAAGACCCTTTAGA	1721
Sbjct	4244245	CCGGGAGCTACCCCCAGCA	GAGACCCCTGTGTGTCA	GAGAAGACCCTTTAGA	4244186
Query	1722	AATGTAGTAGAAAATGTACC	CCCTAACGCACACCAGCT	TAGAACACTGCTGTTT	1781
Sbjct	4244185	AATGTAGTAGAAAATGTACC	CCCTAACGCACACCAGCT	TAGAACACTGCTGTTT	4244126
Query	1782	TGCTTTTGCTCAGTCCTTG	TAGTTCTCCCCAGCTCC	TATTTTCAAGGACCGCA	1841
Sbjct	4244125	TGCTTTTGCTCAGTCCTTG	TAGTTCTCCCCAGCTCC	TATTTTCAAGGACCGCA	4244066
Query	1842	TTGGTACTATGTCAGTGCAC	ATGTATCAAAA	1872	
Sbjct	4244065	TTGGTACTATGTCAGTGCAC	ATGTATCAAAA	4244035	

Range 3: 4302510 to 4302731 (Exon 2)

Alignment statistics for match #3					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	411 bits(222)	1e-113	222/222(100%)	0/222(0%)	Plus/Minus
Query	816	GCAGATTGTATGCAGCCGACT	GGAGGAATATAACAGCCG	TCAAGCTTTATGTGAT	875
Sbjct	4302731	GCAGATTGTATGCAGCCGACT	GGAGGAATATAACAGCCG	TCAAGCTTTATGTGAT	4302672
Query	876	CCCTGAGGGACCTTACTTC	CGTAATCCTGGAAGCCAT	GACAAAGCCAGGACCT	935
Sbjct	4302671	CCCTGAGGGACCTTACTTC	CGTAATCCTGGAAGCCAT	GACAAAGCCAGGACCT	4302612
Query	936	CCCCTCCTCAGCTGATGTG	GGAATTTTGCTGAGTTT	GACGCAGTATGAATCT	995
Sbjct	4302611	CCCCTCCTCAGCTGATGTG	GGAATTTTGCTGAGTTT	GACGCAGTATGAATCT	4302552
Query	996	GGATAAACTGCCAATTTCA	GCTTTAGAAATACATTG	GGAAGG	1037
Sbjct	4302551	GGATAAACTGCCAATTTCA	GCTTTAGAAATACATTG	GGAAGG	4302510

Range 4: 4254412 to 4254596 (Exon 4)

Alignment statistics for match #4					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	342 bits(185)	4e-93	185/185(100%)	0/185(0%)	Plus/Minus
Query	1182	CAGTATTTTGAACAGTGGCTCCGAAGGCACCGCCCACTTCAGGAAGTTTATCCGGAAGC			1241
Sbjct	4254596	CAGTATTTTGAACAGTGGCTCCGAAGGCACCGCCCACTTCAGGAAGTTTATCCGGAAGC			4254537
Query	1242	AAATGCACCCATCGGGCATAACCGGGAGTCCTACATGGTTCCTTTTATACCTCTCTACAA			1301
Sbjct	4254536	AAATGCACCCATCGGGCATAACCGGGAGTCCTACATGGTTCCTTTTATACCTCTCTACAA			4254477
Query	1302	AAATGGTGATTTCTTTGTGTCATCGAGAGATCTAGGCTATGAATACAGCTACCTACAAGA			1361
Sbjct	4254476	AAATGGTGATTTCTTTGTGTCATCGAGAGATCTAGGCTATGAATACAGCTACCTACAAGA			4254417
Query	1362	TTCAG			1366
Sbjct	4254416	TTCAG			4254412

Range 5: 4286096 to 4286254 (Exon 3)

Alignment statistics for match #5					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	278 bits(150)	1e-73	156/159(98%)	0/159(0%)	Plus/Minus
Query	1035	AGGATTTGCTAGCCCCATTACCGGAATCGCAGATGCCTCACAAAGCAGCATGCACAATGC			1094
Sbjct	4286254	AGGATTTGCTAGCCCCATTACCGGAATCGCAGATGCCTCACAAAGCAGCATGCACAATGC			4286195
Query	1095	TTTGCACATCTATATGAACGGAACCATGTCCCAAGTACAAGGATCGGCCAACGATCCCAT			1154
Sbjct	4286194	TTTGCACATCTATATGAACGGAACCATGTCCCAAGTACAAGGATCGGCCAACGATCCCAT			4286135
Query	1155	TTTTCTTCTTCATCATGCCTTTGTTGACAGTATTTTGA		1193	
Sbjct	4286134	TTTTCTTCTTCATCATGCCTTTGTTGACAGTATTTTGA		4286096	

2. BLAST – myš - činčila

- Query: *Mus musculus* mRNA for tyrosinase, complete cds (**D00440.1**)
- Subject: *Chinchilla lanigera* isolate Chin_1 unplaced genomic scaffold, ChiLan1.0 scaffold00013, whole genome shotgun sequence (**NW_004955414.1**)

Druhé srovnání porovnává mRNA Tyr (kompletní kódující sekvenci) č. D00440.1 a celogenomový sken činčily vlnaté č. NW_004955414.1. Výsledkem jsou dvě oblasti, přičemž první oblast (Range 1) je z 84 % shodná s prvním exonem u myši, kdy program vložil celkem 5 mezer: 2 mezery u myši, tzn., že v genu činčily jsou na těch místech 2 báze vložené navíc, a 3 mezery u činčily, tzn., že v genu myši jsou na těch místech 3 báze vložené. Druhá oblast (Range 2) je z 84 % shodná s třetím exonem u myši. Posledních 9 bází tohoto úseku je opět náhodně podobných a k exonu už zřejmě nepatří. Přesný myší exon je tedy vyznačen tak, že šedě jsou označeny báze, které už do něj nepatří.

Range 2: 4286096 to 4286254

Alignment statistics for match #2					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	156 bits(84)	6e-37	134/159(84%)	0/159(0%)	Plus/Minus
Query	1096		AGGATTTGCCAGTCCACTCACAGGGATAGCAGATCCTTCTCAAAGTAGCATGCACAATGC		1155
Sbjct	4286254		AGGATTTGCTAGCCCCATTACCGGAATCGCAGATGCCTCACAAAGCAGCATGCACAATGC		4286195
Query	1156		CTTACATATCTTTATGAATGGAACAATGTCCCAAGTACAGGGATCGGCCAACGATCCCAT		1215
Sbjct	4286194		TTTGACATCTATATGAACGGAACCATGTCCCAAGTACAAGGATCGGCCAACGATCCCAT		4286135
Query	1216		TTTTCTTCTTACCATGCTTTTGTGGACAGTATTTTTGA	1254	
Sbjct	4286134		TTTTCTTCTTATCATGCCTTTGTTGACAGGTTTGTTTGA	428609	

3. BLAST – myš - činčila

- Query: *Mus musculus* mRNA for tyrosinase, complete cds (**D00440.1**)
- Subject: *Chinchilla lanigera*: tyrosinase predicted mRNA (**XM_005379730.2**)

Třetím srovnáním je porovnání mRNA *Tyr* u myši (kompletní kódující sekvence) č. D00440.1 a predikované mRNA *Tyr* u činčily vlnaté č. XM_005379730.2, jejíž lokalizace a sekvence je odhadnuta na základě podobnosti s jiným genomem. Výsledkem je jedna oblast, u které se po prostudování zjistilo, že sumarizuje všech pět exonů (myši i činčily) jdoucích po sobě bez nekódujících oblastí. Tento kódující úsek je při srovnání myši a činčily shodný z 83 %, program doplnil 21 mezer (1% z celkového počtu bází), u myši 6, u činčily 15. Vlákna jsou stejná, tedy Plus/Plus. Zeleně jsou vyznačeny vždy první báze zahajující další exon. Na konci úseku (Query 1661) chybí ještě 2 báze – GA – aby byl pátý exon u myši kompletní. U činčily se tyto dvě báze s myší zřejmě neshodovaly, proto je tam program už nezařadil. Úsek 1566-1585 (Query) označil BLAST šedými malými písmeny a to proto, že tato část je v automatickém filtrování vyhodnocena jako málo komplexní sekvence, tedy sekvence s nízkou shodou („low-complexity sequence“) a znamená to, že jde pravděpodobně artefakty. Právě v tomto úseku s nízkou komplexností se u myši na pozici 1681 nachází mutace způsobující delecí, tzv. inframe delecce č. 7:87429127-87429132, kdy dochází k delecí aminokyselin KK a kodonů AAGAAG. Je vyznačena tyrkysově. Na fenotyp nemá vliv.

Range 1: 1 to 1591

Alignment statistics for match #1						
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1406 bits(761)	0.0	1328/1606(83%)	21/1606(1%)	Plus/Plus	
Query	62		ATGTTCTTGGCTGTTTTGTATTGCCTTCTGTGGAGTTTCCAGATCTCTGATGGCCATTTT			121
Sbjct	1		ATGATCCTGGCTGTTTTGTCTTTCTCTGTGCAGTTTCCAGACCTCCGCCGGCCATTTT			60
Query	122		CCTCGAGCCTGTGCCTCCTCCTCCTAAGAACTTGTGGCAAAGAATGCTGCCACCATGGA			179
Sbjct	61		CCCCGAGCTTGCACGTCTCTTCGGAACCTGATAGAGAAGGAATGCTGCCCGCGTGGGA			118
Query	180		TGGGTGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCCCTGCCAGGATATCCCTT			239
Sbjct	119		AGGGGGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCCCTGTGACAGATCCCTT			178
Query	240		TGTCCAGTGCACCATCTGGACCTCAGTTCCCTTCAAAGGGGTGGATGACCGTGTAGTCTT			299
Sbjct	179		TGTCCAGTGCACCATTTGGGCCACAATTCCTTTTACAGGGGTGGACGACAGGGAATCCT			238
Query	300		GGCCCTCTGTGTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTAGGCAACTTCATGGGTTTCAACT			359
Sbjct	239		GGCCCTCCGTCTTTTATAACAGAACTGCCAGTGTCTGGCAACTTCATGGGATTCAGCT			298
Query	360		GCGAAACTGTAAGTTTGGATTTGGGGGCCAAAATTGTACAGAGAAGCGAGTCTTGATTA			419
Sbjct	299		GTGGACGTGCAAGTTTGGATACTGGGGACAAAAGTGCACACAGAAAAGAGTCTTGGTGA			358
Query	420		GAAGAAACATTTTTGATTGAGTGTCTCCGAAAAGAATAAGTTCTTTTCTTACCTCACTT			479
Sbjct	359		GAAGAAACATCTTCGATTGAGTGTCCCAGAGAAGGACAAGTTCTTCGCCTACCTCACTT			418
Query	480		TAGCAAACATACTATCAGCTCAGTCTATGTCATCCCACAGGCACCTATGGCCAAATGA			539
Sbjct	419		TAGCAAAGCATAACCATCAGTGCAGACTATGTCATCCCGACAGGCACGTATGGCCAAATGA			478
Query	540		ACAATGGGTCAACACCCATGTTTAAATGATATCAACATCTACGACCTCTTTGTATGGATGC			599
Sbjct	479		AGAACGGATCAACCCCATGTTTAAACGATGTTAACGTTTATGACCTCTTTGTCTGGATGC			538
Query	600		ATTACTATGTGTCAAGGGACACTGCTTGGGGGCTCTGAAATATGGAGGACATTGATT			659
Sbjct	539		ATTACTATGTGTCAAGAGACACTGCTTGGGGGCTCTGAAATATGGAGAGACATTGATT			598
Query	660		TTGCCCATGAAGCACCAGGTTTCTGCCTTGGCAGACTTTTCTGTATTATTGGGAAC			719
Sbjct	599		TTGCCCATGAAGCACCAGGTTTCTGCCTTGGCAGACTTTTCTGTCTGTGGGAAG			658
Query	720		AAGAAATTCGAGAATAACTGGGGATGAGAACTTCACTGTTCATACTGGGATTGGAGAG			779
Sbjct	659		AAGATATCCGGGAGCTTACAGGGGATGAGAACTTCACTATTCATACTGGGACTGGCGAG			718
Query	780		ATGCAGAAAACGTGACATTTGCACAGATGAGTACTTGGGAGGTGTCACCTGAAAATC			839
Sbjct	719		ATGCGGAAAGCTGTGACATTTGCACAGACGATACATGGGAGGTGGCACCTACAAGCC			778
Query	840		CTAACTTACTCAGCCAGCATCCTTCTTCTCCTCCTGGCAGTTCATTTGTAGCAGATCAG			899
Sbjct	779		CTAACCTGCTCAGCCAGCATCGTTCTTCTCCTCCTGGCAGTTGTATGCAGCCGACTGG			838
Query	900		AAGAGTATAATAGCCATCAGGTTTTATGCGATGGAACACCTGAGGGACCACTATTACGT			958
Sbjct	839		AGGAATATAACAGCCGTCAGGCTTTATGTGATGGGAACCTGAGGGACCTTACTTCGT			897
Query	959		AATCCTGGAACCATGACAAAGCCAAAACCCCCAGGCTCCCATCTTCAGCAGATGTGGAA			1018
Sbjct	898		AATCCTGGAAGCCATGACAAAGCCAGGACCTCGAGGCTCCCCTCCTCAGCTGATGTGGAA			957
Query	1019		TTTTGTCTGAGTTTGACCCAGTATGAATCTGGATCAATGGATAGAACTGCCAATTTACGC			1078
Sbjct	958		TTTTGCCTGAGTTTGACGCAGTATGAATCTGGCCCCATGGATAAACTGCCAATTTACGC			1017

```

Query 1079 TTTAGAAACACACTGGAAGCATTTGCCAGTCCACTCACAGGGATAGCAGATCCTTCTCAA 1138
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1018 TTTAGAAATACATTGGAAGCATTTGCTAGCCCCATTACCGGAATCGCAGATGCCTCACAA 1077

Query 1139 AGTAGCATGCACAATGCCTTACATATCTTTATGAATGGAACAATGTCCCAAGTACAGGGA 1198
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1078 AGCAGCATGCACAATGCTTTGCACATCTATATGAACGGAACCATGTCCCAAGTACAAGGA 1137

Query 1199 TCGGCCAACGATCCCATTTTTCTTCTTCACCATGCTTTTGTGGACAGTATTTTTGAACAA 1258
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1138 TCGGCCAACGATCCCATTTTTCTTCTTCATCATGCCTTTTGTGGACAGTATTTTTGAACAG 1197

Query 1259 TGGCTGCGAAGGCACCGCCCTCTTTTGGAAAGTTTACCCAGAAGCCAATGCACCTATCGGC 1318
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1198 TGGCTCCGAAGGCACCGCCCACTTCAGGAAGTTTATCCGGAAGCAAATGCACCCATCGGG 1257

Query 1319 CATAACAGAGACTCTTACATGGTTCCTTTTACATACCGCTCTATAGAAATGGTGATTTCTTC 1378
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1258 CATAACCGGGAGTCTTACATGGTTCCTTTTATACCTCTCTACAAAAATGGTGATTTCTTT 1317

Query 1379 ATAACATCCAAGGATCTGGGATATGACTACAGCTACCTCCAAGAGTCAGTCCAGGCTT 1437
          | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| |
Sbjct 1318 GTGCATCGAGAGATCTAGGCTATGAATACAGCTACCTACAAGATTCAGTCTAAGCTTC 1377

Query 1438 TTACAGAAATTATATTGAGCCTTACTTGGAAACAAGCCAGTCGTATCTGGCCATGGCTTCT 1497
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1378 TTTCATAAATACATTGAGCCTTACTTGGAAACAAGCACGTCGGATCTGGCCGTGGCTGGT 1436

Query 1498 TGGGGCAGCACTGGTGGGAGCTGTATTGCTGCAGCTCTCTCTGGGCTTAGCAGTAGG 1555
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1437 CGGAGCAGCCTTGGTAGGAGCCGCCCTCGCTGCCTCACTGGTGGGTTTACCAACCTA 1494

Query 1556 CTATGCCTTCagaagaagaagaagagagaagCAACCCAGGAGGAAAGGCAGCCACTCTC 1615
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1495 CTGTGCCGTCACAAGA-G--GAAGCAG---CT-CCCC--GAGGAAAGGCAGCCGTTGCTC 1545

Query 1616 ATGGACAAAGACGACTACCACAGCTTGCTGTATCAGAGCCATCTGT 1661
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1546 ATGGAAAAGGAGGACTACAACAGCTTATTGTACCAAAGCCATTTGT 1591

```

4. BLAST člověk – činčila

- Query: *Homo sapiens* tyrosinase (TYR), mRNA (NM_000372.4)
- Subject: *Chinchilla lanigera* isolate Chin_1 unplaced genomic scaffold, ChiLan1.0 scaffold00013, whole genome shotgun sequence (NW_004955414.1)

Čtvrtý výsledek porovnává mRNA *TYR* u člověka č. NM_000372.4 (Query) a celogenomový sken činčily vlnaté č. NW_004955414.1. Výsledkem alignmentu je jeden shodný úsek (Range 1). Po prostudování bylo zjištěno, že tato shodující se sekvence genomu člověka a činčily je v podstatě první exon genu *TYR* u člověka, shodující se z 88 % a program zde vložil celkem 4 mezery (2 u člověka, 2 u myši). Shoda je na stejných vláknech (Plus/Plus). Shoda začíná u člověka na pozici 83, předchozí oblast je tedy zřejmě částí nekódující.

Range 1: 1 to 819

Alignment statistics for match #1					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	948 bits(513)	0.0	719/821(88%)	4/821(0%)	Plus/Plus
Query	83	ATGCTCCTGGCTGTTTTGTACTGCCTGCTGTGGAGTTCCAGACCTCCGCTGGCCATTTTC	142		
Sbjct	1	ATGATCCTGGCTGTTTTGTTCTTTCTCCTGTGCAGTTTCCAGACCTCCGCCGGCCATTTTC	60		
Query	143	CCTAGAGCCTG--TGTCTCCTCTAAGAACCTGATGGAGAAGGAATGCTGTCCACCGTGGA	200		
Sbjct	61	CCCCGAGCTGCACGTCT-CT-TCGGAACCTGATAGAGAAGGAATGCTGCCCGCCGTGGA	118		
Query	201	GCGGGGACAGGAGTCCCTGTGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCTGTCCAGAAATATCCTTC	260		
Sbjct	119	AGGGGGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCTGTCCAGACATCCTTC	178		
Query	261	TGTCCAATGCACCACTTGGGCTCAATTTCCCTTTCACAGGGGTGGATGACCGGGAGTCGT	320		
Sbjct	179	TGTCCAGTGCACCAATTTGGGCCACAATTCCTTTCACAGGGGTGGACGACAGGGAATCCT	238		
Query	321	GGCCTCCGTCTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTGGCAACTTCATGGGATTCAACT	380		
Sbjct	239	GGCCTCCGTCTTTTATAACAGAACCTGCCAGTGTCTGGCAACTTCATGGGATTGAGCT	298		
Query	381	GTGGAAACTGCAAGTTTGGCTTTTGGGGACCAAACGCACAGAGAGACTCTTGGTGA	440		
Sbjct	299	GTGGACGTTGCAAGTTTGGATACTGGGGACCAAACGCACACAGAAAAGAGTCTTGGTGA	358		
Query	441	GAAGAAACATCTTCGATTTGAGTGTCCAGAGAAGGACAAATTTTTGCCTACCTCACTT	500		
Sbjct	359	GAAGAAACATCTTCGATTTGAGTGTCCAGAGAAGGACAAAGTTCCTCGCCTACCTCACTT	418		
Query	501	TAGCAAAGCATACCATCAGCTCAGACTATGTCATCCCATAGGGACCTATGGCCAAATGA	560		
Sbjct	419	TAGCAAAGCATACCATCAGTGCAGACTATGTCATCCGACAGGCAGTATGGCCAAATGA	478		
Query	561	AAAATGGATCAACCCCATGTTTAAACGACATCAATATTTATGACCTCTTTGTCTGGATGC	620		
Sbjct	479	AGAACGGATCAACCCCATGTTTAAACGATGTTAACGTTTATGACCTCTTTGTCTGGATGC	538		
Query	621	ATTATTATGTGTCAATGGATGCACTGCTTGGGGGATCTGAAATCTGGAGAGACATTGATT	680		
Sbjct	539	ATTACTATGTGTCAAGAGACACACTGCTTGGGGGTCTGAAATATGGAGAGACATTGATT	598		
Query	681	TTGCCCATGAAGCACCAGCTTTTCTGCCTTGGCATAGACTCTTCTTGTGCGGTGGGAAC	740		
Sbjct	599	TTGCCCATGAAGCACCAGGTTTCTGCCTTGGCATAGACTTTTCTTGTCTGTGGGAAG	658		
Query	741	AAGAAATCCAGAAGCTGACAGGAGATGAAACTTCACTATTCATATTGGGACTGGCGGG	800		
Sbjct	659	AAGATATCCGGGAGCTTACAGGGGATGAGAACTTCACTATTCATACTGGGACTGGCGAG	718		
Query	801	ATGCAGAAAAGTGTGACATTTGCACAGATGAGTACATGGGAGGTCAGACCCCAACAATC	860		
Sbjct	719	ATGCGGAAAGCTGTGACATTTGCACAGACGAGTACATGGGAGGTCGGCACCTACAAGCC	778		
Query	861	CTAACTTACTCAGCCAGCATCATTCTCTCTCTTGGCAG	901		
Sbjct	779	CTAACCTGCTCAGCCAGCATCGTTCTCTCTCTTGGCAG	819		

5. BLAST člověk - činčila

- Query: *Homo sapiens* tyrosinase (TYR), mRNA (NM_000372.4)
- Subject: *Chinchilla lanigera*: tyrosinase predicted mRNA (XM_005379730.2)

Pátý alignment porovnává mRNA genu *TYR* u člověka č. NM_000372.4 a predikovanou mRNA činčily vlnaté č. XM_005379730.2. Výsledkem je jedna oblast (Range 1) shodná z 85 %, s 9 vloženými mezerami (6 u člověka a 3 u činčily), na plusových vláknech. Po prostudování se jedná o velice podobný výsledek jako u výsledku č. 2, je zde totiž opět sumarizováno všech pět exonů činčily i člověka jdoucích po sobě, tedy je zde zobrazena celá kódující oblast. Zeleně jsou označeny počáteční báze každého exonu. Část úseku označená šedými písmeny označuje část již nekódující.

Range 1: 1 to 1663

Alignment statistics for match #1					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1727 bits(935)	0.0	1424/1666(85%)	9/1666(0%)	Plus/Plus
Query	83	ATGCTCCTGGCTGTTTTGTACTGCCTGCTGTGGAGTTTCCAGACCTCCGCTGGCCATTTTC	142		
Sbjct	1	ATGATCCTGGCTGTTTTGTCTTTTCTCCTGTGCAGTTTCCAGACCTCCGCCGGCCATTTTC	60		
Query	143	CCTAGAGCCTG--TGTCTCCTCTAAGAACCTGATGGAGAAGGAATGCTGTCCACCGTGGA	200		
Sbjct	61	CCCCGAGCTTGCACGTCTCTCTCGGAACCTGATAGAGAAGGAATGCTGCCCGCGTGGA	118		
Query	201	GCGGGGACAGGAGTCCCTGTGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCCGTGTCAGAATATCCTTC	260		
Sbjct	119	AGGGGGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCCGTGTCAGGACATCCTTC	178		
Query	261	TGTCCAATGCACCACTTGGGCCTCAATTTCCCTTACAGGGGTGGATGACCGGGAGTCGT	320		
Sbjct	179	TGTCCAGTGCACCAATTTGGGCCACAATTTCCCTTACAGGGGTGGACGACAGGGAATCCT	238		
Query	321	GGCCTTCCGTCTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGCTCTGGCAACTTCATGGGATTCAACT	380		
Sbjct	239	GGCCTTCCGTCTTTTATAACAGAACCTGCCAGTGCTCTGGCAACTTCATGGGATTCAGCT	298		
Query	381	GTGGAAACTGCAAGTTTGGCTTTTGGGGACCAAAGTGCACAGAGAGACGACTCTTGGTGA	440		
Sbjct	299	GTGGACGTTGCAAGTTTGGATACTGGGGACCAAAGTGCACACAGAAAAGAGTCTTGGTGA	358		
Query	441	GAAGAAACATCTTCGATTTGAGTGCCCCAGAGAAGGACAAATTTTTCGCTACCTCACTT	500		
Sbjct	359	GAAGAAACATCTTCGATTTGAGTGTCAGAGAGAAGGACAAAGTTCCTCGCCTACCTCACTT	418		
Query	501	TAGCAAAGCATACCATCAGCTCAGACTATGTCATCCCCATAGGGACCTATGGCCAAATGA	560		
Sbjct	419	TAGCAAAGCATACCATCAGTGCAGACTATGTCATCCCGACAGGCACGTATGGCCAAATGA	478		
Query	561	AAAATGGATCAACACCCATGTTTAAACGACATCAATATTTATGACCTCTTTGTCTGGATGC	620		
Sbjct	479	AGAACGGATCAACCCCATGTTTAAACGATGTTAACGTTTATGACCTCTTTGTCTGGATGC	538		
Query	621	ATTATTATGTGTCAATGGATGCACTGCTTGGGGGATCTGAAATCTGGAGAGACATTGATT	680		
Sbjct	539	ATTACTATGTGTCAAGAGACACACTGCTTGGGGGTCTGAAATATGGAGAGACATTGATT	598		

Query	681	TTGCCCATGAAGCACCAGCTTTTCTGCCTTGGCATAGACTCTTCTGTGTGCGGTGGGAAC	740
Sbjct	599	TTGCCCATGAAGCACCAGGTTTCTGCCTTGGCATAGACTTTTCTGTCTTGTGGGAAG	658
Query	741	AAGAAATCCAGAAGCTGACAGGAGATGAAAACCTCACTATTCATATTGGGACTGGCGGG	800
Sbjct	659	AAGATATCCGGGAGCTTACAGGGGATGAGAACTCACTATTCATACTGGGACTGGCGAG	718
Query	801	ATGCAGAAAAGTGTGACATTTGCACAGATGAGTACATGGGAGGTCAGCACCCACAAATC	860
Sbjct	719	ATGCGGAAAGCTGTGACATTTGCACAGACGAGTACATGGGAGGTCGGCACCCCTACAAGCC	778
Query	861	CTAACTTACTCAGCCAGCATCATTTCTTCTCCTCTTGGCAGATTGTCTGTAGCCGATTGG	920
Sbjct	779	CTAACTTACTCAGCCAGCATCGTTCTTCTCCTCTTGGCAGATTGTATGCAGCCGACTGG	838
Query	921	AGGAGTACAACAGCCATCAGTCTTTATGCAATGC AACGCCCGAGGGACCTTTACGGCGT	979
Sbjct	839	AGGAATATAACAGCCGTCAGGCTTTATGTGATGGGAAC CCTGAGGGACCTTTACTTCGT	897
Query	980	AATCCTGGAAACCATGACAAAATCCAGAACCCCAAGGCTCCCCTCTTCAGCTGATGTAGAA	1039
Sbjct	898	AATCCTGGAAAGCCATGACAAAAGCCAGGACCTCGAGGCTCCCCTCTTCAGCTGATGTAGAA	957
Query	1040	TTTTGCCTGAGTTTGACCCAATATGAATCTGGTTCCATGGATAAAGCTGCCAATTTTCAGC	1099
Sbjct	958	TTTTGCCTGAGTTTGACGCAGTATGAATCTGGCCCCATGGATAAAAAGCTGCCAATTTTCAGC	1017
Query	1100	TTTAGAAATACACTGGAAGATTGCTAGTCCACTTACTGGGATAGCGGATGCCTCTCAA	1159
Sbjct	1018	TTTAGAAATACATTGGAAGATTGCTAGCCCCATTACCGGAATCGCAGATGCCTCACAA	1077
Query	1160	AGCAGCATGCACAATGCCTTGCACATCTATATGAATGGAACAATGTCCCAGGTACAGGGA	1219
Sbjct	1078	AGCAGCATGCACAATGCTTTGCACATCTATATGAACGGAACCATGTCCCAAGTACAAGGA	1137
Query	1220	TCTGCCAACGATCCTATCTTCTTCTTCCACATGCATTTGTTGACAGTATTTTTGAGCAG	1279
Sbjct	1138	TCGGCCAACGATCCCATTTTTCTTCTTCTATCATGCCTTTGTTGACAGTATTTTTGAACAG	1197
Query	1280	TGGCTCCGAAGGCACCGTCCCTCTTCAAGAAGTTTATCCAGAAGCCAATGCACCCATTGGA	1339
Sbjct	1198	TGGCTCCGAAGGCACCGCCCACTTCAAGAAGTTTATCCAGAAGCAAATGCACCCATCGGG	1257
Query	1340	CATAACCGGGAATCCTACATGGTTCCCTTTTATAACCACTGTACAGAAATGGTGATTTCTTT	1399
Sbjct	1258	CATAACCGGGAGTCCCTACATGGTTCCCTTTTATAACCTCTCTACAAAAATGGTGATTTCTTT	1317
Query	1400	ATTTTCATCCAAAGATCTGGGCTATGACTATAGCTATCTACAAGATTGAGTCCCAGACTCT	1459
Sbjct	1318	GTGTCATCGAGAGATCTAGGCTATGAATACAGCTACCTACAAGATTGAGTCTCTAAGCTTC	1377
Query	1460	TTTCAAGACTACATTAAGTCCATTTTGAACAAGCGAGTCGGATCTGGTTCATGGCTCCTT	1519
Sbjct	1378	TTTCAAAAATACATTTGAGCCTTACTTGAACAAGCACGTCGGATCTGGCCGTGGTGGTC	1437
Query	1520	GGGGCGGCGATGGTAGGGCCGCTCCTCACTGCCCTGCTGGCAGGGCTTGTGAGCTTGTCTG	1579
Sbjct	1438	GGAGCAGCCTTGGTAGGAGCCGCCCTCGCTGCGTCACTGGTGGGGTTTACCAACCTACTG	1497
Query	1580	TGTCGTCACAAGAGAAAGCAGCTTCCCTGAAGAAAAGCAGCCACTCCTCATGGAGAAAGAG	1639
Sbjct	1498	TGCCGTACAAGAGGAAGCAGCTCCCCGAGGAAAGCAGCCGTTGCTCATGGAAAAGGAG	1557
Query	1640	GATTACCACAGC---TTGTATCAGAGCCATTTATAAAAGGCTTAGGCAATAGAGTAGGGC	1696
Sbjct	1558	GACTACAACAGCTTATTGTACAAAGCCATTTGTAAAAGGCACAAGCAGTAGAGTGGGAC	1617
Query	1697	CAAAAAGCCTGACCTCACTCTAACTCAAAGTAATGTCCAGGTTCCC	1742
Sbjct	1618	CAGAACACATGTCCTCACTGTAACCTCAGAGTGCTGTGCGGGTTCCC	1663

6. BLAST – člověk - myš

- Query: *Homo sapiens* tyrosinase (TYR), mRNA (NM_000372.4)
- Subject: *Mus musculus* mRNA for tyrosinase, complete cds (D00440.1)

Poslední, šestý alignment porovnává mRNA *TYR* u člověka č. NM_000372.4 (Query) a kompletní kódující sekvenci *Tyr* u myši č. D00440.1 (Subject). Podobně jako u předchozího pátého alignmentu člověka a činčily i myši a činčily je výsledkem jedna oblast (Range 1) shodná z 84 %, kde bylo vloženo celkem 21 mezer (16 u člověka, 5 u myši). Oblast je sumarizací všech pět exonů jdoucích po sobě a každá báze zahajující další exon je označena zeleně.

Range 1: 3 to 1657

Alignment statistics for match #1					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1559 bits(493)	0.0	1391/1659(84%)	21/1659(1%)	Plus/Plus
Query	25	AGAAATCTGTGACTCCAATTAGCCAGTTCCTGCAGACCTTGTGAGGA-CTAGAGGA-AGA	82		
Sbjct	3	AGAAGTCTGTGACACTCATTAACTTATTGGTGCAGATTTTGT-ATGATCTAAAGGAGAAA	61		
Query	83	TGTCCTGGCTGTTTTGTACTGCCTGCTGTGGAGTTCCAGACCTCCGCTGGCCATTTTC	142		
Sbjct	62	TGTTCTGGCTGTTTTGTATTGCCTTCTGTGGAGTTCCAGATCTCTGATGGCCATTTT	121		
Query	143	CCTAGACCTGTGTCTCCTCTAAGAACCTGATGGAGAAGGAATGCTGTCCACCGTGGAGC	202		
Sbjct	122	CCTCGACCTGTGCCTCCTCTAAGAACTTGTGGCAAAGAATGCTGCCACCATTGGATG	181		
Query	203	GGGACAGGAGTCCCTGTGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCTGTGAGAATATCCTTCTG	262		
Sbjct	182	GGTGATGGGAGTCCCTGCGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCTGCCAGGATATCCTTCTG	241		
Query	263	TCCAATGCACCACCTGGGCCTCAATTTCCCTTCACAGGGGTGGATGACCGGGAGTCGTGG	322		
Sbjct	242	TCCAGTGCACCATCTGGACCTCAGTTCCTTCAAAGGGGTGGATGACCGTGAGTCTCTGG	301		
Query	323	CCTTCCGCTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTGGCAACTTCATGGGATTCAACTGT	382		
Sbjct	302	CCCTCTGTGTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTCAGGCAACTTCATGGGTTTCAACTGC	361		
Query	383	GGAAACTGCAAGTTTGGCTTTTGGGGACCAAACCTGCACAGAGAGACGACTCTTGGTGAGA	442		
Sbjct	362	GGAAACTGTAAGTTTGGATTTGGGGGCCCAAATGTACAGAGAAGCGAGTCTTGATTAGA	421		
Query	443	AGAAACATCTTCGATTTGAGTGCCTCAGAGAAGGACAAATTTTTGCCTACCTCACTTTA	502		
Sbjct	422	AGAAACATTTTTGATTTGAGTGTCTCCGAAAAGAATAAGTTCTTTTCTTACCTCACTTTA	481		
Query	503	GCAAAGCATACCATCAGCTCAGACTATGTCATCCCCATAGGGACCTATGGCCAAATGAAA	562		
Sbjct	482	GCAAACATACTATCAGCTCAGTCTATGTCATCCCCACAGGCACCTATGGCCAAATGAAC	541		
Query	563	AATGGATCAACACCCATGTTTAAACGACATCAATATTTATGACCTCTTTGTCTGGATGCAT	622		
Sbjct	542	AATGGGTCAACACCCATGTTTAAATGATATCAACATCTACGACCTCTTTGTATGGATGCAT	601		
Query	623	TATTATGTGTCAATGGATGCAGTCTGGGGGATCTGAAATCTGGAGAGACATTGATTTT	682		
Sbjct	602	TACTATGTGTCAAGGGACACACTGCTGGGGGCTCTGAAATATGGAGGGACATTGATTTT	661		

Na závěr porovnávání sekvencí genu *TYR* bylo provedeno vícenásobné srovnání (multiple sequence alignment) kódujících sekvencí (mRNA) všech tří zkoumaných druhů pomocí programu Clustal Omega pro znázornění podobnosti. Horní linie je sekvence člověka, prostřední myši a spodní činčily. Vlastní alignment je uveden níže. Hvězdičky pod bázemi znázorňují úplnou shodu. Můžeme vidět, že shoda opravdu začíná startovacím kodonem AUG prvního exonu u všech tří druhů a pokračuje dalšími pěti po sobě jdoucími exony. Zeleně je vždy označena první báze dalšího exonu. Úsek označený šedě odpovídá místu s nízkou shodou u myši a je vyznačeno již výše v alignmentu č. 3. Koncový úsek alignmentu je uveden šedými písmeny, protože se jedná o nekódující oblast pátého exonu člověka a myši a pravděpodobně i činčily. Dále jsou v sekvencích člověka a myši vyznačeny mutace související se zbarvením či pigmentací, které jsou uvedeny v tabulkách a přílohách v této práci. Modře jsou označeny delece (posunutí čtecího rámce), růžově inserce (posunutí čtecího rámce) a ostatní mutace, kde dochází k substituci bází, žlutě. U činčily vlnaté mutace zatím nikdo nezkoumal, takže její sekvence je bez vyznačení, ale na základě podobnosti sekvencí lze usuzovat, že některé mohou být shodné.

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment
gi|542130633|gb|KC201588.1| -ATGCTCCTGGCTGTTTTGTACTGCCGCTGTGGAGTTTCCAGACCTCCGCTGCCAATT
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2 AATGTTCTTGGCTGTTTTGTATTGCCTTCTGTGGAGTTTCCAGATCTCTGATGCCATTT
gi|918587570|ref|XM_005379730.2| -ATGATCCTGGCTGTTTTGTCTTTCTCTGTGCAGTTTCCAGACCTCCGCCGCCATTT
    ** * * *****: * * * * * ***** * * * * * *****

gi|542130633|gb|KC201588.1| CCCTAGAGCCTGTGTCTCCTCTAAGAACCTGATGGAGAAGGAATGCTGTCCACCGTGGAG
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2 TCCTCGAGCCTGTGCCTCCTCTAAGAACCTGTTGGCAAAAAGAAATGCTGCCACCATGGAT
gi|918587570|ref|XM_005379730.2| CCCCAGAGCTTGACAGTCTCTTCGGAACCTGATAGAGAAGGAATGCTGCCCGCGTGGAA
    ** .***** * * * * * * * .***** * * * * * *****

gi|542130633|gb|KC201588.1| CGGGGACAGGAGTCCCTGTGCCAGCTTTCAGGCAAGGTTCCCTTCAGAAATATCCTTCT
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2 GGGTGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCCCTGCCAGGATATCCTTCT
gi|918587570|ref|XM_005379730.2| GGGGGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCCCTGTCCAGACATCCTTCT
    * * * * .***** ***** ***** * * * * * *****

gi|542130633|gb|KC201588.1| GTCCAATGCACCACTTGGGCTCAATTTCCCTTCACAGGGGTGCATGACCGGAGTCTG
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2 GTCCAGTGCACCATCTGGACCTCAGTTCCTTCAAGGGGTGGATGACCGTGTGCTGCTG
gi|918587570|ref|XM_005379730.2| GTCCAGTGCACCATTTGGGCCACAATTCCTTTCACAGGGGTGGACGACAGGGAATCCTG
    ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|542130633|gb|KC201588.1| GCTTCCGTCTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTGGCAACTTCATGGGATTCAACTG
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2 GCCCTCTGTGTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGTCTAGGCAACTTCATGGGTTCAACTG
gi|918587570|ref|XM_005379730.2| GCCCTCCGTCTTTTATAACAGAACCTGCCAGTGTCTGGCAACTTCATGGGATTCAACTG
    * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|542130633|gb|KC201588.1| TGGAACTGCAAGTTTGGCTTTTGGGGACCAACTGCACAGAGAGACTCTGGTGAG
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2 CGGAACTGTAAGTTTGGATTGGGGCCCAAATTTACAGAGAAGCAGTCTTGATTAG
gi|918587570|ref|XM_005379730.2| TGGACCTGCAAGTTTGGATACTGGGGACCAACTGCACAGAGAAAGAGTCTTGTTGAG
    * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|542130633|gb|KC201588.1| AAGAAACATCTTCGATTTGAGTGTCCAGAGAAGGACAAATTTTTGCCTACCTCACTTT
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2 AAGAAACATTTTGTATTGAGTGTCTCGAAAAGAAATAGTCTTTTCTTACCTCACTTT
gi|918587570|ref|XM_005379730.2| AAGAAACATCTTCGATTTGAGTGTCCAGAGAAGGACAAAGTTCCTCGCCTACCTCACTTT
    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```



```

gi|542130633|gb|KC201588.1|          TCAAGACTACATTAAGTCCTATTTGGAACAAGCGAGTCGGATCTGGTCATGGCTCCTTGG
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2     CAGAAATTATATTGAGCCTTACTTGAACAAGCCAGTCGTATCTGGCCATGGCTTCTTGG
gi|918587570|ref|XM_005379730.2|   TCAAAACTACATTGAGCCTTACTTGAACAAGCACGTCGGATCTGGCCGTGGCTGGTCGG
      .*. * ** ***. ** * ** ***** .**** ***** *.***** * **

gi|542130633|gb|KC201588.1|          GCGGCGATGGTAGGGCCGCTCCTCACGCCCCGCTGGCAGGGCTTGTGAGCTTGCTGTG
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2     GGCAGCACTGGTGGGAGCTGTATTGCTGCAGCTCTCTCTGGGCTTAGCAGTAGGCTATG
gi|918587570|ref|XM_005379730.2|   AGCAGCCTTGGTAGGAGCCGCCCTCGCTGCGTCACCTGGTGGGGTTTACCAACCTACTGTG
      .**.* ** ***. ***. ** * .*. ***** ** ** ***. * . **.*

gi|542130633|gb|KC201588.1|          TCGTCACAA-----GAGAAAGCAGCTTCCTGAAGAAAAGCAGCCACTCCTCATGGA
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2     CCTTCAGAAAGAAGAAGAAGAAGCAACCCAGGAGGAAAGGCAGCCACTCCTCATGGA
gi|918587570|ref|XM_005379730.2|   CCGTCACAA-----GAGGAAGCAGCTCCCGAGGAAAGGCAGCCGTTGCTCATGGA
      * ** * **          **.****** * . **.******.*****. * *****

gi|542130633|gb|KC201588.1|          GAAAGAGGATTACCACAGCTT--GTATCAGAGCCATTTATAAAAGGCTTAGGCAATAGA
gi|220626|dbj|D00440.1|MUSTYR2     CAAAGACGACTACCACAGCTTGCTGTATCAGAGCCATCTGTGAACATCCTAGGAAACAGA
gi|918587570|ref|XM_005379730.2|   AAAGAGGACTACAACAGCTTATTGTACCAAGCCATTTGTAAGGCACAAGCAGTAGA
      **.* ** ***.***** ** **.****** *.**.* * * * * **

```

5.2 Studium sekvencí dopachrom tautomerázy/tyrosin-příbuzného proteinu 2 (*DCT/TYRP2*)

Dopachrom tautomeráza je tyrosinu příbuzný protein a zároveň blízký gen, se kterým je provázán a ovlivňují se navzájem společně s tyrosinu příbuzným proteinem 1. Tímto patří do skupiny genů s největším vlivem na melanogenezi. Mutace na jeho lokusech se však ve fenotypu projevují jen u myši, u člověka není vliv na pigmentaci znám. *DCT* u člověka leží dle NCBI na 13. chromozomu s lokací na pozici NC_000013.11 (94437304..94550265, complement) a obsahuje 8 exonů. U myši leží na 14. chromozomu s lokací na pozici NC_000080.6 (118012790..118052323, komplement) a obsahuje také 8 exonů. U činčily je chromozom neznámý a místo lokace pouze odhadnuto na genomovou pozici NW_004955404.1 (15359402..15395556). Jisté však je, že obsahuje 8 exonů. Pro alignmenty jsou používány sekvence mRNA *DCT*, u činčily úsek genomu s pravděpodobným výskytem tohoto genu a predikovaná mRNA *Dct*. Jako v předchozí kapitole u každého alignmentu označuje Query horní linii porovnání a Subject dolní linii sekvencí, která je přiřazována k první. Na začátku jednotlivých srovnání je uvedeno číslo dané sekvence pro přehlednost.

1. BLAST – činčila – činčila
 - Query: *Chinchilla lanigera* predicted dopachrome tautomerase (*Dct*), mRNA (**XM_005374234.1**)
 - Subject: *Chinchilla lanigera* isolate Chin_1 unplaced genomic scaffold, ChiLan1.0 scaffold00003, whole genome shotgun sequence (**NW_004955404.1**)

První alignment v této části práce porovnává predikovanou mRNA *Dct* u činčily č. XM_005374234.1 (Query) a úsek celogenomového skenu č. NW_004955404.1, kde se dle NCBI pravděpodobně nachází *Dct* (Subject). Výsledkem je 8 krátkých úseků řazených sestupně dle velikosti, resp. počtu bází, což potvrzuje skutečnost, že gen *Dct* u činčily opravdu obsahuje 8 exonů. Po prostudování bylo na základě podobnosti s *Dct* u myši zjištěno, že se jedná o všech 8 exonů a úseky jim odpovídají následujícím způsobem: Range 1 = exon 2, Range 2 = exon 1, Range 3 = exon 7, Range 4 = exon 8, Range 5 = exon 5, Range 6 = exon 4, Range 7 = exon 6 a Range 8 = exon 3. Úsek zobrazený malými šedými písmeny v prvním úseku vyhodnotil BLAST jako oblast s nízkou shodou. V každém úseku jsou šedě označené báze, které patří do konce předchozího nebo začátku následujícího exonu (na základě shody s exony u myši).

U exonu 8 (Range 4) není jisté, zda do něj patří 4 báze TTTC. Jsou znázorněny tmavším odstínem šedé.

Range 1: 15368614 to 15368920 (Exon 2)

Alignment statistics for match #1					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
560 bits(303)	1e-158	306/307(99%)	1/307(0%)	Plus/Plus	
Query 291	CACAGGAACTTTGCTGGCTATAACTGTGGAGACTGCTGGTTCGGCTGGACTGGCCCTA				349
Sbjct 15368614	CACTAGGAACTTTGCTGGCTATAACTGTGGAGACTGCTGGTTCGGCTGGACTGGCCCTA				15368673
Query 350	ACTGTGATCAGAGGAAACCACCCGTTGTCCGGCAGAACATCCATTCCCTGACTCCGCAGG				409
Sbjct 15368674	ACTGTGATCAGAGGAAACCACCCGTTGTCCGGCAGAACATCCATTCCCTGACTCCGCAGG				15368733
Query 410	AGAGGGAGCAGTTCCTGGGTGCCTTAGATCTGGCCAAGAAGACCACACACCTGACTACG				469
Sbjct 15368734	AGAGGGAGCAGTTCCTGGGTGCCTTAGATCTGGCCAAGAAGACCACACACCTGACTACG				15368793
Query 470	TGATCGCCACACAGCACTGGCTGGGCCTGCTTGGGCCCAATGGGACCCAGCCACAGATAG				529
Sbjct 15368794	TGATCGCCACACAGCACTGGCTGGGCCTGCTTGGGCCCAATGGGACCCAGCCACAGATAG				15368853
Query 530	CCAACTGCAGCATTACGAttttttGTATGGCTCCATTACTATTCTGTTAGAGACACAT				589
Sbjct 15368854	CCAACTGCAGCATTACGATTTTTTGTATGGCTCCATTACTATTCTGTTAGAGACACAT				15368913
Query 590	TATTAGG 596				
Sbjct 15368914	TATTAGG 15368920				

Range 2: 15359402 to 15359697 (Exon 1)

Alignment statistics for match #2					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
546 bits(295)	1e-154	295/295(100%)	0/295(0%)	Plus/Plus	
Query 1	ATGCGTTTCCTGCCTTGGGGGCTTCTGCTCGGCTGCCTGGGCTGCAGCATCTGGCCTGGA				60
Sbjct 15359402	ATGCGTTTCCTGCCTTGGGGGCTTCTGCTCGGCTGCCTGGGCTGCAGCATCTGGCCTGGA				15359461
Query 61	GCCTGGGCCCAGTTCCCCAGGGTCTGCATGACCTTAGACAGCCTGAGGAAAAAGGAGTGC				120
Sbjct 15359462	GCCTGGGCCCAGTTCCCCAGGGTCTGCATGACCTTAGACAGCCTGAGGAAAAAGGAGTGC				15359521
Query 121	TGCCCGCCCTGGGTGTGGCGCCCGGCAATGTCTGTGGCTCCCAGGAAGGCCGGGGACAG				180
Sbjct 15359522	TGCCCGCCCTGGGTGTGGCGCCCGGCAATGTCTGTGGCTCCCAGGAAGGCCGGGGACAG				15359581
Query 181	TGCTCAGAGGCGGAGCAGACACCAGGCCCTGGAGTGGCCCTTACGTCTGCGAAACCGG				240
Sbjct 15359582	TGCTCAGAGGCGGAGCAGACACCAGGCCCTGGAGTGGCCCTTACGTCTGCGAAACCGG				15359641
Query 241	GATGATCGCGAGCGGTGGCCAAGGAAGTTCTTCAACAGGACCTGCAGGTGCACAG				295
Sbjct 15359642	GATGATCGCGAGCGGTGGCCAAGGAAGTTCTTCAACAGGACCTGCAGGTGCACAG				15359696

Range 3: 15390062 to 15390264 (Exon 7)

Alignment statistics for match #3					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
375 bits(203)	5e-103	203/203(100%)	0/203(0%)	Plus/Plus	
Query 1179	GGTCCTTCACTCCTTCACTGATGGCATCTTTGATGAGTGGATGAAAAGATACAAGCCTGC				1238
Sbjct 15390062	GGTCCTTCACTCCTTCACTGATGGCATCTTTGATGAGTGGATGAAAAGATACAAGCCTGC				15390121
Query 1239	TGCAGATGCCTGGCCTGAGGAGTTGGCACCCATCGGTCACAATCGAATGTATAACATGGT				1298
Sbjct 15390122	TGCAGATGCCTGGCCTGAGGAGTTGGCACCCATCGGTCACAATCGAATGTATAACATGGT				15390181

Query	1299	CCCTTTCTTCCCTCCAGTACTAATGAGGAACTTTTTCTAACTGCAGACCAACTTGGCTA	1358
Sbjct	15390182	CCCTTTCTTCCCTCCAGTACTAATGAGGAACTTTTTCTAACTGCAGACCAACTTGGCTA	15390241
Query	1359	CATTATGCTATTGATTTGCCAG	1381
Sbjct	15390242	CATTATGCTATTGATTTGCCAG	15390264

Range 4: 15395354 to 15395556 (Exon 8)

Alignment statistics for match #4				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
375 bits(203)	5e-103	203/203(100%)	0/203(0%)	Plus/Plus
Query	1379	CAGTTTCAGCTGAAGAACTCCAAGTTGGACCACAATACTCTCGGTGGTGTGGGAACAC	1438	
Sbjct	15395354	CAGTTTCAGCTGAAGAACTCCAAGTTGGACCACAATACTCTCGGTGGTGTGGGAACAC	15395413	
Query	1439	TTGCGGCCTTGGTTGGTCTTTTTGTGCTGCTGATTTTCTGCAGTACAGAAGGCTCCGCA	1498	
Sbjct	15395414	TTGCGGCCTTGGTTGGTCTTTTTGTGCTGCTGATTTTCTGCAGTACAGAAGGCTCCGCA	15395473	
Query	1499	GAGGATACACACCCCTCATGGAACTCATTTAAGCAGCAAGAGATACACAGAAGAAGCTG	1558	
Sbjct	15395474	GAGGATACACACCCCTCATGGAACTCATTTAAGCAGCAAGAGATACACAGAAGAAGCTG	15395533	
Query	1559	AGGGAGCTCAGGCCATACCCTAG	1581	
Sbjct	15395534	AGGGAGCTCAGGCCATACCCTAG	15395556	

Range 5: 15375368 to 15375550 (Exon 5)

Alignment statistics for match #5				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
339 bits(183)	7e-92	183/183(100%)	0/183(0%)	Plus/Plus
Query	862	AGCTTGGATGACTACAATCACCGAGTCACCTTGTGTAATGGAACGTATGAAGGTTTGCTG	921	
Sbjct	15375368	AGCTTGGATGACTACAATCACCGAGTCACCTTGTGTAATGGAACGTATGAAGGTTTGCTG	15375427	
Query	922	AGAAGAAATCAAGTGGGAAGAAATAGTGAGAAGTTGCCAACCTTAAAAACGTACAAGAT	981	
Sbjct	15375428	AGAAGAAATCAAGTGGGAAGAAATAGTGAGAAGTTGCCAACCTTAAAAACGTACAAGAT	15375487	
Query	982	TGTCTGTCCCTCCAGAAGTTTGACAACCCCTCTTTCTTCCAGAACTTACCTTCAGCTTC	1041	
Sbjct	15375488	TGTCTGTCCCTCCAGAAGTTTGACAACCCCTCTTTCTTCCAGAACTTACCTTCAGCTTC	15375547	
Query	1042	AGG	1044	
Sbjct	15375548	AGG	15375550	

Range 6: 15372252 to 15372420 (Exon 4)

Alignment statistics for match #6				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
313 bits(169)	4e-84	169/169(100%)	0/169(0%)	Plus/Plus
Query	695	AGCGCCTCACTGGGAATGAGTCCTTCGCTTTGCCCTACTGGAATTTGCCACTGGGAGAA	754	
Sbjct	15372252	AGCGCCTCACTGGGAATGAGTCCTTCGCTTTGCCCTACTGGAATTTGCCACTGGGAGAA	15372311	
Query	755	ACGAGTGTGATGTGTGCACAGACCAGCTTCTCGGGCAGCCAGACAAGATGACCCAACCTC	814	
Sbjct	15372312	ACGAGTGTGATGTGTGCACAGACCAGCTTCTCGGGCAGCCAGACAAGATGACCCAACCTC	15372371	
Query	815	TGATTAGTCCGAACCAAGATTCTCCAGCTGGGAAATTGTCTGTGACAG	863	
Sbjct	15372372	TGATTAGTCCGAACCAAGATTCTCCAGCTGGGAAATTGTCTGTGACAG	15372420	

Range 7: 15377096 to 15377245 (Exon 6)

Alignment statistics for match #7					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
261 bits(141)	2e-68	148/151(98%)	2/151(1%)	Plus/Plus	
Query	1038	CTTCAGGAATGCCTTGGAAAGGGTTTGATAAGGCAGATGGGTTGCTGGACTCTCGAGTGGC			1097
Sbjct	15377096	CTTCAGGAATGCCTTGGAAAGGGTTTGATAAGGCAGATGGGTTGCTGGACTCTCGAGTGGC			15377154
Query	1098	GAACCTTCATAACTTGGTTCACTCCTTCCTGAACGGGACAAGTGCTCTGCCACATTCAGC			1157
Sbjct	15377155	GAACCTTCATAACTTGGTTCACTCCTTCCTGAACGGGACAAGTGCTCTGCCACATTCAGC			15377214
Query	1158	CGCCAATGATCCTGTTTTTGTGGTCC	TTCA 1187		
Sbjct	15377215	CGCCAATGATCCTGTTTTTGTGGTACGTTCA	15377245		

Range 8: 15371474 to 15371577 (Exon 3)

Alignment statistics for match #8					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
193 bits(104)	6e-48	104/104(100%)	0/104(0%)	Plus/Plus	
Query	593	TAGGACCAGGACGCCCTTCAAGGCCATAGATTTCTCACACCAAGGACCTGCTTTTGTGA			652
Sbjct	15371474	TAGGACCAGGACGCCCTTCAAGGCCATAGATTTCTCACACCAAGGACCTGCTTTTGTGA			15371533
Query	653	CCTGGCATAGATACCATTTATTTGTGGCTGGAAAGAGACCTCCAG		696	
Sbjct	15371534	CCTGGCATAGATACCATTTATTTGTGGCTGGAAAGAGACCTCCAG		15371577	

2. BLAST – myš – činčila

- Query: *Mus musculus* dopachrome tautomerase (Dct), mRNA (NM_010024.3)
- Subject: *Chinchilla lanigera* isolate Chin_1 unplaced genomic scaffold, ChiLan1.0 scaffold00003, whole genome shotgun sequence (NW_004955404.1)

Druhý alignment porovnává mRNA *Dct* u myši č. NM_010024.3 (Query) a úsek celogenomového skenu s pravděpodobným výskytem genu č. NW_004955404.1 u činčily (Subject). Výsledkem je jeden krátký úsek, který po prostudování odpovídá exonu 5 u myši. Šedými písmeny jsou označeny báze, které patří do předchozího exonu a následujícího intronu. Úsek je shodný z 90 %, bez zařazených mezer a nalézá se na stejných vláknech (Plus/Plus). V ostatních alignmentech našel program i ostatní exony, není tedy zcela jasné, proč v tomto porovnání našel v genomu činčily pouze tento exon odpovídající exonu myši.

Range 1: 15375368 to 15375550

Alignment statistics for match #1					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
233 bits(126)	5e-60	164/183(90%)	0/183(0%)	Plus/Plus	
Query	1330	AGCTTGGATGACTACAACCGCCGGGTCACACTGTGTAATGGAACCTATGAAGGTTTGCTG			1389
Sbjct	15375368	AGCTTGGATGACTACAATCACCGAGTCACCTTGTGTAATGGAACCTATGAAGGTTTGCTG			15375427

```

Query 1390     AGAAGAAACAAAGTAGGCAGAAATAATGAGAAACTGCCAACCTTAAAAAATGTGCAAGAT 1449
             ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 15375428 AGAAGAAATCAAGTGGGAAGAAATAGTGAGAAGTTGCCAACCTTAAAAACGTACAAGAT 15375487

Query 1450     TGCCTGTCTCTCCAGAAGTTTGACAGCCCTCCCTTCTTCCAGAACTCTACCTTCAGCTTC 1509
             || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 15375488 TGTCTGTCCCTCCAGAAGTTTGACAACCTCCTTTCTTCCAGAACTCTACCTTCAGCTTC 15375547

Query 1510     AGG 1512
             |||
Sbjct 15375548 AGG 15375550

```

3. BLAST – myš – činčila

- Query: *Mus musculus* dopachrome tautomerase (Dct), mRNA (NM_010024.3)
- Subject: *Chinchila lanigera* predicted dopachrome tautomerase (Dct), mRNA (XM_005374234.1)

Třetí alignment porovnává mRNA *Dct* u myši č. NM_010024.3 (Query) a predikovanou mRNA dopachrom tautomerázy u činčily č. XM_005374234.1 (Subject). Výsledkem je jeden dlouhý úsek shodný z 82 %, kde program doplnil 10 mezer a nachází se na shodných vláknech (Plus/Plus). Po prostudování bylo zjištěno, že se jedná o všech 8 exonů jdoucích po sobě a tvoří tak celou kódující oblast. Počáteční báze každého exonu je označena zeleně. Mezery jsou vyznačeny šedě. V prvním exonu u myši chybí na začátku 15 bází, aby byla kódující oblast kompletní. Zřejmě se jedná o oblast s nízkou shodou, a tak tyto báze program už nezařadil. Na konci 7. exonu vložil program u myši 4 mezery, činčila má tady navíc báze TTTC. Buď má tedy na konci delší 7. exon o tyto 4 báze a nebo je o ně prodloužen 8. exon na jeho začátku. Aby byl u myši 8. exon kompletní, chybí ještě na konci 4 báze (CTAG). Nebyly programem zařazeny nejspíš kvůli neshodě s činčilí mRNA.

Range 1: 16 to 1556

Alignment statistics for match #1					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1317 bits(713)	0.0	1268/1543(82%)	10/1543(0%)	Plus/Plus
Query	484	T GGGGGCTTCTGCTGGGTTGTCTGGGCTGCGGAATTCT -G CTCAGAGCTCGGGCTCAGTT	542		
Sbjct	16	T GGGGGCTTCTGCTCGGCTGCCTGGGCTGCAGCAT-CTGGCCTGGAGCCTGGGCCAGTT	74		
Query	543	TCCCCGAGTCTGCATGACCTTGGATGGCGTGCTGAACAAGGAATGCTGCCCGCCTCTGGG	602		
Sbjct	75	CCCCAGGGTCTGCATGACCTTAGACAGCCTGAGGAAAAAGGAGTGCTGCCCGGCCCTGGG	134		
Query	603	TCCCCAGGCAACCAACATCTGTGGATTTCTAGAGGGCAGGGGGCAGTGCGCAGAGGTGCA	662		
Sbjct	135	TGTGGCGCCCGCAATGTCTGTGGCTCCCAGGAAGGCCGGGGACAGTGCTCAGAGGCGCG	194		
Query	663	AACAGACACCAGACCCTGGAGTGGCCCTTATATCCTTCGAAACCAGGATGACCGTGAGCA	722		
Sbjct	195	AGCAGACACCAGGCCCTGGAGTGGCCCTTACGTCTCGCAAACCGGGATGATCGCGAGCG	254		


```

Query 723 ATGGCCGAGAAAATTCTTCAACCGGACATGCAAATGCACAGCAAACCTTTGCTGGTTATAA 782
          ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 255 GTGGCCAAGGAAGTTCTTCAACAGGACCTGCAGGTGCACAGCAAACCTTTGCTGGCTATAA 314

Query 783 TTGTGGAGGCTGCAAGTTCGGCTGGACCGGCCCGACTGTAATCGGAAGAAGCCGGCCAT 842
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 315 CTGTGGAGACTGCTGGTTCGGCTGGACTGGCCCTAACTGTGATCAGAGGAAACCACCCGT 374

Query 843 CCTAAGACGGAATATCCATTCCCTGACTGCCAGGAGAGGGAGCAGTTCTTGGGCGCCTT 902
          | | | ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 375 TGTCCGGCAGAACATCCATTCCCTGACTCCGCAGGAGAGGGAGCAGTTCTTGGGTGCCTT 434

Query 903 AGACCTGGCCAAGAAGAGTATCCATCCAGACTACGTGATCACCACGCAACACTGGCTGGG 962
          ||| ||||| ||||| | || || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 435 AGATCTGGCCAAGAAGACCACACACCCTGACTACGTGATCGCCACACAGCACTGGCTGGG 494

Query 963 GCTGCTCGGACCCAACGGGACCCAGCCCCAGATCGCCAACCTGCAGCGTGTATGACTTTTT 1022
          ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 495 CCTGCTTGGGCCAATGGGACCCAGCCACAGATAGCCAACCTGCAGCATTTACGATTTTTT 554

Query 1023 TGTGTGGCTCCATTATTATCTGTTTCGAGACACATTATTAGCTCCAGGACGCCCTATAA 1082
          ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 555 TGTATGGCTCCATTACTATTCTGTTAGAGACACATTATTAGCTACCAGGACGCCCTTCAA 614

Query 1083 GGCCATTGATTTCTCTCACCAAGGGCCTGCCTTTGTTCACGTGGCACAGGTACCATCTGTT 1142
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 615 GGCCATAGATTTCTCACACCAAGGACCTGCTTTGTGACCTGGCATAGATACCATTTATT 674

Query 1143 GTGGCTGGAAAGAGAAGTCCAGAGACTCACTGGCAATGAGTCCTTTGCGTTGCCCTACTG 1202
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 675 GTGGCTGGAAAGAGACCTCCAGAGCCTCACTGGGAATGAGTCCTTCGCTTTGCCCTACTG 734

Query 1203 GAACTTTGCAACCGGGAAGAACGAGTGTGACGTGTGCACAGACGAGCTGCTTGGAGCAGC 1262
          ||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 735 GAATTTTGCCACTGGGAGAAACGAGTGTGATGTGTGCACAGACCAGCTTCTCGGGGAGC 794

Query 1263 AAGACAAGATGACCCAACGCTGATTAGTCGGAACCTCGAGATTCTCTACCTGGGAGATTGT 1322
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 795 CAGACAAGATGACCCAACCTGATTAGTCCGAACTCAAGATTCTCCAGCTGGGAAATTGT 854

Query 1323 GTGCGACAGCTTGGATGACTACAACCGCCGGTTCACACTGTGTAATGGAACCTATGAAGG 1382
          || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 855 CTGTGACAGCTTGGATGACTACAATCACCGAGTCACCTTGTGTAATGGAACCTATGAAGG 914

Query 1383 TTTGCTGAGAAGAAACAAAGTAGGCAGAAATAATGAGAAACTGCCAACCTTAAAAAATGT 1442
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 915 TTTGCTGAGAAGAAATCAAGTGGGAAGAAATAGTGAGAAGTTGCCAACCTTAAAAACGT 974

Query 1443 GCAAGATTGCCTGTCTCTCCAGAAGTTTGACAGCCCTCCCTTCTTCCAGAACTCTACCTT 1502
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 975 ACAAGATTGTCTGTCCCTCCAGAAGTTTGACAACCCCTCCTTTCTTCCAGAACTCTACCTT 1034

Query 1503 CAGCTTCAGCAATGCACTGGAAGGGTTTGATAAAGCAGACGGAACACTGGACTCTCAAGT 1562
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1035 CAGCTTCAGCAATGCCTTGGGAGGGTTTGATAAGGCAGATGGGTTGCTGGACTCTCGAGT 1094

Query 1563 CATGAACCTTCATAACTTGGCTCACTCCTTCCTGAATGGGACCAATGCCTTGCCACACTC 1622
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1095 GGCGAACCTTCATAACTTGGTTCACCTCCTTCCTGAACGGGACAAGTGCTCTGCCACATTC 1154

Query 1623 AGCAGCCAACGACCCTGTGTTTGTGCTCCTCCACTCTTTTACAGACGCCATCTTTGATGA 1682
          ||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1155 AGCCGCAATGATCCTGTTTTTGTGCTCCTTCACTCCTTCACTGATGGCATCTTTGATGA 1214

Query 1683 GTGGCTGAAGAGAAACAACCCTTCCACAGATGCCTGGCCTCAGGAACCTGGCACCATTGG 1742
          ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1215 GTGGATGAAAAGATACAAGCCTGCTGCAGATGCCTGGCCTGAGGAGTTGGCACCCATCGG 1274

```

```

Query 1743 TCACAACCGAATGTATAACATGGTCCCCTTCTTCCCACCGGTGACTAATGAGGAGCTCTT 1802
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1275 TCACAATCGAATGTATAACATGGTCCCCTTCTTCCCCTCCAGTGACTAATGAGGAACCTTTT 1334

Query 1803 CCTAACCGCAGAGCAACTTGGCTACAATTACGCCGTTGATCTGTCAG-----AG--GAAGA 1856
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1335 TCTAACTGCAGACCAACTTGGCTACATTTATGCTATTGATTTGCCAGTTTCAGCTGAAGA 1394

Query 1857 AGCTCCAGTTTGGTCCACAACCTCTCTCAGTGGTCATTGGAATCCTGGGAGCTTTCGTCTT 1916
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1395 AACTCCAAGTTGGACCACAATACTCTCGGTGGTGATGGGAACACTTGCGGCCTTGGT-TG 1453

Query 1917 G-CTCTTGGGGTTGCTGGCTTTTCTTCAATACAGAAGGCTTCGCAAAGGCTATGCGCCCT 1975
          | || ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1454 GTCTTTTTGTGCTGCTGATTTTCTTGCAGTACAGAAGGCTCCGCAGAGGATACACACCCC 1513

Query 1976 TAATGGAGACAGGTCTCAGCAGCAAGAGATACACGGAGGAAGC 2018
          | ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1514 TCATGGAAACTCATTTAAGCAGCAAGAGATACACAGAAGAAGC 1556

```

4. BLAST – člověk - činčila

- Query: *Homo sapiens* dopachrome tautomerase (*DCT*), transcript variant 1, mRNA (NM_001922.4)
- Subject: *Chinchilla lanigera* isolate Chin_1 unplaced genomic scaffold, ChiLan1.0 scaffold00003, whole genome shotgun sequence (NW_004955404.1)

Čtvrtý alignment porovnává mRNA dopachrom tautomerázy u člověka č. NM_001922.4 (Query) a úsek celogenomového skenu u činčily č. NW_004955404.1 (Subject). Výsledkem jsou 4 shodné úseky, z nichž první (Range 1) zde neuvádíme, protože se po prozkoumání jednalo o 1826 bází dlouhý úsek shodný ze 74 % s částí nekódující oblasti za 8. exonem u člověka, ve kterém bylo zařazeno 135 mezer. Nebylo potřeba jej uvádět z důvodu nedůležitosti (nekódující oblast) a nižšího procenta shody. Druhý úsek (Range 2) odpovídá exonu 1 u člověka, resp. celé kódující i nekódující oblasti. První báze kódující oblasti je vyznačena zeleně. Úsek šedými písmeny na začátku shody patří do úseku výše po 5' vlákně, stejně tak poslední báze náležící intronu. Oblast malými šedými písmeny je oblast s nízkou shodou dle BLAST. Range 3 je shodný s 2. exonem z 86 %, byla zařazena 1 mezera a šedými písmeny jsou vyznačeny části napřící do exonu. Range 4 odpovídá exonu 8 u člověka z 84 % s dvěma mezerami, přičemž báze šedými písmeny na začátku úseku náleží 7. exonu a na konci úseku nekódující oblasti 8. exonu.

Range 2: 15358955 to 15359697 (Exon 1)

Alignment statistics for match #2					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
418 bits(226)	2e-115	585/754(78%)	42/754(5%)	Plus/Plus	
Query 1		AACTGAGTTCAAGGCAATTAAGTCAAGAGCTAAGGAGGGAGGGAGAGGGTTAGAAATA			60
Sbjct 15358955		AACTGAGTTCAAGGCAATTAAGTCAAGGACTAAGGAGGAAAGCAGGAGCCTTAGAAATA			15359014
Query 61		CCAGCATAATAAGTAGTATGACTGGGT-GCTCTGTAAATTAAGTCAATTAGACAAAGCCT			119
Sbjct 15359015		CCAGCATAATAAGCAGTGTGACTGGGGCGTCTGTAAATTAAGTCAATTAGACAAAGCCT			15359074
Query 120		GACTTAACGGGGGA-----AGATGGTGAGAAGCGCTACCCCTATTAAATTTGGTTGTT			172
Sbjct 15359075		GATTTAACAGGGGTGGGGGGAGATGGTGAGAAGCACCTCCCTCGTTAAATTTGGC--TT			15359132
Query 173		AGAGGCGCTTCTAAGGAAATTAAGTC--TGTTAGTTGTTTGAATCATAAAATTTGTGTG			230
Sbjct 15359133		AGAGGTGCTTCTAATGAAATTAATTTGTGTAGTTGTTTGAAT--CATAAACAGCATG			15359190
Query 231		TGCACGTTTACGTACACATGTGCACACATGTAACCTCTGTGATTCTGTGGGTAAtttttt			290
Sbjct 15359191		TGCATGTGCATGTACACGTGTGTGCACATGTAGGCTC--TGATTTTTGTGGGCA-TTTTT			15359247
Query 291		taagaagaaaggaatagaaagcaaaagaaa--aa--ta--aaaa--atactgaaaagaa--a			341
Sbjct 15359248		TAAGAAGAGAGGAAAAGAACGCAATAACGTTAAGTACCAAAAGAAAAGATTTGAATGA			15359307
Query 342		a-gactga--aagag--t-a-gaa-g--at--aaggagaaaagtacgacagagacaaggaa			390
Sbjct 15359308		ATGAGTGCCTAAGAAATCAAGAGTGGATCACAAAGGAGGAGGGCAAGACAGAATCAAGGC-			15359366
Query 391		agtaagagagagagagagCTCTCCCAATTATAAAGCCATGAGCCCCCTTTGGTGGGGGTT			450
Sbjct 15359367		-GTAGCA-AGTGCGCGAGTTCTCCAGCCACACAGCCATGCGTTTCTGCCTTGGGGGCT			15359424
Query 451		TCTGCTCAGTTGCTTGGGCTGCAAAATCCTGCCAGGAGCCAGGGTCAGTTCCCCGAGT			510
Sbjct 15359425		TCTGCTCGGCTGCCTGGGCTGCAGCATCTGGCCTGGAGCCTGGGCCAGTTCCCCAGGGT			15359484
Query 511		CTGCATGACGGTGGACAGCCT-AGTGAACAAGGAGTGCTGCCACGCCTGGGTGCAGAGT			569
Sbjct 15359485		CTGCATGACCTTAGACAGCCTGAG-GAAAAAGGAGTGCTGCCCGCCCTGGGTGTGGCGC			15359543
Query 570		CGGCCAATGTCTGTGGCTCTCAGCAAGGCCGGGGCAGTGACAGAGGTGCGAGCCGACA			629
Sbjct 15359544		CCGGCAATGTCTGTGGCTCCAGGAAGGCCGGGGACAGTGCTCAGAGGCGCGAGCAGACA			15359603
Query 630		CAAGGCCCTGGAGTGGTCCCTACATCTTACGAAACCAGGATGACCGTGAGCTGTGGCCAA			689
Sbjct 15359604		CCAGGCCCTGGAGTGGCCCTTACGTCTGCCAAACCGGATGATCGCGAGCGGTGGCCAA			15359663
Query 690		GAAAATTCTTCCACCGACCTGCAAGTGACAGG 723			
Sbjct 15359664		GGAAGTTCTTCAACAGGACCTGCAGGTGCACAGG 15359697			

Range 3: 15368614 to 15368920 (Exon 2)

Alignment statistics for match #3					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
327 bits(177)	4e-88	264/307(86%)	1/307(0%)	Plus/Plus	
Query 718		CACAGGAAACTTTGCCGGCTATAATTGTGGAGACTGCAAGTTTGGCTGGACCGGTCCCA			776
Sbjct 15368614		CACTAGGAAACTTTGCTGGCTATAACTGTGGAGACTGCTGGTTCCGCTGGACTGGCCCTA			15368673
Query 777		ACTGCGAGCGGAAGAAACCACAGTGATTCGGCAGAACATCCATTCCCTTGTAGTCCCTCAGG			836
Sbjct 15368674		ACTGTGATCAGAGGAAACCACCGTTGTCCGGCAGAACATCCATTCCCTGACTCCCGCAGG			15368733
Query 837		AAAGAGAGCAGTTCTTGGGCGCCTTAGATCTCGCGAAGAAGAGAGTACACCCCGACTACG			896
Sbjct 15368734		AGAGGGAGCAGTTCTTGGGTGCCTTAGATCTGGCCAAGAAGACCACACCCCTGACTACG			15368793

```

Query 897      TGATCACCACACAACACTGGCTGGGCTGCTTGGGCCCAATGGAACCCAGCCGAGTTTG 956
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 15368794 TGATCGCCACACAGCACTGGCTGGGCTGCTTGGGCCCAATGGGACCCAGCCACAGATAG 15368853

Query 957      CCAACTGCAGTGTTTATGAatttttttGTGTGGCTCCATTATTATTCTGTTAGAGATACAT 1016
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 15368854 CCAACTGCAGCATTACGATTTTTTGTATGGCTCCATTACTATTCTGTTAGAGACACAT 15368913

Query 1017     TATTAGG 1023
          |||||
Sbjct 15368914 TATTAGG 15368920

```

Range 4: 15395347 to 15395570 (Exon 8)

Alignment statistics for match #4				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
213 bits(115)	1e-53	188/224(84%)	2/224(0%)	Plus/Plus
Query 1801	TCTGC--CAGTTTCAGTTGAAGAACTCCAGGTTGGCCACAACCTCTCTTAGTAGTCATG	1858		
Sbjct 15395347	TCTGCTTCAGTTTCAGCTGAAGAACTCCAAGTTGGACCACAATACTCTCGGTGGTGATG	15395406		
Query 1859	GGAACACTGGTGGCTTTGGTTGGTCTTTTTGTGCTGTTGGCTTTTCTTCAATATAGAAGA	1918		
Sbjct 15395407	GGAACACTTGCAGGCTTGGTTGGTCTTTTTGTGCTGCTGATTTTCCTGCAGTACAGAAGG	15395466		
Query 1919	CTTCGAAAAGGATATACACCCTAATGGAGACACATTTAAGCAGCAAGAGATACACAGAA	1978		
Sbjct 15395467	CTCCGAGAGGATACACACCCTCATGGAACTCATTTAAGCAGCAAGAGATACACAGAA	15395526		
Query 1979	GAAGCCTAGGGTGCTCATGCCTTACCTAAGAGAAGAGGCTGGCC 2022			
Sbjct 15395527	GAAGCTGAGGGAGCTCAGGCCATACCCTAGAGAAGAGGCTGGCC 15395570			

5. BLAST – člověk – činčila

- Query: *Homo sapiens* dopachrome tautomerase (*DCT*), transcript variant 1, mRNA (NM_001922.4)
- Subject: *Chinchila lanigera* predicted dopachrome tautomerase (*Dct*), mRNA (XM_005374234.1)

Pátý alignment srovnává mRNA dopachrom tautomerázy (*DCT*) u člověka č. NM_001922.4 a predikovanou mRNA *Dct* u činčily č. XM_005374234.1. Výsledkem je jedna velká oblast shodná z 86 %, doplněná programem 6 mezerami a je na shodných vláknech (Plus/Plus). Po prostudování se ukázalo, že se jedná o všech 8 po sobě jdoucích exonů, přišemž u prvního exonu chybí počátečních 15 bází, zřejmě z důvodu nízké shody. Mezery jsou vyznačeny šedě a první báze každého exonu je označena zeleně. Koncové báze šedými písmeny znázorňují příslušnost k nekódující oblasti 8. exonu.

Range 1: 16 to 1577

Alignment statistics for match #4					
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1688 bits(914)	0.0	1349/1565(86%)	6/1565(0%)	Plus/Plus
Query	443				502
Sbjct	16				75
Query	503				561
Sbjct	76				134
Query	562				621
Sbjct	135				194
Query	622				681
Sbjct	195				254
Query	682				741
Sbjct	255				314
Query	742				801
Sbjct	315				374
Query	802				861
Sbjct	375				434
Query	862				921
Sbjct	435				494
Query	922				981
Sbjct	495				554
Query	982				1041
Sbjct	555				614
Query	1042				1101
Sbjct	615				674
Query	1102				1161
Sbjct	675				734
Query	1162				1221
Sbjct	735				794
Query	1222				1281
Sbjct	795				854
Query	1282				1341
Sbjct	855				914

6. BLAST – člověk – myš

- Query: *Homo sapiens* dopachrome tautomerase (*DCT*), transcript variant 1, mRNA (NM_001922.4)
- Subject: *Mus musculus* dopachrome tautomerase (*Dct*), mRNA (NM_010024.3)

Poslední alignment porovnává mRNA dopachrom tautomerázy u člověka č. NM_001922.4 a mRNA stejného genu u myši č. NM_010024.3. Stejně jako u předchozích porovnání obou mRNA je i zde výsledkem jedna velká oblast sumarizující 8 exonů a tedy celou kódující oblast obou druhů (shoda z 83 %). Šedými písmeny jsou uvedeny oblasti z nekódujících částí exonů, šedou plochou mezery (celkem 26) a zeleně počáteční báze každého dalšího exonu.

Range 1: 452 to 2029

		Alignment statistics for match #1				
	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1402 bits(759)	0.0	1320/1594(83%)	26/1594(1%)	Plus/Plus	
Query	411	CTCCAATTATAAAGCCATGAGCCCCCTTTGGTGGGGTTTCTGCTCAGTTGCTTGGG	468			
Sbjct	452	CTCCAATTAGAAGGCATG-G-GCCTTGTGGGATGGGGCTTCTGCTGGGTTGTCTGGG	509			
Query	469	CTGCAAAATCCTGC-CAGGAGCCAGGGTCAGTCCCCGAGTCTGCATGACGGTGGACA	527			
Sbjct	510	CTGCGGAATCTGCTCA-GAGCTCGGGCTCAGTTCCCCGAGTCTGCATGACCTGGATG	568			
Query	528	GCCTAGTGAACAAGGAGTGTGCCACGCCTGGGTGCAGAGTCGGCCAATGTCTGTGGCT	587			
Sbjct	569	GCGTGCTGAACAAGGAATGTGCCCGCTCTGGGTCCCGAGGCAACCAACATCTGTGGAT	628			
Query	588	CTC-AGCAAGGCCGGGGCAGTGCACAGAGGTGCGAGCCGACACAAGGCCCTGGAGTGGT	646			
Sbjct	629	TTCTAG-AGGGCAGGGGGCAGTGCAGAGGTGCAAACAGACACCAGACCTGGAGTGGC	687			
Query	647	CCCTACATCCTACGAAACCAGGATGACCGTGAGCTGTGGCCAAGAAAATCTTCCACCGG	706			
Sbjct	688	CCTTATATCCTTCGAAACCAGGATGACCGTGAGCAATGGCCGAGAAAATCTTCAACCGG	747			
Query	707	ACCTGCAAGTGCACAGGAAACTTTGCCGGCTATAATTGTGGAGACTGCAAGTTGGCTGG	766			
Sbjct	748	ACATGCAAATGCACAGGAAACTTTGTGTTATAATTGTGGAGGCTGCAAGTTCGGCTGG	807			
Query	767	ACCGGTCCCAACTGCGAGCGGAAGAAACC-ACCAGTGATTCGGCAGAACATCCATTCCTT	825			
Sbjct	808	ACCGGCCCGACTGTAATCGGAAGAAGCCGGCCA-TCCTAAGACGGAATATCCATTCCTT	866			
Query	826	GAGTCCTCAGGAAAGAGAGCAGTTCTTGGGCGCCTTAGATCTCGGAAGAAGAGAGTACA	885			
Sbjct	867	GACTGCCCAGGAGAGGGAGCAGTTCTTGGGCGCCTTAGACCTGGCCAAGAAGAGTATCCA	926			
Query	886	CCCCGACTACGTGATCACCACACAACACTGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG	945			
Sbjct	927	TCCAGACTACGTGATCACCACGAACACTGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG	986			
Query	946	GCCGAGTTTGCCAACTGCAGTGTATGAttttttGTGTGGCTCCATTATTATTCTGT	1005			
Sbjct	987	GCCCCAGATCGCCAACTGCAGCGTGTATGACTTTTTTGTGTGGCTCCATTATTATTCTGT	1046			

Na závěr byl proveden alignment všech tří mRNA pomocí programu Clustal Omega pro ukázkou podobnosti všech tří zkoumaných druhů savců. Program nevedl přesné číslo shody, ale na základě podobnosti mezi jednotlivými sekvencemi mezi sebou lze říci, že se shodují z 82-86 %. Stejně jako u předchozího vícenásobného alignmentu jsou úplné shody označeny dole hvězdičkou, první báze každého exonu je vyznačena zeleně a v sekvenci myši jsou vyznačeny mutace s vlivem na fenotyp, které jsou uvedeny v literárním přehledu a je u nich známo přesné místo mutace. U člověka nebyl vliv mutací genu *DCT* na fenotyp prokázán a u činčily není gen tak prozkoumán, tudíž tyto dvě sekvence zůstávají bez vyznačení. Vlastní alignment je zobrazen níže. Sekvence člověka a myši se shoduje v celém prvním exonu včetně nekódující části, která je označena šedými písmeny. Od startovacího kodonu kódující části se již shodují všechny tři sekvence a alignment pokračuje všemi 8 exony řazenými po sobě. Šedá písmena na konci alignmentu znamenají oblast nekódující části, ve které se ještě částečně shodují všechny tři sekvence a od určitého místa jen sekvence člověka a myši, ale shoda není nijak významná.

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|           -AACTGAGTTC AAGGCAATTAAGTCAAGAGCTAAGGAGGGAGGAGAGGGTTTAGAAAT
gi|170932474|ref|NM_010024.3|         GAACTGAGTTC AAGGCAATTAAGTCAAGGGCTAGGGAGAGAAGGAGAGGCTTAGAAC
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|      -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|           ACCAGCATAATAAGTAGTATGACTGG-GTGCTCTGTAATAAATAACTCAATTAGACAAAGCC
gi|170932474|ref|NM_010024.3|         AGCAGCATAATAAGCAGTATGGCTGGGACTCTGTAATAAATAACTCAATTAGACAGAGCC
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|      -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|           TGACTTAACGGGGGAAGATGGTGAGAAGCGCTACCCTCATTAATTTGGTTGTTAGAGGC
gi|170932474|ref|NM_010024.3|         TGATTTAACAGGGAAGACTGGCGAGAAGCGCTCCCTCATTAACCT-GATGTTAGAGGA
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|      -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|           GCTTCTAAGGAAATTAAGTCT--GTTAGTTGTTTGAATCACATAAAAATTTGTGTGTCAGC
gi|170932474|ref|NM_010024.3|         GCTTCGGATGAAATTAATCAGTGTAGTTGTTGAGTCACATAAAAATTCGA-----TG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|      -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|           TTCATGTACACATGTGCACACATGTAACCTCTGTGATTCTTGTGGGTATTTTTTAAAG--
gi|170932474|ref|NM_010024.3|         TGCGTGTACACATGTGCACACGTGTAGGCTCTGTGATTTAGGTGGGAATTTTGTAGAGGAG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|      -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|           AAGAAAGGAATAGAAA-----GCAAAGAAAATAAAA-----AATACTGA
gi|170932474|ref|NM_010024.3|         AGGAAAGGGCTAGAACTAAACCCAAAGAAAAGGAAAGAGAAGAGGAAAGGAAAGAAA
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|      -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|           AAAGAAAAGACTG-----AAAGAGTAGAAGATAAGGAGA
gi|170932474|ref|NM_010024.3|         AAAGAAAAGGCAATTTGAGTGAGTAAAGGTTCCAGAACTCAGGAGTGAAGACAGGAGT
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|      -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|           AAAGTACGACAGAGACAAGGAAAGTAAGAGAGAGAGAGCTCTCCCAATTATAAAGCC
gi|170932474|ref|NM_010024.3|         AAAGTCAGACAGAAACCAGTGGGACG---CCGGCCAGGCTCCCAATTAAGAAGGCC
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|      -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|           TGAGCCCCCTTGGTGGGGTTTCTGCTCAGTTGCTTGGGCTGCAAAATCCTGCCAGGAG
gi|170932474|ref|NM_010024.3|         TGGCCCTTGTGGGATGGGGCTTCTGCTGGGTGCTGGGCTGCGGAATCTGCTCAGAG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|         TGC GTTCTGCTTGGGGCTTCTGCTCGGCTGCTGGGCTGAGGATAAAGGAGTGTGAG
** *      *      ***** ***** . * * ***** . . . ** * . **

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|           CCCAGGGTCAGTTCCCCGAGTCTGCATGACGGTGACAGCCTAGTGAACAAGGAGTGCT
gi|170932474|ref|NM_010024.3|         CTCGGGCTCAGTTCCCCGAGTCTGCATGACCTTGGATGGGCTGCTGAACAAGGAAATGCT
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|         CCTGGGCCAGTTCGCCAGGCTTCATGACCTTAGACAGCTGAGGAAAAGGAGTGTGCT
* . ** ***** * . . ***** * . ** . ** * . ***** . **

```

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| GCCCACGCCTGGGTGCAGAGTCGGCCAATGTCTGTGGCTCTCAGCAAGGCCGGGGGCAGT
gi|170932474|ref|NM_010024.3| GCCCGCCTCTGGGTCCCGAGGCAACCAACATCTGTGGATTTCTAGAGGGCAGGGGGCAGT
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| GCCCGGCCCTGGGTGTGGCGCCGGCAATGTCTGTGGCTCCCAGGAAAGCCGGGGCAGT
.** *.* * .*** .*****.* *:.*.****.****.****

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| GCACAGAGGTGCGAGCCGACACAAGGCCCTGGAGTGGTCCCTACATCTACGAAACCAGG
gi|170932474|ref|NM_010024.3| GCGCAGAGGTGCAACACAGACACCAGACCTGGAGTGGCCCTTATATCTTCGAAACCAGG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| GCTCAGAGGCGGAGCAGACACCAGGCCCTGGAGTGGCCCTTACGTCCTCGCAACCAGG
** ***** **.*.*****.*.*****.***** ** ** .**** *****.* **

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| ATGACCGTGAAGTGTGGCCAAGAAAATCTTCCACCGACCTGCAAGTGCACAGAAACT
gi|170932474|ref|NM_010024.3| ATGACCGTGAAGTGTGGCCAAGAAAATCTTCAACCGACATGCAAAATGCACAGAAACT
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| ATGATCGCAGCGGTGGCCAAGAAATCTTCAACAGGACCTGCAGTGCACAGAAACT
*** ** * ** .*****.*.*****.*.*****.*.*****.*.*****.*.*****
TTGCCGCTATAATTGTGGAGACTGCAAGTTTGGCTGGACCGGTCCTCAACTGCGAGCGGA
TTGCTGGTTATAATTGTGGAGGCTGCAAGTTCGGCTGGACCGGCCCGGACTGTAATCGGA
TTGCTGGCTATAACTGTGGAGACTGCTGGTTCGGCTGGACTGGCCCTAAGTGTGATCAGCA
**** * ** ***** .*****.*.*****.***** ** ** .**** * * **

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| AGAAACCACAGTATTTCGGCAGAACATCCATTCCCTGAGTCCCTCAGGAAAGAGAGCAGT
gi|170932474|ref|NM_010024.3| AGAAGCGGCCATCTAAGACGGAATATCCATTCCCTGACTGCCAGGAGAGGGAGCAGT
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| GGAACCACCGTGTGTCGGCAGAACATCCATTCCCTGACTCCCGAGGAGAGGGAGCAGT
.***.*. *.* *.*.*** ***** ** * * .****.*.*****

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| TCTTGGCGCCTTAGACTCTCGCAAGAAGAGAGTACCCCCGACTACGTGATCACCACAC
gi|170932474|ref|NM_010024.3| TCTTGGCGCCTTAGACTCTCGCAAGAAGAGATATCCATCCAGACTACGTGATCACCACGC
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| TCCTGGGTGCTTAGACTCTGGCCAAGAAGACCACACCCCTGACTACGTGATCACCACAC
** ***** ** * * .***** . ** * * .*****.*****.****.*

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| AACACTGGCTGGGCTGCTTGGGCCAATGGAACCCAGCCGAGTTTCCAAGTGCAGTG
gi|170932474|ref|NM_010024.3| AACACTGGCTGGGCTGCTCGGACCCACGGGACCCACCCAGATCCCAACTGCAGCG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| AGCACTGGCTGGGCTGCTTGGGCCAATGGAACCCAGCCACAGATAGCCAACTGCAGCA
*.***** ***** **.*.*****.*.*****.***** **.* ***** .

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| TTTATGATTTTTTTGTGTGGCTCCATTATTATTCTGTAGAGATACATTATTAGTACCAG
gi|170932474|ref|NM_010024.3| TGTATGACTTTTTTTGTGTGGCTCCATTATTATTCTGTTCGAGACACATTATTAGTACCAG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| TTTACGATTTTTTTGTATGGCTCCATTACTATTCTGTAGAGACACATTATTAGTACCAG
* * * * .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| GACGCCCTACAGGGCCATAGATTCTCACATCAAGGACCTGCATTTGTTACCTGGCAC
gi|170932474|ref|NM_010024.3| GACGCCCTATAAGGCCATTGATTCTCTCACCAAGGGCCTGCCTTTGTTCACGTGGCACA
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| GACGCCCTTCAAGGCCATAGATTCTCACACCAAGGACCTGCCTTTGTGACCTGGCATA
*****.*.*****.*****.*.*****.***** ***** ** ***** .

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| GGTACCATTGTGTGTCTGGAAAGAGATCCTCAGTACTCATTGGCAATGAGTCTTTTG
gi|170932474|ref|NM_010024.3| GGTACCATTGTGTGTGGCTGGAAAGAGAACTCCAGAGACTCACTGGCAATGAGTCTTTTG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| GATACCATTATTGTGTGGCTGGAAAGAGACTCCTCAGCGCTCACTGGCAATGAGTCTTCG
* .***** * .***** *****.***** ***** .**** * * .***** ** *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| CTTTGCCTACTGGAATTTGCCACTGGGAGAACGAGTGTGATGTGTGACAGACCAGC
gi|170932474|ref|NM_010024.3| CGTTGCCCTACTGGAATTTGCAACCGGAAAGAACGAGTGTGAGTGTGACAGACCAGC
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| CTTTGCCTACTGGAATTTGCCACTGGGAGAACGAGTGTGATGTGTGACAGACCAGC
* .*****.*****.*****.*.*****.*****.*****.*****.*****

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| TGTGTGGGCGAGCAGACAGACATCCGACTCTGATTAGTCCGAACTCAAGATTCTCCA
gi|170932474|ref|NM_010024.3| TGCTTGGAGCAGCAAGACAAGATGACCAACGCTGATTAGTCCGAACTCGAGATTCTCTA
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| TTCTCGGGCAGCAGACAAGATGACCAACTCTGATTAGTCCGAACTCAAGATTCTCCA
* * * .***** ***** ** * * .*****.*****.*****.***** *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| GCTGGAAACTGTCTGTGATAGCTGGATGACTACAACCCTGGTCACTTGTGCAATG
gi|170932474|ref|NM_010024.3| CCTGGGAGATTGTGTGCGACAGCTGGATGACTACAACCAGCGGTCACTGTGTAATG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| GCTGGAAATTTGTCTGTGACAGCTGGATGACTACAATCACCAGTCTGTGTAATG
*****.*.*** ** * * .*****.*****.*.*****.***** *****

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| GAACCTATGAAGTTTGTGAGAAGAAATCAAATGGGAAGAAACAGCATGAAATTGCCAA
gi|170932474|ref|NM_010024.3| GAACCTATGAAGTTTGTGAGAAGAAACAAGTAGGCAGAAATAATGAGAACTGCCAA
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| GAACCTATGAAGTTTGTGAGAAGAAATCAAGTGGGAAGAAATAGTGAAGATTGCCAA
**** *****.*****.*****.*.*****.*.*****.***** *****

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| CCTTAAAGACATACGAGATTGCCTGTCTCTCCAGAAGTTTGACAATCTCCTTCTTCC
gi|170932474|ref|NM_010024.3| CCTTAAAAATGTGCAAGATTGCCTGTCTCTCCAGAAGTTTGACAGCCCTCCTTCTTCC
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| CCTTAAAAACGTACAAGATTGTCTGTCCCTCCAGAAGTTTGACAACCTCCTTCTTCC
*****.*.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| AGAACTCTACCTTCAGTTTCAGCAATGCCTTGGAAAGGTTTGATAAAGCAGATGGGACCTC
gi|170932474|ref|NM_010024.3| AGAACTCTACCTTCAGTTTCAGCAATGCCTTGGAAAGGTTTGATAAAGCAGATGGGAACTC
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| AGAACTCTACCTTCAGTTTCAGCAATGCCTTGGAAAGGTTTGATAAAGCAGATGGGTTGC
*****.***** *****.***** *****.*****.***** **.* *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4| TGGATTCTCAAGTATGAGCCTTCATAATTGGTTCATCTCTCTGACGGGACAAACG
gi|170932474|ref|NM_010024.3| TGGACTCTCAAGTATGAGCCTTCATAACTTGGCTCACTCTCTCTGAAATGGGACCAATG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1| TGGACTCTCAAGTGGGCAACTTCATAACTTGGTTCACCTCTCTCTGACGGGACAAAGT
**** * ** .*** * .***** ***** ** * * .*****.*****.*****.* *

```

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      CTTTGCCACATTCAGCCGCAATGATCCATTTTGTGTTCTTCATTCCTTACTGATG
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      CCTTGCCACACTCAGCAGCCAACGACCCCTGTGTTGTGTTCCCTCCACTCTTTTACAGACG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    CTCTGCCACATTCAGCCGCAATGATCCTGTTTTGTGTTCCCTTCACCTCCCTCACTGATG
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      CCATCTTTGATGAGTGGATGAAAAGATTTAATCCTCCTGCAGATGCCTGGCCTCAGGAGC
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      CCATCTTTGATGAGTGGCTGAAGAGAAACAACCCCTCCACAGATGCCTGGCCTCAGGAAC
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    GCATCTTTGATGAGTGGATGAAAAGATACAAGCCTGCTGCAGATGCCTGGCCTGAGGAGT
*****.****.***.: * * * * * .***** * * * *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      TGGCCCTATATGGTCACAATCGGATGTACAACATGGTTCCTTTCTTCCCTCCAGTGACTA
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      TGGCACCCTATGGTCACAACCGAATGTATAACATGGTCCCTTCTTCCCACCGGTGACTA
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    TGGCACCCTATCGGTACAATCGAATGTATAACATGGTCCCTTCTTCCCTCCAGTGACTA
****.* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      ATGAAGAACTCTTTTAACTCAGACCAACTGGCTACAGCTATGCCATCGATGCTCCAG
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      ATGAGGAGCTCTTCTAACCAGCAGAGCAACTTGGCTACAATACGCCGTTGATCTGTCA-
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    ATGAGGAACCTTTCTAACTGCAGACCAACTGGCTACATTTATGCTTATGATTTGGCCAG
****.* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      TTCAGTGAAGAACTCCAGGTTGGCCACAACCTCTCTTAGTAGTCATGGGAACACTGG
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      ----GAGGAAGAAGCTCCAGTTTGGTCCACAACCTCTCTCAGTGGTCATTGGAATCCTGG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    TTCAGCTGAAGAACTCCAAGTTGGACCACAATACTCTCGGTGGTGTATGGGAACACTGG
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      TGGCTTTGGTGGTCTTTTGTGCTGTTGGCTTTTCTTCAATATAGAAGACTTCGAAAAG
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      GAGCTTTCGCTTGTCTTGGGGTGTCTGGCTTTTCTTCAATACAGAAGGCTTCGCAAAG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    CGGCTTGGTGGTCTTTTGTGCTGCTGATTTTCTCAGTACAGAAGGCTCCGAGAG
.* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      GATATACACCCTAATGGAGACACATTTAAGCAGCAAGAGATACACAGAAGAAGCCTAGG
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      GCTATGCCCTTAAATGGAGACAGGCTCAGCAGCAAGAGATACACGAGGAAGCCTAGG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    GATACACACCCTCATGGAACTCATTTAAGCAGCAAGAGATACACAGAAGAAGCTGAGG
*.* * . * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      GTGCTCATGCCTTACCTAAGA---GAAGAGGCTGGCCAAGCCACAGTTCTGACGCTGACA
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      ATGCTCTACCTGGCCTGACCTGGGTAGTAACATAATTAC-----ACCGTCGCT----
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    GAGCTCAGGCCATAACCTAG-----
.:****. .*: . * *

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      ATAAAGGAACATACTCCTCACTGTTCTCTTGAG---TTGAAGATCTTTGACATAGGTT
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      -----CATCTTGAGACAGGTGGAACCTCTCAGCGTGTGCT
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      CTTTATAGTATGATGATGA---TCTCATTGAGAAGATGCTTAGCTGTAGTTCCCGCTTTCG
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      CTTTATAGTATGATGATGATGATGCCTTAGCAATGACAATTAATCTCTAGTTGCTGCTTTCG
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      TTGCTTGTTTAACAACCCAACTAAAGTGTGCTTGGGCTACCTCTACCTTCAAATAAAGAT
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      TTAT-----TGTACACAGACAAAATGCTTGGGTCACTCACCCAGGTCAAAGTAAGGT
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      AGACCTGACAATTTGTGATATCTAATAATAACCCCCCCCAATATTGATTAAGCCTCCT
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      GTGGCTAGTTATATGTGACCTT-----TGATTAAGCCTCCT
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    -----

gi|1015809739|ref|NM_001922.4|      CCTTTTCTGAAAGCATTTAAAAAACAACAAAAAATCCCAAAACATTGATCCAGGGGAG
gi|170932474|ref|NM_010024.3|      TATA--TTGAAAAA-----AAAAAACAACAAAAA-----
gi|533117516|ref|XM_005374234.1|    -----

```

6 ZÁVĚR

Literární přehled shrnuje informace z různých zdrojů ohledně molekulárně gentické podstaty zbarvení srsti u zvířat, pigmentace kůže a barvy vlasů u člověka a přináší tak přehled všeho co se týká této problematiky. Byl popsán molekulárně genetický základ zbarvení a pigmentace, vyhledány zdroje o genech ovlivňujících zbarvení a o mutacích, které se vyskytují u člověka a myši. Uvádí také shrnutí problematiky genetických mutací a u jednotlivých genů, které jsou popisovány, udává známé mutace, které mají vliv na fenotyp. Na základě těchto informací a údajů z databází NCBI, Ensembl, MGI a dalších je pak v experimentální části práce uvedeno porovnání vybraných genů *TYR* a *DCT* u tří zkoumaných druhů savců (člověk, myš a činčila vlnatá), ke kterým je vztažen i literární přehled.

Co se týká porovnání sekvencí genu *TYR*, tak ze všech porovnávaných alignmentů lze vyvodit konkrétní tvrzení, a sice že při počátečním kontrolním srovnání predikované mRNA a celogenomového skenu ChiLan1.0 scaffold00013 činčily vlnaté u genu *Tyr* bylo výsledkem pět 100% shodných úseků. Tento výsledek potvrdil, že *Tyr* u činčily skutečně obsahuje pět exonů, jak uvádí databáze NCBI. Dále při srovnání predikované mRNA *Tyr* u činčily a kompletní kódující sekvence *Tyr* u myši byl výsledkem jeden shodný úsek, který po prozkoumání spojoval všech pět exonů u obou druhů. Lze tedy říci, že myši a činčilí kódující sekvence genu *Tyr* je shodná z 83 %. Z porovnání sekvencí genomu člověka a činčily, resp. jejich mRNA, lze vyvodit podobný závěr, tedy že se shodují ve všech pěti exonech, a sice z 85 %. Pro kontrolu bylo provedeno i porovnání sekvencí genu *TYR* člověka a myši a výsledkem byla opět shoda v pěti exonech, tedy v kódující oblasti genu, tentokrát z 84 %. Lze tedy vyvodit závěr, že sekvence genů *TYR* všech tří zkoumaných druhů savců (*Homo sapiens*, *Mus musculus* a *Chinchilla lanigera*) jsou si velice podobné.

Alignmenty genu *DCT/TYRP2* byly prováděny na stejném systematickém principu jako u genu *TYR* v kapitole 5.1. Nejprve byl porovnán úsek celogenomového skenu činčily s pravděpodobným výskytem sekvence s predikovanou mRNA *Dct*. Porovnání potvrdilo existenci 8 exonů a každý byl uveden v příslušném výsledku (Range 1-8). Alignment mRNA *Dct* u myši a úseku celogenomového skenu činčily měl za výsledek pouze jeden krátký úsek shodný z 90 % s exonem 5 u myši. Proč program nenašel i další exony, není jasné, protože v dalším porovnání mRNA myši s predikovanou

mRNA činčily byl výsledkem jeden shodný úsek, který sumarizoval všech 8 exonů. Bylo tedy zjištěno, že kódující oblast genů *Dct* je u myši a činčily shodná z 82 %. Dále byly porovnávány sekvence dopachrom tautomerázy u činčily a člověka. Při porovnání mRNA člověka a úseku celogenomového skenu činčily s pravděpodobným výskytem sekvence *Dct* byly výsledkem čtyři úseky. Podobně jako v předchozím alignmentu nebyly nalezeny všechny exony, opět z neznámého důvodu. U nejdelšího shodného úseku tohoto alignmentu bylo zjištěno, že ze 74 % odpovídá velice dlouhé části nekódující oblasti exonu 8 u člověka. Není tedy důležitý a i kvůli nízké shodě není v experimentální části přímo vyobrazen. Další tři úseky odpovídaly exonu 1, 2 a 8 u člověka. Porovnání mRNA *DCT* člověka a predikované mRNA *Dct* u činčily prokázalo shodu v kódující oblasti, protože výsledkem byl opět jeden úsek sumarizující všech 8 exonů po sobě a shoda kódující oblasti byla 86 %. Závěrečné porovnání sekvencí mRNA *DCT* člověka a myši prokázalo stejný výsledek, tentokrát s 83% shodou.

Pro názornou ukázkou podobnosti všech tří sekvencí mRNA člověka, myši a činčily u obou genů *TYR* i *DCT* byl proveden společný alignment pomocí programu Clustal Omega. Neuvádí procenticky, na kolik jsou si sekvence podobné, ale na základě alignmentů z BLAST lze usuzovat, že u genu *TYR* bude podobnost v rozmezí 83-85 % a u genu *DCT* 82-86 %. Fylogenetický strom u obou výstupů experimentální části práce není potřeba uvádět, protože je vidět, že jsou si všechny tři druhy ve zkoumaných genech velmi blízké a nebyly by znát velké rozdíly.

Jedním z cílů práce bylo původně i nalezení konkrétních mutací u činčil na základě homologie se sekvencemi myši a člověka, ale ukázalo se, že genom činčily ještě není natolik exaktně prostudovaný, aby bylo možné pomocí nástrojů použitých v této práci provést analýzu s relevantními výsledky. Tato analýza společně s navržením primerů, experimentálním ověřením výsledků na vzorcích z živých zvířat a podrobná analýza a studie výstupů je vhodným tématem pro pokračující dizertační nebo jinou diplomovou práci.

7 ZDROJE

- ALDERTON D., 2011: *Zvířata: velká ilustrovaná encyklopedie*. Praha: Svojtka & Co., 448 s. ISBN 978-80-256-0514-1.
- BEERMANN F., ORLOW S. J. a LAMOREUX M. L., 2004: The Tyr (albino) locus of the laboratory mouse. *Mammalian Genome*, 15(10): 749-758. DOI: 10.1007/s00335-004-4002-8
- BENNETT, D. C. a LAMOREUX, M. L., 2003: The Color Loci of Mice - A Genetic Century. *Pigment Cell Research*, 16(4): 333-344. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2003.00067.x
- BENEŠOVSKÁ A., 2008: Barvy činčil. In: CHS Mazlíčci z Brna [online]. [vid. 2014-04-04]. Dostupné z: <http://mimazlicci.blog.cz/0809/barvy-cincilek>
- BLACK I., REEVE E. C. (eds.), 2001: *Encyclopedia of genetics*. London: Fitzroy Dearborn Publishers, 952 s. ISBN 1-884964-34-6.
- BROOKER, R. J., 2012: *Genetics: analysis & principles*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 761 s. ISBN 0073525286.
- CATANIA A., 2010: *Melanocortins: multiple actions and therapeutic potential*. Austin, Tex.: Landes Bioscience, 153 s. ISBN 1441963537.
- CHINCHILLA CHRONICLES, 2016: Chinchilla Genetics. In: Chinchilla Chronicles [online]. Blackrock, UK: Chinchilla Chronicles Website. Stránka naposledy edit. 2016. [vid. 2016-02-26]. Dostupné z: http://www.chinchillachronicles.com/chinchilla_genetics.html
- CIESLAK M., REISSMANN M., HOFREITER M. a LUDWIG A., 2011: Colours of domestication. *Biological Reviews*, 86(4): 885-899. DOI: 10.1111/j.1469-185x.2011.00177.x
- CIVÁŇOVÁ K., KNOLL A., ROHRER G. A. a ČEPIKA S., 2004: Linkage mapping of the MC3R gene to porcine chromosome 17. *Animal Genetics*, 35(6): 467-469. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2004.01191.x
- COSTIN G. E., VALENCIA J. C., WAKAMATSU K. *et al.*, 2005: Mutations in dopachrome tautomerase (Dct) affect eumelanin/pheomelanin synthesis, but do not affect intracellular trafficking of the mutant protein. *Biochemical Journal*, 391(2): 249-259. DOI: 10.1042/BJ20042070

- CRAIG J. a WONG N. C., 2011: *Epigenetics: a reference manual*. Norfolk: Caister Academic Press, 449 s. ISBN 1904455883.
- DESSINIOTI C., ANTONIOU C., KATSAMBAS A. a STRATIGOS A. J., 2011: Melanocortin 1 Receptor Variants: Functional Role and Pigmentary Associations. *Photochemistry and Photobiology*, 87(5), 978-987. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.00970.x
- DONOHOU P. A., 2007: *Energy Metabolism and Obesity: Research and Clinical Applications*. Totowa, N.J: Springer Science & Business Media, 314 s. ISBN 9781603271394.
- FRIEDBERG E. C., WALKER G. C., SIEDE W., WOOD R. D., SCHULZ R. A. a ELLENBERGER T., 2005: *DNA repair and mutagenesis*. 2nd ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 1118 p. ISBN 9781555813192.
- GONÇALVES, G. L., PAIXÃO-CÔRTEZ V. R. a FREITAS T. R. O., 2013: Molecular evolution of the melanocortin 1-receptor pigmentation gene in rodents. *Molecular and Genetics Research*, 12(3): 3230-3245. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2013>
- GRIFFITHS A. J. F., MILLER J. H., SUZUKI D. T., LEWONTIN R. C., GELBART W. M., 2000: *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th ed. New York: W. H. Freeman, 860 s. ISBN 10: 0-7167-3520-2.
- HARRIS M. C. a SWINNEY N. J., 2011: *Koně: původ a vlastnosti 100 plemen koní z celého světa*. Praha: Svojtka & Co., 240 s. ISBN 978-80-256-0470-0.
- HEADON D., 2015: Morphological Mutations: Lessons from the Cockscomb. *PLoS Genetics*, 11(3): e1004979. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004979
- HEARING, V. J., 2000: The Melanosome: The Perfect Model for Cellular Responses to the Environment. *Pigment Cell Research*, 13(8): 23-34. DOI: 10.1034/j.1600-0749.13.s8.7.x
- HOMOLKOVÁ D., 2014: Ústní sdělení.
- ITO S. a WAKAMATSU K., 2011: Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Research*, 24(1): 63-74. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2010.00755.x
- JAENISH R. a BIRD A., 2003: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33(1): 245-254. DOI: 10.1038/ng1089

JEANTEUR P., 2005: *Epigenetics and chromatin*. New York: Springer, 266 s. ISBN 3540233725.

KOVALCHUK I. a KOVALCHUK O., 2012: *Epigenetics in health and disease*. Upper Saddle River, N.J.: FT Press, 598 s. ISBN 013259708x.

KUCHYNKA P., 2007: *Oční lékařství*. Praha: Grada, 768 s. ISBN 978-80-247-1163-8.

LAMOREUX M. L., WAKAMATSU K. a ITO S., 2001: Interaction of Major Coat Color Gene Functions in Mice as Studied by Chemical Analysis of Eumelanin and Pheomelanin. *Pigment cell and melanoma research*, 14 (1): 23-31.

DOI: 10.1034/j.1600-0749.2001.140105.x

LI W., COWLEY A., ULUDAG M., Gur T., MCWILLIAM H., Squizzato S., PARK Y. M., BUSO N. a LOPEZ R., 2015: The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic acids research*, 43(W1): W580-4. DOI: 10.1093/nar/gkv279

LLEWELLYNOVÁ C., 2011: *Predátoři: nelítostné šelmy, jedovatí plazi, dravé ryby*. 2nd ed. Praha: Fragment, 48 s. ISBN 978-80-253-1338-1.

MGI, 2016: Dct, Mammalian Phenotype annotations related to pigmentation. In: Mouse Genome Informatics [online]. The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. Stránka naposledy edit. 19. 4. 2016. [vid. 2016-04-26]. Dostupné z:

<http://www.informatics.jax.org/diseasePortal/sgCell?genes=MGI:102563&phenotypes=MP:0001186&termHeader=pigmentation>

MILLER T., 2010: Chinchilla Genetics. In: The Chinchilla Source [online]. New Jersey, [vid. 2015-11-12]. Dostupné z:

<http://www.chinchillasource.com/chinchillagenetics.html>

MONTOLIU L., GRØNSKOV K., WEI A.-H. *et al.*, 2014: Increasing the complexity: new genes and new types of albinism. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 27(1): 11-18.

DOI: 10.1111/pcmr.12167

NCBI, 2015a: TYR tyrosinase [Homo sapiens (human)]. In: National Center for Biotechnology Information [online]. U. S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD 20894. Stránka naposledy edit. 9. 12. 2015. [vid. 2015-12-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7299>

NCBI, 2015b: Tyr tyrosinase [Mus musculus (house mouse)]. In: National Center for Biotechnology Information [online]. U. S. National Library of Medicine, 8600

Rockville Pike, Bethesda MD 20894. Stránka naposledy edit. 15. 11. 2015. [vid. 2015-12-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22173>

NCBI, 2015c: Tyr tyrosinase [*Chinchilla lanigera* (long-tailed chinchilla)]. In: National Center for Biotechnology Information [online]. U. S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD 20894. Stránka naposledy edit. 15. 11. 2015. [vid. 2015-12-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/102005248>

NCBI, 2016a: Cysteinyldopa. In: PubChem Compound Database [online]. National Center for Biotechnology Information, 2016. Stránka naposledy edit. 27. 2. 2016. [vid. 2016-02-29]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/29719#section=Top>

NCBI, 2016b: TYR - tyrosinase. In: Genetics Home Reference [online]. U. S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. Stránka naposledy edit. 7. 3. 2016. [vid. 2015-3-14]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TYR>

NCBI, 2016c: Dct dopachrome tautomerase [*Mus musculus* (house mouse)]. In: National Center for Biotechnology Information [online]. U. S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. Stránka naposledy edit. 26. 1. 2016. [vid. 2016-02-03]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13190>

NCBI, 2016d: Pmel premelanosome protein [*Mus musculus* (house mouse)]. In: National Center for Biotechnology Information [online]. U. S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. Stránka naposledy edit. 14. 2. 2016. [vid. 2016-02-15]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20431>

NCBI, 2016e: A nonagouti [*Mus musculus* (house mouse)]. In: National Center for Biotechnology Information [online]. U. S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. Stránka naposledy edit. 7. 2. 2016. [vid. 2016-02-15]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50518>

NOVOSELOVA T. V., JACKSON D., CAMPBELL D. C., CLARK A. J. L. a CHAN L. F., 2013: Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal gland physiology and beyond. *Journal of Endocrinology*, 217(1), R1-R11. DOI: 10.1530/JOE-12-0501

NOWACKA-WOSZUK, J., SKORCZYK A., FISIKOWSKI K., SZYDLOWSKI M. a SWITONSKI M., 2012: Polymorphic variants within a stative upstream open fading frame of the MC4R gene do not affect body weight of farmed red foxes. *Animal Genetics*, 43(4): 480-481. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2011.02279.x

- OETTING B., 2011: Summary of the cloned mouse color genes, human and zebrafish homologues. In: Color Genes [online]. International Federation of Pigment Cell Societies [vid. 2016-2-29]. Dostupné z: <http://www.espcr.org/micemut/>
- OETTING W. S. a KING R. A., 1999: Molecular basis of albinism: Mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Human Mutation*, 13(2): 99–115. DOI:10.1002/(SICI)1098-1004(1999)13:2<99::AID-HUMU2>3.0.CO;2-C
- REISSMANN M. a LUDWIG A., 2013: Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24(6-7): 576-586. DOI: 10.1016/j.semcd.2013.03.014
- RÉDEI G. P., 2008: *Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics and informatics*. 3rd ed. New York: Springer, 1134 s. ISBN 9781402067549.
- ROSYPAL S., 2000: Úvod do molekulární biologie: Molekulární biologie virů, mutageneze, kancerogeneze a rekombinace, opravy poškozené DNA. 3rd ed. Brno: Stanislav Rosypal, 297 s. ISBN 8090256228.
- ROSYPAL S., ROSYPALOVÁ A. a VONDREJS V., 1989: *Molekulární genetika 2*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 351 s. ISBN 8004231179.
- RŮŽIČKOVÁ JAREŠOVÁ L., 2013: Melanocyty, cévní a nervový systém v kůži, kapilaroskopie. *Dermatologie pro praxi*, 7(1): 36-38. ISSN: 1802-2960
- SCHWAB M., 2011: *Encyclopedia of cancer*. 3rd ed. New York: Springer, 3984 s. ISBN 9783642164835.
- SLOMINSKI A., TOBIN D. J., SHIBAHARA S. a WORTSMAN J., 2004: Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiological Reviews*, 84(4): 1155-1228. DOI: 10.1152/physrev.00044.2003
- SNUSTAD D., SIMMONS M. J., 2009: *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 871 s. ISBN 9788021048522.
- SOLANO F., 2014: Melanins: Skin Pigments and Much More - Types, Structural Models, Biological Functions and Formation Routes. *New Journal of Science*, 2014, Article ID 498276: 1-28. DOI: 10.1155/2014/498276
- SOLANO, F., MARTINEZ-ESPARZA M., JIMENEZ-CERVANTES C., HILL S. P., LOZANO J. A. a GARCIA-BORRÓN J. C., 2000: New Insights on the Structure of the Mouse Silver

- Locus and on the Function of the Silver Protein. *Pigment Cell Research*, 13(8): 118-124. DOI: 10.1111/j.0893-5785.2000.130821.x
- STURM, R. A., 2009: Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Human Molecular Genetics*, 18(R1): R9-R17. DOI: 10.1093/hmg/ddp003
- SWITONSKI M., MANKOWSKA M. a SALAMON S., 2013: Family of melanocortin receptor (MCR) genes in mammals - mutations, polymorphisms and phenotypic effects. *Journal of Applied Genetics*, 54(4): 461-472. DOI: 10.1007/s13353-013-0163-z
- TOST J., 2008: *Epigenetics*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 404 s. ISBN 9781904455233.
- UCMP, 2015: Jean-Baptiste Lamarck (1744-1829). In: UCMP [online]. University of California Museum of Paleontology. [vid. 2015-10-13]. Dostupné z: <http://www.ucmp.berkeley.edu/history/lamarck.html>
- VONDRÁČKOVÁ Ž., 2016: Ústní sdělení.
- WEAVER R. F. a HEDRICK P. W., 1997: *Genetics*. 3rd ed. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers, 638 s. ISBN 0-697-16000-9.
- YAMAMURO Y. a SHIRAISHI A., 2011: Genotype-dependent participation of coat color gene loci in the behavioral traits of laboratory mice. *Behavioral Processes*, 88(2): 81-87. DOI: 10.1016/j.beproc.2011.08.004
- YANG Y., 2011: Structure, function and regulativ of the melanocortin receptors. *European Journal of Pharmacology*, 660(1): 125-130. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.12.020
- ZEIGLER D., 2014: *Evolution: components and mechanisms*. Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 193 s. ISBN 0128003480.
- ZHANG Z., SCHWARTZ S., WAGNER L. a MILLER W., 2000: A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2): 203-14. DOI: 10.1089/10665270050081478

PŘÍLOHY

Seznam příloh

Příloha č. 1: Přehled mutací <i>TYR</i> spojené s <i>OCA1</i>	2
Příloha č. 2: Přehled mutací souvisejících se zbarvením srsti a jejich pleiotropní efekty	5
Příloha č. 3: Vybrané mutantní alely u klonovaných myší s popisem funkcí v pigmentaci a dalších změn v organismu spojených s mutacemi.	7
Příloha č. 4: Vybrané mutantní alely u neklonovaných myší s popisem funkcí v pigmentaci a dalších změn v organismu spojených s mutacemi.	8

Příloha č. 1: Přehled mutací *TYR* spojené s OCA1

Název	Změna nukleotidu	Vliv na kódující sekvenci	Exon	Typ	Etnikum
M1V	A→G na 1	Met→Val na 1	EX1	OCA1A	?
M1T	T→C na 2	Met→Thr na 1	EX1	OCA1A	kavkazské
25delC	Delece C na 25	Posunutí	EX1	OCA1A	kavkazské
53delG	Delece G na 53	Posunutí	EX1	OCA1A	kavkazské
H19Q	T→A na 57	His→Gln na 19	EX1	OCA1A	kavkazské
P21S	C→T na 61	Pro→Ser na 21	EX1	OCA1A	kavkazské
D42G	A→G na 125	Asp→Gly na 42	EX1	OCA1A	kavkazské
G47D	G→A at 140	Gly→Asp na 47	EX1	OCA1A	kavkazské, hispánské, maroťtí Židé, Kanárské ostrovy
S50X	C→G na 149	Ser→Stop na 50	EX1	OCA1A	arabští křesťané
R52I	G→T na 155	Arg→Ile na 52	EX1	OCA1A	korejské
C55Y	G→A na 164	Cys→Tyr na 55	EX1	OCA1A	kavkazské
223delG	Delece G na 223	Posunutí	EX1	OCA1A	kavkazské
R77W	C→T na 229	Arg→Trp na 77	EX1	OCA1B	kavkazské
R77Q	G→A na 230	Arg→Gln na 77	EX1	OCA1A	japonské
E78X	G→T na 232	Glu→Stop na 78	EX1	OCA1A	kavkazské
W80R	T→C na 238	Trp→Arg na 80	EX1	OCA1A	kavkazské
W80X	G→A na 240	Trp→Stop na 80	EX1	OCA1A	kavkazské
P81L	C→T na 242	Pro→Leu na 81	EX1	OCA1A	kavkazské
C89R	T→C na 265	Cys→Arg na 89	EX1	OCA1A	afroamerické
286insA	Inzerce A za 286	Posunutí	EX1	OCA1A	kavkazské
G97R	G→A na 289	Gly→Arg na 97	EX1	OCA1A	kavkazské
344delGA	Delece GA na 344	Posunutí	EX1	OCA1A	pákistánské
R116X	C→T na 346	Arg→Stop na 116	EX1	OCA1A	kavkazské
P152S	C→T na 454	Pro→Ser na 152	EX1	OCA1A	Židé Aškenázi
F176I	T→A na 526	Phe→Ile na 176	EX1	OCA1A	kavkazské
W178X	G→A na 533	Trp→Stop at 178	EX1	OCA1A	afghánské
572delG	Delece G na 572	Posunutí	EX1	OCA1A	kavkazské
A206T	G→A na 619	Ala→Thr na 206	EX1	OCA1A	kavkazské
L216M	T→A na 646	Leu→Met na 216	EX1	OCA1A	Kanárské ostrovy
649delC	Delece C na 649	Posunutí	EX1	OCA1A	Židé Aškenázi, sefardští Židé, tuniské
R217G	C→G na 649	Arg→Gly na 217	EX1	OCA1A	kavkazské
R217W	C→T na 649	Arg→Trp na 217	EX1	OCA1A	kavkazské

Název	Změna nukleotidu, pozice	Vliv na kódující sekvenci	Exon	Typ	Etnikum
R217Q	G→A na 650	Arg→Gln na 217	EX1	OCA1A	kavkazské
W236X	G→A na 707	Trp→Stop na 236	EX1	OCA1A	africké
731delGT	Delece GT na 731	Posunutí	EX1	OCA1A	kavkazské
G253R	G→A na 757	Gly→Arg na 253	EX1	OCA1A	Izraelští arabi
V275F	G→T na 823	Val→Phe na 275	EX2	OCA1B	kavkazské
R278X	C→T na 832	Arg→Stop na 278	EX2	OCA1A	Indo-pákistánské, guyanské, maročtí Židé
863delT	Delece T na 863	Posunutí	EX2	OCA1A	korejské
L288S	T→C na 863	Leu→Ser na 288	EX2	OCA1A	kavkazské
C289R	T→C na 865	Cys→Arg na 289	EX2	OCA1A	kavkazské egyptské
E294K	G→A na 880	Glu→Lys na 294	EX2	OCA1A	marocké, sefardští Židé
R299S	C→A na 895	Arg→Ser na 299	EX2	OCA1B	kavkazské
R299H	G→A na 896	Arg→His na 299	EX2	OCA1A	kavkazské, arabští křesťané
929insC	Inzerce C za 929	Posunutí	EX2	OCA1A	japonské
L312V	C→G na 934	Leu→Val na 312	EX2	OCA1A	Hmong
P313R	C→G na 938	Pro→Arg na 313	EX2	OCA1A	Hmong
T325A	A→G na 973	Thr→Ala na 325	EX2	OCA1B	kavkazské
E328Q	G→C na 982	Glu→Gln na 328	EX2	OCA1A	Indo-pákistánské
S339G	A→G na 1015	Ser→Gly na 339	EX2	OCA1A	jamajské
F340L	T→C na 1018	Phe→Leu na 340	EX2	OCA1A	kavkazské
G346X	G→T na 1036	Gly→Stop na 346	EX2	OCA1A	kavkazské
IVS2-7T→A	T→A na 1037-7	Oblast spojení	IVS2	OCA1B	kavkazské, marocké, sefardští Židé
G346E	G→A na 1037	Gly→Glu na 346	EX3	OCA1A	kavkazské
A355P	G→C na 1063	Ala→Pro na 355	EX3	OCA1A	kavkazské
A355E	C→A na 1064	Ala→Glu na 355	EX3	OCA1A	kavkazské
Q359X	C→T na 1075	Gln→Stop na 359	EX3	OCA1A	kavkazské
S361R	C→A na 1083	Ser→Arg na 361	EX3	OCA1B	kavkazské
H367Y	C→T na 1099	His→Tyr na 367	EX3	OCA1A	?
M370T	T→C na 1109	Met→Thr na 370	EX3	OCA1A	?
N371T	A→C na 1112	Asn→Thr na 371	EX3	OCA1A	kavkazské
T373K	C→A na 1118	Thr→Lys na 373	EX3	OCA1A	kavkazské libyjské Židé
Q376X	C→T na 1126	Gln→Stop na 376	EX3	OCA1A	Indo-pákistánské
Q378X	C→T na 1132	Gln→Stop na 378	EX3	OCA1A	kavkazské

Název	Změna nukleotidu	Vliv na kódující sekvenci	Exon	Typ	Etnikum
S380P	T→C na 1138	Ser→Pro at 380	EX3	OCA1A	kavkazské
N382K	C→A na 1146	Asn→Lys at 382	EX3	OCA1A	kavkazské
D383N	G→A na 1147	Asp→Asn at 383	EX3	OCA1A	kavkazské
1164delT	Delece T na 1164	Frameshift	EX3	OCA1A	kavkazské
H390D	C→G na 1168	His→Asp at 390	EX3	OCA1A	kavkazské
V393F	G→T na 1177	Val→Phe at 393	EX3	OCA1A	kavkazské
S395N	G→A na 1184	Ser→Asn at 395	EX3	OCA1A	kavkazské
R402G	C→G na 1204	Arg→Gly at 402	EX4	OCA1B	kavkazské
R402X	C→T na 1204	Arg→Stop at 402	EX4	OCA1A	kavkazské, arabští křesťané
R403S	G→T na 120	9 Arg→Ser at 403	EX4	OCA1A	kavkazské
H404P	A→C na 1211	His→Pro at 404	EX4	OCA1A	kavkazské
P406L	C→T na 1217	Pro→Leu at 406	EX4	OCA1B	kavkazské
G419R	G→A na 1255	Gly→Arg at 419	EX4	OCA1A	kavkazské, indo-pákistánské
R422Q	G→A na 1265	Arg→Gln at 422	EX4	OCA1B	kavkazské
P431L	C→T na 1292	Pro→Leu at 431	EX4	OCA1A	Indo-pákistánské
1314delCTTT	Delece CTTT na 1314	Frameshift	EX4	OCA1A	kavkazské
1315del TTT→CC	Substituce TTT za CC na 1315-1318	Frameshift	EX4	OCA1A	?
G446S	G→A na 1336	Gly→Ser at 446	EX4	OCA1A	kavkazské
D448N	G→A na 1342	Asp→Asn at 448	EX4	OCA1B	kavkazské
Q453X	C→T na 1357	Gln→Stop at 453	EX4	OCA1A	pákistánské
1467insT	Inzerce T za 1467	Frameshift	EX5	OCA1A	?
1501insC	Inzerce C za 1501	Frameshift	EX5	OCA1A	kavkazské
Delece celé kódující oblasti	-	-	X1-5	OCA1A	Židé Aškenázi

Zdroj: OETTING a KING (1999)

Příloha č. 2: Přehled mutací souvisejících se zbarvením srsti a jejich pleiotropní efekty

Tabulka 1a: Mutace související se zbarvením srsti a jejich pleiotropní efekty u člověka

Gen	Název	Pleiotropní efekt	Barva vlasů/kůže	Barva očí
<i>EDN3</i>	<i>WS4</i>	Kongenitální megakolon	Bílé vlasy, kožní skvrny	Hypopigmentace
<i>EDNRB</i>	<i>WS4</i>	Kongenitální megakolon, hluchota	Bílý pramen vlasů nad čelem, kožní skvrny	Heterochromie
<i>LYST</i>	<i>CHS</i>	Imunodeficience, koagulopatie, progresivní neurologická dysfunkce, hepatosplenomegalie	Stříbrné vlasy, bledá kůže	Světlá
<i>MITF</i>	<i>WS2</i>	Horší sluch, kongenitální hluchota	Depigmentované části, hypopigmentace	Poruchy pigmentu
<i>MYO5A</i>	<i>GS1</i>	Neuronová dysfunkce	Stříbrné vlasy, částečný albinismus, světlejší kůže	-
<i>OCA2</i>	<i>OCA2</i>	Horší ostrost vidění, nystagmus, strabismus	Světlé zlaté vlasy, bílá nebo narůžovělá kůže	Oříšková nebo hnědá duhovka
<i>PAX3</i>	<i>WS1</i>	Hluchota, dystopia canthorum	Bílý pramen vlasů nad čelem, předčasné šedivění	Heterochromie, modrá barva
<i>RAB27A</i>	<i>GS2</i>	Vady imunitní homeostáze, syndrom hemofagocytózy	Stříbřitě šedé vlasy, částečný albinismus	-
<i>SLC45A2</i>	<i>OCA4</i>	Abnormality oční bulvy	Hypopigmentace vlasů nebo kůže	Zesvětlená
<i>SNAI2</i>	<i>WS2</i>	Ztráta sluchu	-	Heterochromie
<i>SNPs genů ovl. zbarvení</i>	Riziko rakoviny	Melanom	Různé	
<i>SOX10</i>	<i>WS4 (WS2)</i>	Hluchota, aganglionický megakolon	Bílé vlasy, depigmentované části kůže	Modrá
<i>TYR</i>	<i>OCA1</i>	Redukce ostrosti vidění, nystagmus	Typ A: bílé vlasy, růžovo-bílá kůže	Transparentní duhovka

Převzato z: REISSMANN a LUDWIG (2013)

Tabulka 1b: Mutace související se zbarvením srsti a jejich pleiotropní efekty u myši

Gen	Název	Pleiotropní efekt	Barva srsti, kůže	Barva očí
<i>ASIP</i>	<i>Lethal yellow, viable yellow, lethal non-agouti</i>	Obezita, hyperglycemie, hyperinzulinemie, vyšší citlivost na hyperplazii, karcinogeneze	Žlutá	Tmavá
<i>ATR1</i>	<i>Mahogany</i>	Vliv na obezitu	Ztmavení	-
<i>EDN3</i>	<i>Lethal spotting</i>	Aganglionický megakolon, letální	Bílé tečkování	Tmavá
<i>EDNRB</i>	<i>Piebald spotting</i>	Aganglionický megakolon, letální	Bílé tečkování	-
<i>KIT</i>	<i>Dominant white, white spotting</i>	Makrocytární anémie, sterilita, letální	Bílá	Černá
<i>KITLG</i>	<i>Steel, steel panda</i>	Makrocytární anémie, sterilita, letální	Zesvětlená srst, bílé tečkování, bílá	Černá
<i>LYST</i>	<i>Beige</i>	Akumulace obřích lysozomů, abnormální krváceniny	Zesvětlená srst	-
<i>MCOLN3</i>	<i>Varitint-waddler</i>	Letální, hluchota	Nedostatek pigmentace	-
<i>MGRN1</i>	<i>Mahoganoid</i>	Vliv na obezitu	Ztmavení	-
<i>MITF</i>	<i>Black-eyed white</i>	Mikroftalmie, hluchota, osteopetróza	Bílá, bílé skvrny	Černá, zesvětlená
<i>MYO5A</i>	<i>Dilute</i>	Neurologická porucha, letální	Světlá	-
<i>OCA2</i>	<i>Pink-eyed dilution</i>	Abnormální spermiogeneze a angiogeneze	Plavá	Světlá
<i>OSTM1</i>	<i>Grey lethal osteopetrosis</i>	Osteopetróza, letální	Šedá	-
<i>PAX3</i>	<i>Splotch</i>	Rozštěp páteře, exencefalie, letální	Bíle tečkované břicho	-
<i>RAB27A</i>	<i>Ashen</i>	Defekty krevních destiček	Zesvětlená srst	-
<i>RAB38</i>	<i>Chocolate</i>	Tenčí RPE (pigment. epitel sítnice) a IPE (pigment. epitel duhovky)	Redukce pigmentu, skvrny	-
<i>SLC24A5</i>	<i>OA</i>	Defekty oka, tenčí RPE a IPE	Žádný viditelný vliv	Bledá
<i>SNAI2</i>	<i>Slugh</i>	Hyperaktivita, krouživé chování, gonadální a hematopoietické defekty	Světlá srst, bílá skvrna na čele, depigmentované břicho, ocas a tlapy	-
<i>SOX10</i>	<i>Dominant megacolon</i>	Aganglióza, letální	Bílá hlava, skvrny na břiše	-
<i>TYR</i>	<i>OCA1</i>	Abnormality funkce sítnice, ztráta fotoreceptorů	Bílá, albino	Červená

Převzato z: REISSMANN a LUDWIG (2013)

Příloha č. 3: Vybrané mutantní alely u klonovaných myší s popisem funkcí v pigmentaci a dalších změn v organismu spojených s mutacemi.

Symbol	Lokus u myši	Funkce a efekt v pigmentaci
<i>Acd</i>	Adrenokortikální dysplazie	Hyperpigmentace kůže, nemoci orgánů
<i>Adam17</i>	<i>Adam17</i>	Nepravidelná pigmentace vlasů a srsti
<i>Adamts20</i>	<i>Belted (bt)</i>	Bederní bílý pás
<i>Arcn1</i>	<i>Archain 1, nur17</i>	Zředěné zbarvení srsti (neurologické defekty)
<i>Dock7</i>	<i>Dedikátor cytokineze 7, misty (m), moonlight (mmlt)</i>	Hypopigmentace, místní bílé tečkování, málo pigmentu na břichu a packách
<i>Edn3</i>	<i>Endotelin3, lethalspotting (ls)</i>	Bílé tečkování, neurální defekty
<i>Ednrb</i>	<i>Piebaldspotting (s)</i>	Bílé tečkování, neurální defekty
<i>Egfr</i>	Receptor růstového faktoru pokožky, <i>dark skin 5 (dsk5)</i>	Tmavá pokožka (stejně jako <i>Krt2</i> a další)
<i>Fgfr2</i>	Receptor 2 růstového faktoru fibroblastů	Světlá pokožka, mnoho defektů
<i>Gnaq</i>	<i>Dark skin 1 (dsk1), dark skin 10 (dsk10)</i>	Tmavá pokožka, hyperproliferační melanocytů
<i>Gpc3</i>	<i>Glypican 3, tmtArge</i>	Dominantní distální a ventrální tečkování
<i>Kit</i>	<i>dominant white-spotting (W)</i>	Bílé tečkování, anémie, nedostatek terminálních buněk (stejně jako <i>kitl/steel/Sl</i>)
<i>Kitl</i>	<i>Steel (sl)</i>	Bílé tečkování, anémie, nedostatek germinálních buněk
<i>Mcoln3</i>	<i>Mucolipin 3, varitint-waddler (Va)</i>	Ředěná a bílá barva srsti, defekty v chování
<i>Mitf</i>	<i>Microphtalmia (mi)</i>	Bílé tečkování, malé či chybějící oči, vliv na diferenciaci melanocytů
<i>Recql4</i>	<i>RecQ protein-like 4</i>	Zpomalení růstu, abnormality kůže se vzory či bez barvy, předčasné šednutí srsti
<i>Sema3c</i>	<i>Semaphorin 3C</i>	Hypopigmentace kůže, ektopický pigment ve vnitřních orgánech
<i>Tub</i>	<i>Tubby kandidátní gen</i>	Obezita, abnormality očí a uší

Převzato z: OETTING (2011)

Na konstrukci melanosomů mají vliv alely *pearl (pe)*, *mocha (mh)*, *cappuccino (cno)*, *sandy (sdy)*, *pale tremor (plt)*, *pale ear (ep)*, *cocoa (coa)*, *light ear (le)*, *ruby-eye (ru)*, *beige (bg)*, *muted (mu)*, *pinkeyed-dilution (p)*, *chocolate (cht)*, *gunmetal (gm)* nebo *buff (bf)*. Názvy alel odpovídají většinou výslednému fenotypu jedince s tímto genem a mají vliv na biogenezi organel, melanosomů a dalších komponent. Na vznik melaninových pigmentů mají kromě již zmiňovaných alel také *Tabby (Ta)*, *Drd2 (receptor dopaminu 2)*, *Ostm1 (grey-lethal, Gl)* a další, které ovlivňují morfogenezi

zubů a srsti, funkci feomelaninu či způsobují ztmavení agouti fenotypu. Geny *Atp7a* (*mottled, mo*) a *Atp7b* (*toxic milk, tx*) ovlivňují transport mědi (OETTING, 2011).

Příloha č. 4: Vybrané mutantní alely u neklonovaných myší s popisem funkcí v pigmentaci a dalších změn v organismu spojených s mutacemi.

Symbol	Lokus u myši	Funkce a efekt v pigmentaci
<i>Alm</i>	<i>anterior lenticonus with microphthalmia (Alm)</i>	Vliv na oči, srst a další
<i>ao</i>	<i>apampischo</i>	Ztráta srsti, znovu naroste tmavější
<i>baw</i>	<i>black and white</i>	Bílé břicho, na hřbetě roztroušené bílé chlupy
<i>bt2</i>	<i>belted 2 (bt2)</i>	Bílý pás
<i>Crm</i>	<i>cream</i>	Samci a homozygotní samice mají světle žlutý nádech barvy srsti, zatímco heterozygotní samice mají žlutý vzor v srsti
<i>Crsp</i>	<i>cryptorchidism with white spotting (crsp)</i>	Ovlivňuje pigment kůže a srsti a samčí reprodukční systém
<i>dds</i>	<i>dorsal dark stripe</i>	Dorzální tmavý pruh
<i>fc</i>	<i>flecking</i>	Skvrny na hlavě a břichu
<i>Fk</i>	<i>Fleck</i>	Bílé břicho, ocas a nohy
<i>rg</i>	<i>rotating</i>	Vývoj nervů a ucha, občas bílé skvrny na břichu
<i>rn</i>	<i>Roan</i>	Mikro-skvrny po celém těle
<i>Shmu</i>	<i>shamu</i>	Bílé nohy, skvrny na břichu a hlavě
<i>Ska7</i>	<i>skeletal/axial 7, big toe, Skam07Jus, the claw</i>	Velká skvrna na břichu, defekty kostry
<i>smk</i>	<i>smoky</i>	Šedá srst (recesivní homozygoti), defekty reprodukčního systému
<i>Ts</i>	<i>Tail-short</i>	Skvrnité břicho, změny v kostře, krvi, růstu
<i>Vss</i>	<i>variable spot and size</i>	Různá skvrnitost břicha, malá velikost
<i>wn</i>	<i>white nose</i>	Bílý nos, pruh na břichu
<i>Wtgr</i>	<i>wavy tiger</i>	Pruhovaná a vlnitá srst, defekty reprodukčního systému

Převzato z: OETTING (2011)

Na funkci melanocytů mají vliv například alely *brownoid* (*brwd*), *cream* (*Crm*), *dilution Japan* (*dj*), *dilution Peru* (*dp*), *platino* (*plto*), *powder*, *sepia* (*sea*) nebo *titanium* (*titanm*), které zesvětlují barvu srsti. Na funkci eu- a feomelaninu mají vliv například alely *dark* (*da*), *golden* (*gdn*), *grizzled* (*gr*), *grey intense* (*gri*), *umbrous* (*U*) nebo *yellow mottled* (*Ym*). Dále existuje řada alel, které ovlivňují výsledný fenotyp, ale není u nich znám vliv na jiné funkce v organismu, například *Dominant lightened pigment 1-3*, *faded* (*fe*), *Fawn* (*Fn*) nebo *London grey* (*lgr*) (OETTING, 2011).