

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE



Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění

**Studium zbarvení srsti kočky domácí na úrovni
molekulární genetiky**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Autor práce: Martina Janáková

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Studium zbarvení srsti kočky domácí na úrovni molekulární genetiky“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Dolní Brusnici dne: 2. 4. 2012

podpis autora práce

Poděkování

Ráda bych touto formou poděkovala především panu doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za odborné vedení, rady, podporu a věcné připomínky při zpracování bakalářské práce. Velký dík patří i paní Ing. Daniele Čílové a panu Ing. Jakubovi Vaškovi Ph.D. za cenné rady a vedení při zpracování experimentální části této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem chovatelům koček za poskytnutí vzorků a fotografií. A také děkuji celé mé rodině nejen za podporu během studia. Řešení bakalářské práce bylo podpořeno grantem FRVŠ MŠMT v Praze „2730 Aa – Modernizace laboratoře genetických analýz technikami založenými na principu kapilární elektroforézy“ a výzkumným záměrem „MSM6046070901 – Setrvalé zemědělství, kvalita zemědělské produkce, krajinné a přírodní zdroje“.

Souhrn

Kočka domácí patří mezi jedno z nejrozšířenějších domácích zvířat, vyznačuje se nezávislostí, kterou neztratila ani po dlouhém soužití s lidmi. Díky šlechtění nyní existuje mnoho plemen, které můžeme rozdělit do čtyř základních kategorií. Plemena koček se navzájem odlišují v různých znacích. Jednoznačně identifikovatelným znakem je barva srsti, která je předmětem výzkumu této bakalářské práce.

Vzorky DNA byly odebrány neinvazivní metodou stěrem z bukáních sliznic od 75 jedinců. Následnou izolací se podařilo získat vysoce čistou vysokomolekulární DNA od všech jedinců. V experimentální části jsem se nejdříve zaměřila na gen *ASIP*, jehož mutace vede u kočky domácí k melanistickému zbarvení srsti s typickou recesivní dědičností. Byl navržen PCR-RFLP marker umožňující jednoznačně vyhledat dinukleotidovou delecii v genu *ASIP*. Přímou sekvenací bylo potvrzeno, že detekovaná mutace koresponduje s melanistickým zbarvením srsti kočky domácí. Bylo zjištěno, že kočky domácí s aguti zbarvením nesou původní nemutovanou alelu stejně jako kočky divoké, kterým toto zbarvení zajišťuje účinné mimikry.

Dalším zkoumaným genem byl gen *O* pro červené zbarvení srsti, který doposud nebyl sekvenčně identifikován. Byly vybrány tři mikrosatelitní lokusy, u kterých se předpokládala minimální rekombinace s genem *O*. Metoda mutliplex SSR umožnila současnou detekci alel tří mikrosatelitních lokusů, ale pouze u jednoho mikrosatelitního lokusu skutečně nedocházelo k rekombinacím s fenotypovým projevem červeného zbarvení srsti. Podařilo se potvrdit hypotézu, že tento gen je lokalizovaný na nehomologní části gonozómu X, proto u všech kocourů byla zjištěna vždy pouze jediná alela těchto markerů a tudíž u jedinců se správným karyotypem se nevyskytuje želvovinové respektive tříbarevné zbarvení srsti. Toto zbarvení je charakteristické pouze pro samice a vzniká v důsledku neúplné dominance mezi dominantní a recesivní alelou genu *O*. Byl prokázán epistatický účinek genu *O* nad nemutovanými alelami genu *ASIP*.

Klíčová slova: kočka domácí, *Felis catus*, zbarvení srsti, melanismus, aguti, DNA, gen *ASIP*, PCR-RFLP

Summary

Domestic cat is one of the most common domestic animals, characterized by independence, which has not lost even after a long cohabitation with humans. Thanks to the breeding now exists many breeds, which can be divided into four basic categories. Breeds of cats differ in various characters. Clearly identifiable sign is the color of the coat, which is the subject of this thesis research.

DNA samples were collected by non-invasive method of swabbing the buccal mucosa from 75 individuals. Subsequent isolation was able to obtain highly pure high molecular DNA from all individuals. In the experimental part, I focused on the *ASIP* gene whose mutation leads to a melanistic domestic cat coat color with a typical recessive inheritance. It was designed PCR-RFLP marker searching for uniquely dinucleotid deletion in the gene *ASIP*. Direct sequencing confirmed that the detected mutation corresponds with melanistic domestic cat coat color. It was found that domestic cats carry the agouti color of the original non-mutated allele as well as wild cats, which ensures the efficient color mimicry.

Another examined gene was gene *O* for red coat, which has not been identified sequentially yet. There were selected three microsatellite loci, which are assumed minimum recombination with a gene *O*. Multiplex SSR method allowed detection of alleles present on three microsatellite loci, but only one microsatellite locus didn't recombine with the phenotypic expression of the red coat. We managed to confirm the hypothesis that this gene is located on nonhomologous gonosomes of X, because all males were always observed with only one allele and thus individuals with right karyotype does not occur three-colored or tortoiseshell coat color. This color is characteristic only for females and is caused by incomplete dominance between dominant and recessive allele of the gene *O*. It has been detected epistatic effect of gen *O* over the non-mutated allele of the *ASIP* gene.

Keywords: Domestic cat, *Felis catus*, coat color, melanism, agouti, DNA, gene *ASIP*, PCR-RFLP

Obsah:

1.	Úvod.....	1
2.	Vědecké hypotézy a cíle práce.....	2
2.1	Vědecké hypotézy	2
2.2	Cíle bakalářské práce	4
3.	Literární přehled	5
3.1	Domestikace a význam koček.....	5
3.2	FIFe – EMS Systém klasifikace plemen koček.....	6
3.3	Nejčastěji chovaná plemena koček a charakteristika zbarvení jejich srsti.....	10
3.3.1	Perské kočky	11
3.3.2	Polodlouhosrsté kočky	14
3.3.3	Krátkosrsté kočky	15
3.3.4	Siamské a orientální krátkosrsté kočky	16
3.4	Molekulární mechanismy tvorby pigmentů srsti.....	17
3.4.1	Pigmentace srsti	17
3.4.2	Aguti kresba a melanismus	19
3.4.3	Tvorba červeného pigmentu v srsti kočky domácí	21
3.5	Genetika zbarvení srsti u koček	22
3.5.1	Monogenní model dědičnosti zbarvení srsti	22
3.5.2	Známé lokusy řídící barvu srsti a lokalizované na autozomech	23
3.5.3	Známé lokusy řídící barvu srsti a lokalizované na gonozómu X.....	33
3.5.4	Interakce mezi geny řídící zbarvení srsti	34
3.6	Postup získání markerů použitelných pro studium polymorfismu genů zodpovědných za zbarvení srsti.....	35
3.6.1	Izolace DNA	35
3.6.2	Metoda PCR.....	36
3.6.3	Restrikční štěpení.....	38
3.6.4	Mikrosatelitní markery	38
3.6.5	Elektroforetická separace DNA fragmentů.....	39
3.6.6	Sekvence DNA.....	41
4.	Metodika	43
4.1	Výběr hodnocených zvířat	43
4.2	Hodnocení zbarvení srsti.....	43
4.3	Izolace DNA.....	43
4.4	Stanovení kvality a kvantity izolované DNA.....	44
4.5	PCR-RFLP marker genu <i>ASIP</i>	45

4.5.1	Navržení PCR-RFLP markeru genu <i>ASIP</i>	45
4.5.2	Vlastní optimalizovaný metodický postup detekce kauzální mutace <i>ASIP</i> genu pomocí PCR-RFLP	49
4.5.3	Sekvenační analýza PCR amplikonu <i>ASIP</i> genu kočky domácí.....	51
4.5.4	Statistické a bioinformatické vyhodnocení polymorfismů <i>ASIP</i> genu	54
4.6	Multiplex-SSR analýza markerů asociovaných s genem <i>O</i> pro červené zbarvení srsti 55	
4.6.1	Výběr SSR lokusů s lokalizací na gonozómu X s předpokládanou vazbou ke genu <i>O</i> 55	
4.6.2	Optimalizace složení a teplotního a časového profilu amplifikace multiplex-SSR markeru 56	
4.6.3	Optimalizace teplotního a časového profilu multiplex-SSR markerů	57
4.6.4	Příprava vzorků amplifikovaných multiplex-SSR markerů pro fragmentační analýzu 57	
4.6.5	Podmínky fragmentační analýzy multiplex-SSR markerů	58
4.6.6	Vyhodnocení polymorfismů multiplex SSR markerů a jejich bioinformatické zpracování.....	58
5.	Výsledky	60
5.1	Správná identifikace barev srsti hodnocených zvířat	60
5.2	Hodnocení kvality a kvantity izolované DNA	60
5.3	Specifičnost PCR-RFLP markerů genu <i>ASIP</i>	61
5.3.1	Amplifikace PCR-RFLP markeru genu <i>ASIP</i>	61
5.3.2	Detekce alel <i>ASIP</i> genu pomocí restričního štěpení	62
5.4	Detekované alely genu <i>ASIP</i> u hodnocených zvířat a jejich vztah k aguti zbarvení .62	
5.5	Vyhodnocení frekvencí alel genu <i>ASIP</i> z hlediska populační genetiky.....	67
5.6	Sekvenační analýza genu <i>ASIP</i>	68
5.6.1	Zjištění sekvence markeru genu <i>ASIP</i>	68
5.6.2	Porovnání získaných sekvencí alel genu <i>ASIP</i> s mezinárodní nukleotidovou databází NCBI.....	72
5.7	Detekované alely SSR markeru červeného zbarvení srsti a jejich vztah ke skutečnému fenotypu	75
5.7.1	Polymorfismy mikrosatelitních markerů amplifikovaných v multiplex systému 75	
5.7.2	Variabilita alel hodnocených mikrosatelitních lokusů.....	77
5.7.3	Populačně genetická charakteristika alelických kombinací mikrosatelitních lokusů FCA1494, FCA1496 a FCA1498.....	79
5.7.4	Identifikace alel mikrosatelitních lokusů vázaných na gen <i>O</i> a vyhodnocení frekvencí rekombinací	80
6.	Diskuze	83
6.1	Výběr hodnocených zvířat a zajištění biologického materiálu	83

6.1.1	Hodnocená zvířata a správná identifikace jejich zbarvení.....	83
6.1.2	Použitý postup izolace DNA.....	84
6.2	Polymorfismus markeru <i>ASIP</i> genu a jeho vztah k melanistickému zbarvení srsti ...	86
6.2.1	Detekce polymorfismů metodou PCR-RFLP	86
6.2.2	Fenotypový projev koček s mutovanou a nemutovanou alelou genu <i>ASIP</i>	87
6.2.3	Sekvenační analýzy PCR-RFLP markeru genu <i>ASIP</i>	88
6.3	Mikrosatelitní lokusy vázané na gen <i>O</i> pro červené zbarvení koček.....	89
6.3.1	Metody detekce polymorfismů mikrosatelitních lokusů	89
6.3.2	Rekombinace mezi markerujícími alelami a fenotypovým projevem – zbarvením srsti.....	90
6.4	Interakce mezi genem <i>ASIP</i> a genem <i>O</i>	90
7.	Závěr	92
8.	Seznam literatury	95
9.	Seznam použitých zkratk	100
	Přílohy.....	102
	Příloha 1: Fotodokumentace zbarvení srsti koček	102
	Příloha 2: Složení pufrů použitelných pro gelovou elektroforézu	105

Seznam příloh

Příloha 1: Fotodokumentace zbarvení srsti koček

Příloha 2: Složení pufrů použitelných pro gelovou elektroforézu

1. Úvod

Historie soužití kočky domácí (*Felis silvestris catus*) a člověka je již spojená od dob starověkého Egypta. Dnes kočka patří společně se psem mezi nejoblíbenější domácí mazlíčky, i když tomu tak vždy nebylo. Ani po tisíciletém šlechtění neztratily kočky modely přirozeného chování divokých předků. Pomocí šlechtění vzniklo mnoho plemen, které se navzájem liší například stavbou těla, velikostí, povahovými vlastnostmi a barvou srsti, která je předmětem výzkumu této bakalářské práce.

Chovatelé koček jsou sdružováni do organizací, které vydávají závazné standardy pro jednotlivá plemena koček. Jednou z nejuznávanějších mezinárodních organizací chovatelů koček je FIFe (Fédération Internationale Féline), jejíž součástí je Český svaz chovatelů.

Tématem mé bakalářské práce je Studium zbarvení srsti kočky domácí na úrovni molekulární genetiky. V experimentální části jsem se zaměřila na dva major geny (*ASIP* a *O*), jejichž interakce má zásadní vliv na výsledné zbarvení srsti. Dominantní alela *ASIP* genu způsobuje aguti zbarvení a projev kresby. Jedním z cílů bylo dokázat, že melanistické zbarvení srsti je řízeno recesivní mutovanou alelou *ASIP* genu. Dále jsem zkoumala gen *O* pro červené zbarvení srsti, který je lokalizovaný na X gonozómu a je pro něj charakteristická dědičnost křížem. Zbarvení srsti ovlivňují dále geny: Gen *TYRPI* podmiňující černé, čokoládové a skořicové zbarvení srsti. Gen *TYR* způsobující různé stupně zesvětlení srsti a gen zodpovědný za ředění barvy *MLPH*.

Laboratoř společnosti Genomia s.r.o. poskytuje služby v oblasti veterinární genetické diagnostiky dědičných chorob koček, mezi které patří polycystická choroba ledvin, která se vyskytuje nejen u koček, ale i u lidí a jiných zvířat. U koček jsou nejvíce ohrožené kočky perské a exotické díky vzájemnému nadměrnému křížení. Další chorobu, kterou laboratoř diagnostikuje, je retinální degenerace, která se dědí autozomálně recesivně. Jedná se o pozdní formu degenerace fotoreceptorů, která postihuje několik plemen koček. Dále laboratoř provádí testy barev a kvality srsti koček (lokus A, lokus B, lokus C, lokus D) a stanovení paternity koček (Genomia, 2012).

2. Vědecké hypotézy a cíle práce

2.1 Vědecké hypotézy

Řešení bakalářské práce je zaměřené na ověření nebo vyvrácení následujících vědeckých hypotéz:

- Kočka domácí se na rozdíl od původního nedomestikovaného druhu odlišuje výrazně vyšší variabilitou ve zbarvení srsti. U kočky divoké je variabilita zbarvení srsti založena pouze na nepatrných rozdílech v typu tabby kresby. Naproti tomu u kočky domácí došlo díky procesu domestikace a záměrného šlechtění člověkem k podchyzení řady barevných variant.
- Řada těchto barevných variant je způsobena kauzálními mutacemi konkrétních genů. Většina takových mutací je recesivního charakteru a v populaci koček se tudíž mohou nacházet divoce zbarvení (aguti) jedinci, kteří tyto alely předávají do dalších generací.
- Aguti zbarvení srsti je typické pro řadu druhů savců, u kterých je známá sekvence genu *ASIP*, který je zodpovědný za typické pruhování chlupů. U kočky domácí byla popsána dinukleotidová delece v exonu 2 genu *ASIP*, která je zodpovědná za vznik melanismu. Tato mutace se fenotypově projeví pouze u jedinců, kteří mají obě alely mutované. Mutace tudíž vykazuje typickou recesivní dědičnost.
- U různých druhů savců byly popsány melanismy ve zbarvení srsti. Neplatí však, že jakýkoliv fenotypový projev melanismu musí být vždy spojený s mutací genu *ASIP*. Přesto je možné tvrdit, že sekvence exonových částí genu *ASIP* jsou napříč různými savčími druhy poměrně konzervativní.
- V případě, že v důsledku mutace dojde ke změně restrikčního místa, je možné takovou to mutaci poměrně jednoduše detekovat pomocí metody PCR-RFLP, která poskytuje genový marker kodominantního charakteru.
- Kodominantní genetické markery je možné hodnotit z hlediska populační genetiky na základě hodnot pozorované a očekávané heterozygotnosti a z těchto údajů lze usuzovat, zda populace hodnoceného biologického druhu je nebo není v rovnováze podle Hardy-Weinbergova zákona.
- Na základě praktických zkušeností chovatelů a šlechtitelů koček se předpokládá, že červené zbarvení srsti je řízeno major genem *O*, který nebyl doposud sekvenčně identifikován. Předpokládá se však, že tento gen je lokalizován na gonozómu X a

vyznačuje se dědičností křížem. U kocourů se správným karyotypem se u genu *O* vyskytuje vždy jedna alela.

- Byly popsány mikrosatelitní lokusy, které jsou lokalizovány na nehomologní části gonozómu X a u kterých se předpokládá vazba na doposud neznámý gen *O*. Z literárních zdrojů vyplývá hypotéza, že některé z těchto lokusů se vyznačují nulovou nebo minimální rekombinací vzhledem k alelám genu *O*.
- Metoda multiplex SSR markerů představuje účinný nástroj, který urychluje proces genotypizace hodnocených zvířat.
- Bylo rovněž popsáno, že želvovinové respektive třibarevné zbarvení srsti je charakteristické pouze pro samice a vzniká v důsledku neúplné dominance mezi dominantní a recesivní alelou genu *O*. Lze tudíž předpokládat, že pro tento fenotypový projev bude charakteristická heterozygotní sestava alel použitých mikrosatelitních lokusů.
- Na základě hodnocení segregujících potomstvech vzniklých křížením aguti, černě a červeně zbarvených koček byl prokázán epistatický účinek genu *O* nad nemutovanými alelami genu *ASIP*. Lze předpokládat, že tuto dominantní epistázi lze dokázat i na úrovni použitých molekulárních markerů.

2.2 Cíle bakalářské práce

Na základě výše uvedených hypotéz byly formulovány konkrétní cíle bakalářské práce, které jsou uvedeny v následujících bodech:

1. Zpracovat literární rešerši na genetiku zbarvení kočky domácí včetně molekulárního pohledu na kauzální mutace některých genů.
2. Kontaktovat chovatele s cílem zajistit biologický materiál reprezentující modelovou populaci s variabilním zbarvením srsti.
3. U zvířat určených k molekulárním analýzám provést správný popis zbarvení jejich srsti s využitím mezinárodní nomenklatury FIFe.
4. Pomocí neinvazivní metody odebrat vzorky buněk bukalálních sliznic a provést izolaci genomické DNA s využitím komerčně vyráběného kitu.
5. U extrahované DNA provést hodnocení její kvality a kvantity.
6. Na základě publikované sekvence exonu 2 genu *ASIP* vyhledat pozici kauzální mutace vedoucí k melanismu a navrhnout PCR-RFLP marker, který bude vykazovat kodominantní charakter.
7. Sekvenci amplifikovaného PCR-RFLP markeru vyhodnotit pomocí přímého sekvenování a potvrdit, zda detekované mutace koresponduje s melanistickým zbarvením kočky domácí.
8. Pomocí nástrojů bioinformatiky provést vyhodnocení frekvencí nemutované a mutované alely genu *ASIP* v modelové populaci kočky domácí.
9. Z publikovaných mikrosatelitních lokusů vybrat takové, které podle literárních pramenů minimálně rekombinují s genem *O*, který je zodpovědný za červené zbarvení srsti.
10. Navrhnout a následně optimalizovat SSR-multiplex marker, který umožní současnou detekci alel tří mikrosatelitních lokusů, u kterých se předpokládá těsná vazba na gen *O*.
11. U použitých mikrosatelitních markerů identifikovat konkrétní markerující alely a současně určit, které z těchto alel vykazují vazbu s červeným zbarvením srsti. Jednotlivé mikrosatelitní lokusy charakterizovat rovněž z hlediska parametru PIC a z hlediska frekvencí rekombinací markerujících alel s červeným zbarvením srsti.
12. Na základě výsledků molekulárních analýz a fenotypových projevů – zbarvení srsti hodnocených zvířat určit, jaký je vztah mezi geny *ASIP* a *O*.

3. Literární přehled

3.1 Domestikace a význam koček

Kočku divokou můžeme podle geografického výskytu rozdělit do tří skupin na evropskou, asijskou a africkou žijící v buši (tzv. kočka plavá). Potomkem kočky divoké je kočka domácí (*Felis silvestris catus* Linnaeus, 1758), která byla domestikována z obou poddruhů kočky plavé (*Felis silvestris lybica* Forster, 1780) a (*Felis silvestris ocreata* Gmelin, 1791). Předpokládá se, že k domestikaci kočky zřejmě došlo v údolí Nilu asi 4000 př. n. l. Ve starověkém Egyptě byla kočka posvátným zvířetem. Podobu kočky měla i egyptská bohyně Bastet, která byla symbolem noci, plodnosti a byla ochránkyně porodu a lovu. Z posvátného zvířete Egyptanů se kočka postupně stala zvířetem užitkovým používaným především k hubení škodlivých hlodavců. V 11. století byla kočka domácí už rozšířena po celé Evropě. V 10. století se v Anglii krádež kočky trestala i smrtí, naopak v jiných zemích (např. ve Francii) byla považována za zvíře strašidelné a čarovné. Osoby ve středověku chovající černé nebo i celobílé kočky byly často obviňovány ze spojení s ďáblem a čarodějnictví. Mnoho z těchto osob bylo i se svou kočkou upáleno. Čas měnil názory lidí na kočku i vztahy k ní, ale kočka s nimi zůstala, protože jí bylo potřeba k ochraně panských sýpek, mlýnů i domácností před myšmi a nyní je také nenahraditelná společnice člověka (Vařejčko, 1984).

Kočka je dnes jedním z nejoblíbenějších domácích zvířat a v mnoha zemích v této pozici nahrazuje dosud tradičně nejčastěji chovaného psa. Tento trend má několik důvodů: kočka je menší než většina plemen psů, proto nepotřebuje tak velký prostor, spotřebuje méně potravy a může se chovat i v malých bytech (Vařejčko, 1984). Kočka žijící v domácnosti působí léčivě a život s ní bývá určitou odměnou. Žádné jiné zvíře není tak čistotné, nemá tak jemné chování a nevyžaduje tak nenáročnou péči. Navzdory úzkým vazbám s lidmi se kočkám daří zachovávat tajemnou nezávislost. Kočka je zvířetem protikladů. V její povaze se spojuje opatrnost s odvahou a dokáže střídat chvíle naprostého uvolnění s pozoruhodnou obratností. Proto počet koček chovaných v domácnosti i registrovaných chovatelů na celém světě roste (Rixon, 1995).

Zoologické zařazení (BioLib, 1999 – 2011)

Říše: Živočichové (Animalia Linnaeus, 1758)

Kmen: Strunatci (Chordata Bateson, 1885)

Podkmen: Obratlovci (Vertebrata Cuvier, 1812)

Třída: Savci (Mammalia Linnaeus, 1758)

Infratřída: Placentálové (Eutheria Huxley, 1880)

Řád: Šelmy (Carnivora Bowdich, 1821)

Podřád: Kočkotvárné šelmy (Feliformia Fischer de Waldheim, 1817)

Čeleď: Kočkovití (Felidae Fischer de Waldheim, 1817)

Podčeleď: Malé kočky (Felinae Fischer de Waldheim, 1817)

Rod: Kočky (*Felis* Linnaeus, 1758)

Druh: kočka divoká (*Felis silvestris* Schreber, 1777)

Forma: kočka domácí (*Felis silvestris catus* Linnaeus, 1758)

3.2 FIFe – EMS Systém klasifikace plemen koček

FIFe (Fédération Internationale Féline) je mezinárodní organizací chovatelů koček, která byla zaregistrována v roce 1981 v Ženevě. Předchůdkyní FIFe byla United Nations Organization of the Cat Fancy, kterou založila v roce 1949 Francouzka M. Rabel. Cílem organizace bylo vypracování seznamu nebo přehledu přiznaných plemen koček včetně jejich barevných variant, standardů plemen a předpisů výstav koček. Organizace FIFe nyní sdružuje přes 42 členských organizací ve 40 zemích po celém světě. Nejvyšší řídicí složkou organizace je Všeobecné politické shromáždění, které jednou za rok přijímá návrhy a změny předpisů. Českým členem světové organizace FIFe je Český svaz chovatelů, jehož součástí je Sdružení chovatelů koček v ČR (Fédération Internationale Féline, 2012).

Mezinárodní federace FIFe vydává závazné předpisy a standardy plemen, tedy podrobný popis jejich exteriéru. K jejich označování se jednotně používá označovací systém EMS (Easy Minder System). Díky kódům EMS můžou chovatelé zjistit fenotyp kočky, bez toho aniž by ji viděli. Tyto kódy jsou uvedeny v rodokmenu kočky a jsou např. součástí přihlášky na každou výstavu. EMS kódy mají svá pravidla i omezení, jsou to:

- Symbol hvězdičky (*) zastupuje jakoukoliv informaci v konkrétní části EMS kódu,
- Pro oddělení konkrétní části EMS kódu se vždy používají mezery, pokud není výslovně uvedeno jinak,
- Konkrétní číselné části EMS kódu se uvádějí vždy ve vzestupném pořadí,
- Pokud je pro plemeno charakteristický pouze jeden jediný možný znak, tento znak se z EMS kódu vypouští.

EMS kódy se skládají z několika částí, kde první část kódu tvoří kód plemene o třech velkých písmenech. Další část kódu představuje jedno malé písmeno, které označuje zbarvení srsti. Tato část kódu se neuvádí u plemen, která jsou uznána pouze v jediné barvě srsti. V následující části kódu se případně uvádí kód depigmentace srsti (tiping). Poslední část kódu jsou kódy exteriérových znaků, které se píšou pomocí čísel, a nalezneme zde:

- Kódy bílé skvrnitosti 01, 02, 03, 04, 05, 09,
- Kódy stupně depigmentace (tiping) 11, 12,
- Kódy typu kresby v srsti 21, 22, 23, 24, 25,
- Kódy snížené intenzity pigmentace 31, 32, 33,
- Kódy stupně zkrácení ocasu (u Manxe) 51, 52, 53, 54,
- Kódy zbarvení očí 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
- Kódy postavení uší 71, 72, 73.

V tabulce 1 jsou uvedeny kódy jednotlivých plemen, v tabulce 2 kódy zbarvení srsti a v tabulce 3 jsou uvedeny kódy exteriérových znaků.

Tabulka 1: EMS kódy plemen koček podle FIFe (Fédération Internationale Féline, 2012).

EMS	Plemeno	EMS	Plemeno
ABY	Habešská	MCO	Mainská mývalí
ACL	Americká Curl dlouhosrstá	NFO	Norská lesní
ACS	Americká Curl krátkosrstá	OCI	Ocicat
BAL	Balinéská/Balijská	OLH	Orientální dlouhosrstá
BEN	Bengálská	OSH	Orientální krátkosrstá
BML	Burmila	PEB	Peterbald
BRI	Britská	PER	Perská
BUR	Barmská	RAG	Ragdoll
CRX	Cornish Rex	RUS	Ruská
DRX	Devon Rex	SBI	Birma
DSP	Donský sphynx	SIB	Sibiřská
EUR	Evropská	SIA	Siamská
EXO	Exotická	SNO	Snowshoe
GRX	German Rex	SOK	Sokoke
CHA	Kartouzská	SOM	Somálská
JBT	Japonský bobtail	SPH	Sphynx
KBL	Kurilský bobtail dlouhosrstý	SYL	Seychelská dlouhosrstá
KBS	Kurilský bobtail krátkosrstý	SYS	Seychelská krátkosrstá
KOR	Korat	TUA	Turecká angora
MAN	Manx	TUV	Turecká van
MAU	Egyptská Mau		

Tabulka 2: EMS kódy zbarvení srsti podle FIFe (Fédération Internationale Féline, 2012).

EMS	Barva	EMS	Barva
n	černá	j	lilově želvovinová
a	modrá	o	skořicová/červenohnědá
b	čokoládová	p	plavá
c	lilová	q	skořicově želvovinová
d	červená	r	plavě želvovinová
e	krémová	w	(dominantně) bílá
f	(černě) želvovinová	s	stříbřitá/kouřová
g	modře želvovinová	y	zlatá
h	čokoládově želvovinová	x	neuznané zbarvení srsti

Malá písmena „s“ a „y“ tvoří doplňkový kód označující typ depigmentace srsti (tipping). Malé písmeno „x“ se u některých plemen předsazuje před kód zbarvení (jestliže je neuznaná barevná varieta registrována), jinak kód zbarvení nahrazuje. Příklad: EUR x označuje neuznanou barevnou varietu evropské kočky.

Tabulka 3: EMS kódy exteriérových znaků podle FIFE (Fédération Internationale Féline, 2012).

Kódy bílé skvrnitosti		Kódy zkrácení ocasu	
01	bíle skvrnitá typu „van“	51	manx rumpy
02	bíle skvrnitá typu „harlekýn“	52	manx rumpy riser
03	bíle skvrnitá typu „bikolor“	53	manx stumpy
04	bíle skvrnitá typu „mitted“ (RAG)	54	manx longie
05	bílá skvrnitost (SNO)	Kódy zbarvení očí	
09	s nspecifikovanými bílými skvrnami	61	modré oči
Kódy depigmentace srsti		62	oranžové oči
11	stínovaná (shaded)	63	nestejně zbarvené oči (odd eyes)
12	závojová (shell)	64	zelené oči
Kódy typu kresby		65	barmsky žluté oči
21	nespecifikovaná kresba	66	tonkinsky tyrkysové oči
22	mramorovaná (blotched)	67	siamsky modré oči
23	tygrovaná (mackerel)	Kódy postavení uší	
24	tečkovaná (spotted)	71	vzpřímené
25	s tikingem (ticked)	72	curled
Kódy snížené intenzity pigmentace		73	fold
31	barmská pigmentace (burmese)		
32	tonkinská pigmentace (tontanese)		
33	siamská pigmentace (siamese)		

3.3 Nejčastěji chovaná plemena koček a charakteristika zbarvení jejich srsti

Plemenem nazýváme skupinu zvířat jednoho druhu, vyznačující se stejnými užitkovými a exteriérovými vlastnostmi, odlišnými od vlastností zvířat téhož druhu, které přenáší za stejných podmínek prostředí na potomstvo. Skupina musí být tak velká, aby při páření nedocházelo k příbuzenské plemenitbě. Jestliže se v rámci plemene vyskytují menší skupiny zvířat, odlišující se od základního standardu plemene jen menšími odchylkami některých exteriérových znaků, mluvíme o varietách v rámci plemene (Vařejčko, 1984). Ke vzniku plemene vede dosti obtížná cesta. Při uznávacím řízení je nutné předvést určitý přesně stanovený počet zvířat z několika po sobě následujících generací, která musejí vykazovat

standardní exteriér. Proto ke vzniku nového plemene chovatelé většinou potřebují deset i více let, než je plemeno připraveno k uznání. Chovatelské federace vydávají přesné popisy exteriéru jednotlivých plemen, nazývané standardy. V této práci se budu zabývat standardy federace FIFe (Fédération International Féline), protože většina chovatelů koček u nás je prostřednictvím Českého svazu chovatelů členy právě této organizace (Říhová, 1999).

Plemena koček jsou rozdělena do čtyř základních kategorií:

- I. kategorie – perské a exotické kočky,
- II. kategorie – polodlouhosrsté kočky,
- III. kategorie – krátkosrsté kočky,
- IV. kategorie – siamské a orientální krátkosrsté kočky.

3.3.1 Perské kočky

Toto plemeno u nás zatím stále ještě početně převažuje nad všemi ostatními plemeny. K jejich šlechtění byly používány jak kočky dovezené z Persie, tak z Turecka a Ruska. Vůbec první dlouhosrsté kočky pocházely z Turecka (Říhová, 1999).

Celková charakteristika: mají zavalité tělo masívní stavby, se širokou a kulatou hlavou na krátkém, silném krku, plné tváře, tupý a krátký nos a tupou, velkou bradu. Rámce jsou velkého nebo středního. Uši mají co nejmenší, ve špičce zakulacené a daleko od sebe posazené. Oči mají velké a kulaté. Končetiny mají poměrně krátké a silné. Srst mají dlouhou, hebkou, hustou, odstávající od těla a tvořící na krku límec. Barva srsti musí být u jednobarevných plemen stejná po celém těle, bez kresby nebo stínování, u žíhaných plemen musí být kresba výrazná a jasná, dobře ohraničená od základní barvy. U kouřových perských koček, kamea a činčil musí být jasný rozdíl mezi barvou podsady, spodní částí chlupů a jejich konečky (Vařejčko, 1984).

Bílá perská kočka

Srst musí být čistě leskle bílá, bez jakékoliv kresby nebo stínování. Nosní zrcadlo a polštářky tlapek jsou růžové. Bílé perské kočky mohou mít tři různé barvy očí – sytě modré, měděné, anebo jedno oko modré a druhé měděné (Rixon, 1995).

Černá perská kočka

Černá perská kočka je jedním z nejstarších čistokrevných plemen, zároveň je však nejobtížnější dosáhnout u ní vrcholné výstavní kvality. Srst musí mít hustou, uhlově černou od kořínků po špičky, bez náznaku tippingu, kresby nebo stínování a bez jediného bílého chlupu. Barva očí je zářivě měděná nebo oranžová (Rixon, 1995).

Červená perská kočka

Srst musí být sytě, čistě a zářivě červená, bez náznaku kresby nebo stínování či tickingu. Barva očí je měděná.

Krémová perská kočka

Požadavky na barvu srsti se mezi USA, Velkou Británií a Evropou liší. Standard americké CFA požaduje souvislou vrstvu krémové až ke kořínkům chlupů, přednostně ve světlejších odstínech. Britský standard GCCF požaduje čistý, výrazně světlý odstín až po středně syté zbarvení bez kresby anebo jiných odznaků. Standard FIFe požaduje světlou, čistou, pastelově krémovou barvu bez hřejivých odstínů anebo bez jakéhokoli světlejšího stínování anebo kresby, přičemž zbarvení má být syté a rovnoměrné od kořínků chlupů až po pesíky. Barva očí je zářivě měděná (Rixon, 1995).

Modrá perská kočka

Rozšířené plemeno perských koček, jehož barva srsti může mít jakýkoliv odstín modré barvy, ale modř musí být čistá a rovnoměrná, bez bílých chlupů nebo skvrn. Oči má kulaté, dobře otevřené, oranžové nebo tmavě měděné, bez jakýkoliv stop zelené barvy (Vařejčko, 1984).

Modro-krémová perská kočka

Modro-krémová perská kočka je považována za novou varietu. Modro-krémové zbarvení je důsledkem působení ředícího genu pro barvy u želvovinové kočky, takže se místo černých a červených skvrn objevují modré a krémové. Evropská FIFe označuje modro-krémové jako modré želvovinové a zbarvení má být světle modrošedé a světle krémové, v ohraničených nebo splývavých skvrnách, přičemž jsou obě barvy rovnoměrně rozloženy na těle, nohou i ocase (Rixon, 1995).

Černá kouřová perská kočka

Je plemenem perských koček, jehož krása je založena na kontrastech vyplývajících ze zbarvení srsti. Podsadu má popelavě bílou, zatímco ostatní srst a konečky pesíků jsou černé. Oči má oranžové nebo měděné barvy (Vařejčko, 1984).

Kameo perské kočky

Kameo perské kočky byly poprvé vyšlechtěny ve Spojených státech v roce 1954 jako výsledek křížení kouřových a želvovinových koček neúplného typu. Kameo kočata se rodí téměř bílá a jemné zbarvení se u nich vyvíjí s věkem. Existují tři intenzity zbarvení: shell je velmi světlé, stínované o něco tmavší a kouřové nejtmaší kameo (Rixon, 1995).

Dvoubarevná perská kočka

Dvoubarevná kočka může mít jakoukoliv jednotnou barvu kombinovanou s bílou: černou s bílou, modrou s bílou, červenou s bílou nebo krémovou s bílou. Barevné plochy mají být jasně ohraničeny a rovnoměrně rozloženy a nemají zabírat více než dvě třetiny plochy těla, naopak bílá nemá přesahovat polovinu plochy. Obličej musí mít dvoubarevnou kresbu (Rixon, 1995).

Žíhané (tabby) perské kočky

Klasická žíhaná (někdy nazývaná mramorovaná) kresba vyžaduje dokonalé husté pruhy a skvrny, jasně ohraničené a široké. Nohy musejí být stejnoměrně pruhované a pruhy se dotýkají kresby na těle. Ocas má stejnoměrné prstence. Na krku je několik náhrdelníků, na čele zřetelná kresba „M“ (skarabeus) a od vnějšího očního koutku se táhne nepřerušovaná tmavá linka. Víry na tvářích a svislé linie na zadní straně se dotýkají kresby na ramenou, která má tvar motýlích křídel. Na hrudi a bříše může být dvojitá vodorovná řada „knoflíků“ (Rixon, 1995).

Želvovinová perská kočka

Barva srsti této perské kočky se skládá z barev černé a červené. Ty musí být od sebe odděleny jako dobře ohraničené skvrny, a to i v obličejí. Barvy mají být teplé a jasné. Barva očí je měděná (Vařejčko, 1984).

Perská kočka želvovinová s bílou

Líbivá perská kočka, u níž barvy černá a červená jsou kombinovány s bílou barvou, přičemž mají být dobře rozděleny v ohraničených skvrnách a ostře odlišeny od bílé barvy, a to i na hřbetě. Barvy černá a červená musí tvořit maximálně dvě třetiny a minimálně jednu polovinu povrchu těla, zbytek bílý (Vařejčko, 1984).

Perská kočka stříbřitá činčila

Kočka má čistě bílou podsadu a černý tipping na hlavě, hřbetě, bocích a ocase, který jí dodává typický kovově lesklý vzhled. Nohy mohou být lehce stínované. Brada, srst v uších, hrud' a břicho jsou čistě bílé a lemy očí, pysky a čenich jsou černé. Oči jsou zelené nebo modrozelené (Rixon, 1995).

Perská kočka zlatá činčila

Kočka má bohatou, teple krémovou podsadu se seal (tulením) tippingem na hlavě, hřbetě, bocích a ocase, který jí dodává zlatavý vzhled. Nohy mohou být lehce stínovány ve stejné barvě a také oči, pysky a nos jsou lemovány v seal hnědé. Oči mají zelenou nebo zelenomodrou barvu (Rixon, 1995).

3.3.2 Polodlouhosrsté kočky

Tato skupina plemen ušlechtilých koček, tvořící jakýsi přechod k dlouhosrstým plemenům perských koček, byla jako samostatná uznána FIFE v roce 1981 a je značně variabilní ve svých fenotypových projevech.

Od dlouhosrstých koček perských se tato plemena liší především poněkud delší hlavou více trojúhelníkovitého tvaru, delšíma ušima, vyššími končetinami, delším tělem a především délkou a kvalitou srsti. Ocas mají delší než perské kočky a je huňatý.

Patří sem birmy, turecká kočka van, norská lesní kočka, somálská kočka a mainská mývalí kočka (Vařejčko, 1984).

Mainská mývalí kočka

Je jedním z největších plemen domácích koček, s průměrnou hmotností kocourů 6 až 8 kg, výjimečně přes 10 kg, koček 5 kg. Pochází ze státu Maine v USA, kde se chová asi od roku 1860 pro svoji sílu, inteligenci a odolnost k podmínkám prostředí.

Je to středně velká až velká kočka s dlouhým tělem na vysokých nohou, se středně širokou hlavou a kvadratickým nosem, s velkýma ušima se štětičkami, s velkýma, lehce šikmo postavenýma očima a s dlouhým, huňatým ocasem s vlající srstí. Srst s hedvábnou texturou má hustou, volně splývající, na hlavě a plecích kratší než na břicho a zadních končetinách, tvořící výrazný límec. Srst je v létě kratší, v zimě delší, jen ocas je stále stejně huňatý (Vařejčko, 1984). Mainská mývalí kočka je uznávána ve všech barvách kromě kresby typu himálajské a barmské a dále kromě čokoládové, skořicové, lila nebo plavé. Mezi zbarvením srsti a očí není přímá vazba, i když za žádoucí jsou považovány zářivé barvy očí (Rixon, 1995).

3.3.3 Krátkosrsté kočky

Do této kategorie plemen koček patří Habešská kočka, Britská krátkosrstá kočka, Kartouzská kočka, Manská kočka, Skotská klapouchá kočka, Evropská krátkosrstá kočka, Americká krátkosrstá kočka, Egyptská kočka mau a další. O co menší je v této skupině variabilita délky srsti, o to větší jsou rozdíly mezi jednotlivými plemeny v tělesné stavbě (Říhová, 1999).

Britská krátkosrstá kočka

Britské krátkosrsté kočky jsou středně velké až velké svalnaté kočky, se širokým hrudníkem, dobře osvaleným hřbetem a plecemi, krátkými a zavalitými končetinami se silnými, kulatými tlapkami a silným, poměrně krátkým ocasem se zakulacenou špičkou. Hlavu mají kulatou a masivní s krátkýma, široce nasazenýma a lehce zakulacenýma ušima. Oči mají velké, kulaté, široce otevřené a daleko od sebe posazené, v barvě odpovídající barvě srsti. Srst mají krátkou a hustou, jemné textury, nepřiléhající, s dobře vyvinutou podsadou. Jednotlivá plemena se od sebe liší především barvou srsti (Vařejčko, 1984).

Modrá britská krátkosrstá kočka

Britská modrá kočka docela jistě patří mezi ty, které nejčastěji dosáhnou náročných výstavních standardů. Srst musí mít velmi vyrovnané zbarvení v modrém odstínu, přičemž se dává přednost světlejším. Nejsou přípustné žádné náznaky žihání nebo bílé chlupy. Nosní zrcadlo a polštářky tlapek jsou modré a oči zlaté, oranžové a měděné (Rixon, 1995).

Evropské krátkosrsté kočky

Evropské krátkosrsté kočky se od domácích bezplemenných koček liší jen ustálenými plemennými znaky, kondicí a lepší kvalitou srsti. Tělo mají středně velké až velké, robustní, silné a svalnaté, s kulatým a dobře vyvinutým hrudníkem. Končetiny mají pevné a silné, středně dlouhé, stejnoměrně se zužující k pevným a kulatým tlapkám. Ocas je středně dlouhý, s širším nasazením, tenčící se ve svém průběhu a končící zaoblenou špičkou. Hlavu mají přiměřeně velkou, se zakulaceným obličejem, který je poněkud delší než širší. Uši jsou středně velké, s lehce zakulacenými špičkami. Oči mají kulaté, otevřené, daleko od sebe a lehce šikmo postavené, jasné a podle jednotlivých plemen v barvě zelené, žluté, měděné nebo modré. Srst je krátká, hustá, pevná a lesklá (Vařejčko, 1984).

3.3.4 Siamské a orientální krátkosrsté kočky

Čtvrtá kategorie plemen zahrnuje čtyři plemena, která jsou zcela uniformní v typu a všechna byla odvozena od jediného výchozího plemene - siamské kočky. Společným znakem těchto plemen je velmi štíhlá a elegantní stavba těla (Říhová, 1999). Ze všech nejrůznějších plemen jsou siamské kočky nejnadhěji rozpoznatelné. Dlouhé, pružné a elegantní se svými nápadnými tmavšími „znaky“ mají vždy velký půvab. První siamské kočky měly sklon k šilhání a jejich ocasy mívaly deformace, což je dnes považováno za vážné chyby. To všechno však už bylo selektivním křížením v podstatě odstraněno a moderní kočka tyto vady nemívá (Cutts, 2002).

Siamské kočky

Pro svou eleganci, bystrost a pohyblivost jsou jedním z nejoblíbenějších ušlechtilých plemen krátkosrstých koček ve všech chovatelsky vyspělých zemích světa. Charakteristickým znakem této plemenné skupiny je tzv. akromelanismus, což znamená tmavé zbarvení koncových částí těla (Vařejčko, 1984).

Kočky se sépiovými odznaky byly chovány britskými a americkými diplomaty na královském dvoře v Siamu už koncem 19. století a plemeno získalo veřejný zájem, který stále roste. Ačkoliv původní královské siamské kočky měly sépiové odznaky, některé byly zbarveny trochu světleji a nakonec byly uznány jako zvláštní barevná varieta s čokoládovými odznaky. Přirozeně se vyskytující ředící gen se projevuje také tehdy, když místo téměř

černých odznaků vzniknou odznaky břidlicově šedé. Ty pak byly přijaty jako varieta s modrými odznaky (Rixon, 1995).

Moderní siamské kočky jsou štíhlé, elegantní, s protáhlou hlavou a dlouhým, tenkým ocasem. Tělo mají středně velké, dlouhé, štíhlé a svižné, na dlouhých, poměrně jemných končetinách s malými, oválnými tlapkami. Zadní končetiny jsou poněkud delší než přední. Krk mají dlouhý a jemný, ocas dlouhý, rovný a zašpičatělý (Vařejčko, 1984). Hlava je středně velká vzhledem k tělu, klínovitá s rovnými liniemi – klín začíná u nosu a postupně se rozšiřuje a tvoří souvislou linii s vnějšími okraji boltců (Rixon, 1995). Uši mají velké, vzpřímené, široké v místě nasazení a daleko od sebe rozestavené. Také oči jsou od sebe daleko posazené, vůči nosu šikmo položené, orientálního tvaru, intenzivní modré barvy. Srst je velmi krátká, jemná v textuře, lesklá a těsně přiléhající. Rozdíl mezi barvou srsti na těle a barvou odznaků musí být zřetelný. Kořata se rodí téměř bílá, k tmavnutí odznaků dochází postupně (Vařejčko, 1984).

3.4 Molekulární mechanismy tvorby pigmentů srsti

3.4.1 Pigmentace srsti

Pigmentace kůže a srsti savců

Za zbarvení srsti savců je zodpovědný melanin (Ruvinsky a Sampson, 2001; Dostál, 2007). Melaniny jsou syntetizovány a ukládány v melanosomech, které se nacházejí v melanocytech (Hearing, 2005). Melanocyty mají původ v neuroektodermu. Melanocyty se během embryonálního vývoje přesouvají z neurální lišty do kůže. Po dokončení migrace zaujmou melanocyty svá místa v epidermis a v chlupových folikulech, kde se v jejich blízkosti nacházejí keratinocyty. Melanocyty vysílají ke keratinocytům své štíhlé dendritické výběžky, kterými zajišťují přísun pigmentu (Freinkel a Woodley, 2001).

Pigmentace kůže a srsti má přímý vztah k přítomnosti melanocytů. Pigmentace dále závisí i na stupni melanogenní aktivity či aktivitě exocytózy. Mezi nejčastější mechanismy redukce pigmentace patří nepřítomnost melanocytů nebo jejich inaktivita (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Každý chlup se skládá ze dřene (meduly) a kůry (kortexu) s tenkou kutikulou. Dřeň má jednu nebo více řad buněk střídajících se s mezerami vyplněnými vzduchem. Bylo vyzkoumáno, že výsledné zbarvení srsti vzniká kombinací sedmi různých způsobů

modifikace pigmentových granulí. Jsou to barva granulí, tvar granulí (podlouhlé, oválné, kulaté, nepravidelné), počet granulí v buňkách meduly, počet granulí v kortexu, rozvrstvení granulí do řídkých nebo hustých shluků, velikost granulí, uložení granulí ve vnitřní či venkovní části meduly (Willis, 1989; Dostál, 2007).

Pigmenty

Melaniny existují ve dvou základních typech (eumelanin, feomelanin) a jsou tvořeny různým množstvím tyrosinu a cysteinu (Ruvinsky a Sampson, 2001). Eumelanin s černým nebo hnědým zbarvením obsahuje především tyrosin, červenožlutý feomelanin obsahuje mimo tyrosinu i proměnlivé množství cysteinu (Hearing a Tsukamoto, 1991; Ruvinsky a Sampson, 2001; Candille et al., 2007). Melanocyty dokáží vytvořit eumelanin i feomelanin, ale ne oba zároveň. Produkce eumelaninu je podmíněna melanocyty stimulujícím hormonem (α MSH). Na povrchu melanocytů se nacházejí receptory (*MC1R*), které váží tento hormon (Ruvinsky a Sampson, 2001). Pokud dojde k navázání α MSH na receptor, aktivuje se adenylátcykláza a zvýší se koncentrace cAMP, který následně aktivuje proteinkinázu A (PKA), následkem čehož melanocyt syntetizuje eumelanin. V případě, že tento signál není přítomen, z důvodu absence MSH či povrchových receptorů, melanocyty produkují feomelanin (Ruvinsky a Sampson, 2001). *MC1R* může být aktivován α MSH a inhibován antagonistou *ASIP* – agouti signal proteinem (Hearing, 2005). Význam genu kódujícího protein *MC1R* pro tvorbu pigmentu srsti savců popisují rovněž Mountjoy et al. (1992) a Robbins et al. (1993). Často používaný model pro studium dědičnosti zbarvení srsti savců je myš domácí. Význam mutací genu *ASIP* pro výsledné zbarvení myši popisují Bultman et al. (1992) a Hustad et al. (1995).

Melaniny se tvoří katalýzou z tyrosinu a cysteinu (Ruvinsky a Sampson, 2001). Enzym tyrosináza katalyzuje tři různé reakce v biosyntetické dráze melaninu (Hearing a Tsukamoto, 1991). První reakcí je hydroxylace tyrosinu na 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA). Tato reakce je rozhodující. Ve druhé reakci dojde k oxidaci DOPA na dopachinon (DQ) a v poslední reakce je oxidace 5,6-dihydroxyindolu (DHI) na indolchinon. Druhá a třetí reakce může probíhat spontánně při fyziologickém pH (Hearing a Tsukamoto, 1991; Hearing, 2005). Eumelanin vzniká z metabolitů dopachromu a feomelanin vzniká z metabolitů cysteinyl DOPA (Hearing a Tsukamoto, 1991).

Geny řídící produkci pigmentů v srsti savců.

Na melanocyty působí mnoho vnitřních a vnějších faktorů, například UV záření, melanocyty stimulující hormon (α MSH), agouti signal protein (*ASIP*), endothelin 1 (*ER1*), dickkopf 1 (*DKK1*). Pro melanogenezi jsou také nezbytné další dva proteiny – tyrosinase-related protein 1 (*TYRP1*) a tyrosinase-related protein 2 (*TYRP2*) (Ruvinsky a Sampson, 2001). Schmidt-Künsel et al. (2005) zjistili, že mutace genu *TYRP1* může vést k čokoládovému a skořicovému zbarvení srsti. Ishida et al. (2006) popisují jednonukleotidovou delecii v genu *MLPH* (Melanophilinu), která vede ke zředění základního zbarvení srsti kočky domácí. Tato mutace se projeví pouze tehdy, pokud obě alely nesou výše uvedenou jednonukleotidovou mutaci.

Řízení funkce melanocyty je složité, některé lokusy zasahují do buněčné diferenciaci, jiné ovlivňují morfologii melanocyty nebo jeho schopnost ukládat melanosomy do rostoucího chlupu či pokožky. Další lokusy ovlivňují enzymy a související proteiny zodpovědné za melanogenezi. Na některých lokusech nacházíme alely, které působí na interakci α MSH s receptory melanocyty. Vzájemná interakce všech těchto lokusů má vliv na konečný fenotyp (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Lyons et al. (2005) a Imes et al. (2006) popsali význam mutací genu pro biosyntézu tyrozinázy (*TYR*) pro vznik albinotického zbarvení kočky domácí. Lyons et al. (2005) zjistili, že mutace *TYR* genu je zodpovědná rovněž za typické siamské a barmské znaky kočky domácí.

3.4.2 Agutí kresba a melanismus

Biochemické podstata melanismu u kočkovitých šelem

Dědičnost melanismu může odpovídat mutaci recesivního i dominantního charakteru. U kočkovitých šelem se předpokládá, že se jedná o recesivní typ mutace stejně jako je tomu u myši (Jackson, 1994). Robinson (1976) a Lightner (2009) předpokládají, že u kočky domácí bude kandidátní úlohu hrát mutace genu *ASIP*. Tento závěr však nelze zobecnit pro všechny kočkovité šelmy, protože u jaguára amerického (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) se melanismus dědí dominantně v důsledku mutace genu *MC1R* (Ditrich, 1979). Eizirik et al. (2003) uvádějí, že gen *MC1R* má obdobnou strukturu jako homology tohoto genu u ostatních savců (Kias et al., 1998, Klungland et al., 1995).

Eizirik et al. (2003) se velice detailně zabývají problematikou molekulární genetiky a evoluce melanismu u kočkovitých šelem, tito autoři jako první mapovali, klonovali a sekvenovali homology genu *ASIP* a *MC1R* u kočkovitých šelem. U kočky domácí byl gen *ASIP* lokalizován na chromozómu A3. Gen *MC1R* byl identifikován na chromozómu E2. V obou dvou případech pozice těchto dvou genů odpovídá mapě lidského genomu.

Eizirik et al. (2003) zjistili, že kočičí *ASIP* gen je tvořen třemi kódujícími exony. Počet kódujících exonů genu *ASIP* u kočky domácí je identický jako u ostatních savců (Bultman et al., 1992). Rozdíly oproti jiným savcům byly zjištěny v sekvenci i délce výše zmíněných exonů (Eizirik et al., 2003).

Eizirik et al. (2003) se ve svých experimentech věnovali rovněž sekvenačním analýzám genu *ASIP* u velkého množství koček s aguti i melanistickým zbarvením. Zjistili, že u všech melanisticky zbarvených zvířat byla detekována dinukleotidová delece (*ASIP* $-\Delta 2$) v pozici 123-124 nukleotidu. U melanistických koček se tato mutace vyskytovala vždy homozygotní sestavě. Na základě bioinformatického zpracování získaných sekvencí Eizirik et al. (2003) zjistili, že tato mutace vede k posunu čtecího rámce a protein kódovaný zmutovaným genem kompletně ztrácí aktivitu C-terminální domény.

Kromě kočky domácí se Eizirik et al. (2003) věnovali ve svých experimentech dalším 20 druhům kočkovitých šelem. U sedmi z hodnocených druhů byl charakteristický výskyt melanismu, jsou to jaguár americký (*Panthera onca* Linnaeus, 1758), levhart skvrnitý (*Panthera pardus* Linnaeus, 1758), jaguarundi (*Herpailurus yagurundi* E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803), kočka Temminckova (*Catopuma temnicki* Vigors & Horsfield, 1827) ocelot stromový (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775), kočka slaništní (*Oncifelis geoffroyi* d'Orbigny & Gervais, 1844), kočka pampová (*Lynchailurus colocolo* Molina, 1782). U všech jaguárů s melanistickým zbarvením však nebyla zjištěná shodná mutace (*ASIP* $-\Delta 2$) jako u kočky domácí. Eizirik et al. (2003) tudíž vyslovili hypotézu, že melanistické zbarvení bude zřejmě způsobeno mutací genu *MC1R*. Tento výsledek odpovídá i dominantnímu způsobu dědičnosti černého zbarvení srsti jaguárů chovaných v zajetí. Sekvenační analýzou autoři zjistili 15 bp deleci v genu *MC1R*, která vedla k záměně aminokyselinového složení kódovaného proteinu.

U jaguarundi Eizirik et al. (2003) hodnotili větší počet jedinců s variabilním zbarvením srsti od tmavě šedočerné až po červenou. Ani u jednoho z hodnocených zvířat nebyla popsána kauzální mutace genů *ASIP* a *MC1R* (*ASIP* $-\Delta 2$ a *MC1R* $-\Delta 15$). U tohoto druhu byla identifikována nová mutace genu *MC1R*, která spočívala v deleci 24 bp exonové

části (*MCRI-Δ24*). Autoři předpokládají, že tato mutace má kodominantní charakter a je tudíž zodpovědná za poměrně velkou variabilitu zbarvení jaguarundi.

3.4.3 Tvorba červeného pigmentu v srsti kočky domácí

Schmidt-Küntzel et al. (2009) uvádějí, že přesný biochemicko-genetický mechanismus tvorby tohoto pigmentu nebyl doposud u kočky domácí popsán. Červené zbarvení srsti, které je v anglosaské literatuře označováno častěji jako oranžové (lokus *O*-orange) je charakteristické vazbou na gonozóm X s dědičností křížem. Tento způsob dědičnosti byl charakterizován řadou autorů, jako jsou například Wright (1918) a Doncaster (1904). Vela et al. (1999) předpokládají, že oranžovožluté zbarvení je výsledkem působení feomelaninu v srsti. Tento typ feomelanistického zbarvení byl popsán u řady živočichů (myš, skot, kuň, prase, člověk, pes, medvěd, králík a kur domácí). Příčinou červeného zbarvení výše jmenovaných druhů je mutace genu *MCIR* (Klungland et al., 1995, Kias et al., 1998, Fontanesi et al., 2006). Výše citovaní autoři předpokládají, že mutace genu *MCRI* vykazuje autozomální dědičnost. Rovněž u kočky domácí byla popsána řada mutací genu *MCRI* a bylo rovněž potvrzeno, že gen *MCIR* je u kočky lokalizován na autozómu E2 (Eizirik et al., 2003). Vzhledem k tomu, že červené zbarvení kočky je charakteristické dědičností křížem, která odpovídá lokalizaci kauzálního genu na gonozómu X, nelze proto předpokládat, že gen *MCIR* bude zodpovědný za červené zbarvení srsti. Obdobný způsob dědičnosti červeného zbarvení srsti (vazba na gonozóm X) byl zjištěn u savců pouze u křečka syrského (*Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839), který popsal Robinson (1966). Mapování genu zodpovědného za červené zbarvení křečka syrského provedli Alizadeh et al. (2009). Autoři prokázali, že tento gen je rovněž lokalizován na gonozómu X.

Mapováním předpokládaného genu *O* pro červené zbarvení srsti koček se zabývali Schmidt-Küntzel et al. (2009). Ve svých experimentech se zaměřili na mapování s využitím mikrosatelitních markerů, u kterých je předpokládána vazba na gonozóm X. Tyto markery byly lokalizovány na q rameni gonozómu X. Pro experimenty byla použita potomstva dvou záměrných křížení, u kterých docházelo k segregaci oranžového a aguti respektive černého zbarvení srsti. Na těchto dvou potomstvech autoři zjistili, že určité alely mikrosatelitních markerů FCA1465, FCA1466, FCA1468, FCA1494, FCA1496 a FCA1498 vykazovaly nejtěsnější vazbu s předpokládaným genem *O*.

3.5 Genetika zbarvení srsti u koček

3.5.1 Monogenní model dědičnosti zbarvení srsti

Mendelovy zákony patří mezi základní genetické principy, a ačkoli byly původně prováděny na hrachu, mají obecnou platnost. Také v genetice koček tato pravidla platí a jsou dobrým základem ke šlechtitelské a chovatelské praxi. Mendelovy zákony můžeme dobře demonstrovat na páření koček, která se v chovu naprosto běžně provádějí (Říhová, 1999).

Pravidlo uniformity F_1 generace, štěpení a identity reciprokých křížení. Při křížení rozdílných homozygotních jedinců parentální generace je první filiální generace vždy uniformní (Vařejčko, 1984). Jako příklad poslouží páření siamského kocoura ($c^s c^s$) s orientální kočkou s homozygotním založením pro plné zbarvení (CC). Všichni jejich potomci budou stejní, heterozygotně založení (Cc^s) s plným zbarvením srsti. Ke stejnému výsledku dojdeme, budeme-li provádět reciproké křížení (Říhová, 1999).

Pravidlo čistoty vloh. Při páření jedinců s dominantními alelami s jedinci s alelami recesivními se tyto alely navzájem nemísí, ale alely recesivní zůstávají nezměněné, i když se v heterozygotním stavu nemohou projevit. Jakmile se dostanou do homozygotního stavu, znovu se projeví ve fenotypu (Vařejčko, 1984). K důkazu toho, že vlohy přecházejí do pohlavních buněk čisté a uchovávají si samostatnost, použil Mendel tzv. zpětné křížení. Křížil heterozygotního potomka z generace F_1 s jeho homozygotním rodičem. V našem případě půjde o páření heterozygotního orientálního jedince (Cc^s) s jeho siamským rodičem ($c^s c^s$). Výsledkem tohoto páření jsou obě rodičovské formy v generaci B_1 – totiž orientální i siamská kořata (Říhová, 1999).

Pravidlo volné kombinovatelnosti vloh. Liší-li se rodiče od sebe dvěma nebo více páry vloh, dědí se při křížení tyto jednotlivé páry vloh zcela nezávisle na sobě, tzn., že alely genů od otce a matky se volně kombinují. Toto pravidlo doplnil Morgan v tom smyslu, že platí jen tehdy, když je každý pár vloh na jiném chromozómu. Tím je vysvětlena možnost vzniku velkého množství kombinací u potomstva. U koček je z genetického hlediska nejzajímavější především typ, délka a barva srsti, která je podmíněna geny velkého účinku, jejichž projevy se řídí Mendelovými pravidly (Vařejčko, 1984). Toto pravidlo můžeme dobře ukázat na páření dvou černých orientálních koček, které jsou heterozygotní jednak pro barevné ředění (d), jednak pro siamské zbarvení (c^s). Rodiče se tedy liší ve dvou párech vloh ($Cc^s Dd$) – jedná se zde o bifaktoriální dědičnost. Výsledkem páření těchto zvířat je stálý, neměnný štěpný poměr potomků (který se však projeví jen při dostatečném počtu

odchovaných zvířat): 9 černých orientálních potomků, 3 modří orientální potomci, 3 černí siamští potomci a jeden modrý siamský potomek (Říhová, 1999).

3.5.2 Známé lokusy řídící barvu srsti a lokalizované na autozomech

Lokus A

Označení aguti je obecné označení pro barvu původních nebo divokých typů mnoha zvířecích druhů. Gen, který je zodpovědný za regulaci distribuce tmavého pigmentu (eumelaninu) se nazývá *ASIP* (agouti signaling protein). Aguti alela je označována A, tato alela je dominantní. Aguti zbarvení se projevuje střídáním tmavých a světlých pruhů u jednotlivých chlupů – ticking. Genotypy AA nebo Aa umožňují projev kresby na srsti kočky.

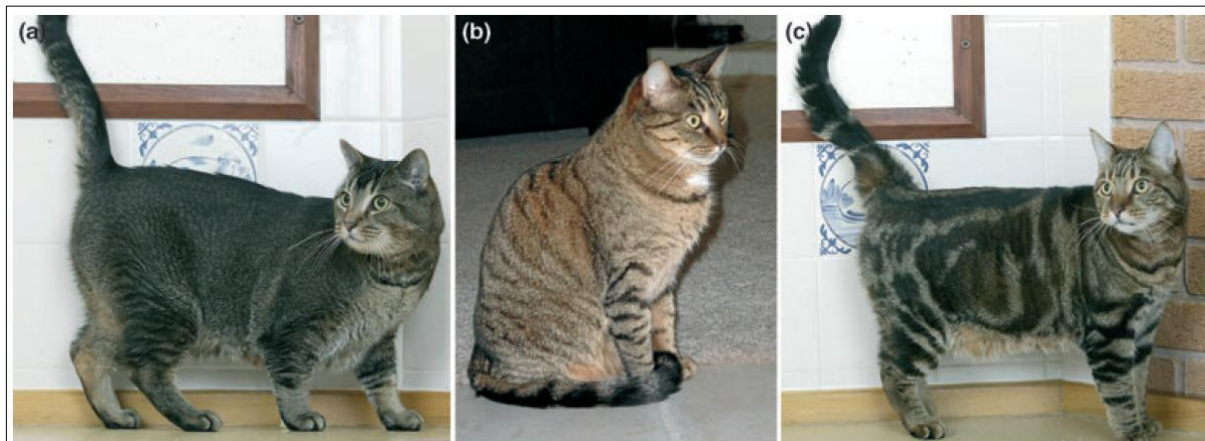
Dominantní alela A podmiňuje nestejnou pigmentaci chlupů – ticking, takže se na nich tvoří v průběhu délky úseky světlejší a tmavší. V některých případech jsou tmavé jen špičky chlupů. Je v interakci s alelami genu T^a , T^s , T^m a t^b (Vařejčko, 1984).

Recesivní alela a podmiňuje jednotné zbarvení srsti bez kresby nebo tickingu. Tento gen je recesivně epistatický vůči alelám genů T^a , T^s , T^m a t^b (Vařejčko, 1984). Díky absenci zbarvení aguti se kresba srsti ztratí a celá kočka má jednobarevné, neboli plné zbarvení, které se také označuje jako self nebo solid colour. U plemen koček se plné zbarvení vyskytuje velmi často, u některých plemen je také jediným uznaným (ruská modrá a podobně). Podle přítomnosti dalších genů pro zbarvení může jít o variety černou, čokoládovou, modrou, skořicovou a další (Říhová, 1999).

Lokus T

Za případnou přítomnost kresby zodpovídá T lokus (alelická série $T^a > T^s > T^m > t^b$) (Eizirik et al., 2003). Na obrázku 1, který je převzatý z práce Lyons et al. (2006), jsou uvedeny typické fenotypy koček s různými alelickými kombinacemi lokusu T.

Obrázek 1: Různé typy tabby kresby (a - habešská, b – tygrovaná, c – mramorovaná) – upraveno podle Lyons et al. (2006)



Se zbarvením aguti se setkáváme u řady plemen, ať již v kombinaci s některou z kreseb, nebo jako se samostatnou barevnou varietou jako u mainské mývalí kočky, norské lesní kočky, turecké angory a sibiřské kočky (Říhová, 1999). Problematiku výskytu jednotlivých typů kreseb odpovídající aguti zbarvení u populacích kočky divoké pocházejících z Evropy a Sardinie studovali Ragni a Possenti (1996). Ve svých experimentech se zaměřili zejména na hodnocení variability zbarvení srsti na hlavě, v oblasti lopatek, hřbetu, boků a ocasu. Zjistili, že existuje variabilita v typu aguti kresby nejen mezi domestikovanými kočkami, ale rovněž i v populaci divokých koček. Molekulární podstata vzniku aguti zbarvení byla popsána v předcházející kapitole 3.4.2.

Kresby srsti – tabby variety

Pod názvem tabby se rozumějí obecně různé typy kresby srsti u koček. Slovo pochází od bagdádské čtvrti Al Attabiya, kde se vyráběly zvláštní, měnivé látky, které zřejmě dřívějším chovatelům připomínaly zbarvení koček (Říhová, 1999). Lyons et al. (2006) předpokládají, že dominantní alela T^a je zodpovědná za vytváření tmavých pruhů na hlavě, končetinách, ocasu, ale nikoliv na trupu. Dominantní alela T^m je zodpovědná za pruhované zbarvení hlavy, končetin, trupu i ocasu. Recesivní alela t^b řídí vznik pruhů na hlavě, končetinách a ocasu a současně se podílí na vytváření tmavé kruhové kresby na trupu (Lyons et al., 2006). Podmínkou vzniku kreseb srsti je přítomnost alely A- a zároveň vlohy pro některou z kreseb. V současné době se rozlišují čtyři typy kreseb:

Habešská kresba (ticked tabby) je typická výrazným tickingem, dobře viditelným na celé srsti. Na těle tuto kresbu tvoří právě pouze ticking, žádné obrazce netvoří. Na končetinách a ocase však najdeme pruhování, na břicho tečky. Po hřbetě probíhá tmavý pruh až

ke špičce ocasu (úhoří pruh). Tuto kresbu způsobuje alela T^a , která je dominantní nad všemi ostatními typy kreseb u koček. Lyons et al. (2006) předpokládají, že homozygoti $T^a T^a$ mají výrazně intenzivnější pruhování končetin a mohou být tudíž odlišeni od heterozygotů. Lyons et al. (2006) vyslovili hypotézu, že mezi alelou T^a a T^m a alelou T^a a t^b může existovat vztah kodominance. Autoři předpokládají, že heterozygotní genotypy je možné rozlišit na základě zbarvení končetin. Současně však uvádějí, že exprese těchto alel u heterozygotů je značně variabilní a rozlišení těchto alelických variací je velmi obtížné. Tuto kresbu najdeme jen u několika plemen koček, uznaná je u orientálních koček, habešských a somálských koček, kde je jedinou uznanou kresbou. U těchto dvou plemen byla kresba selekcí prošlechtěna tak, že kromě tickingu a úhořího pruhu nemají absolutně žádnou jinou kresbu ani pruhy.

Tygrovaná kresba (mackerel tabby) je podmíněna přítomností alely T^m (Lyons et al., 2006). Je to původní, nejstarší typ kresby, z níž se mutacemi vyvinuly kresby ostatní. Shodný typ kresby má kočka divoká (*Felis silvestris* Schreber, 1777). Tento typ aguti kresby Ragni a Possenti (1996) identifikovali jako nejčastější v populaci evropských divokých koček. Pro tygrovanou kresbu jsou charakteristické vertikálně probíhající pruhy směrem od páteře k břichu. Na hlavě je jemná kresba ve tvaru scarabea, na končetinách a ocase jsou rovněž pruhy. Vloha T^m je dominantní nad vlohou t^b pro mramorované zbarvení. Lyons et al. (2006) zjistili, že heterozygoti $T^m t^b$ se odlišují od homozygotů $T^m T^m$ typem tygrované kresby. U heterozygotů je tygrování často přerušeno nebo tvořeno oddělenými skvrnami. Tygrovaná kresba je u plemen koček i koček domácích velmi častým zbarvením (dobře známá pod lidovým názvem „mourek“).

Mramorovaná kresba (blotched tabby, classic tabby) je tvořena oválnými skvrnami po obou stranách těla a „motýlovitým“ obrazcem na lopatkách. Kresbu na lopatkách považují za významný znak variability ve zbarvení domácích i divokých koček rovněž Ragni a Possenti (1996). Ve svých analýzách zjistili, že tato motýlovitá kresba je charakteristická pouze pro domestikované domácí kočky. Typická mramorovaná kresba nebyla výše citovanými autory zjištěna u žádné divoké kočky evropského ani sardinského původu. Na končetinách a ocase jsou pruhy, ale širší než u předešlé kresby. Mramorování podmiňuje recesivní vloha t^b , tato kresba se tudíž může projevit u recesivních homozygotů (Lyons et al., 2006). Mramorovanou kresbu nalezneme u většiny chovaných plemen.

Tečkovaná kresba (spotted tabby) je typická přítomností kulatých nebo oválných teček na těle. Na končetinách bývají někdy také tečky, ale spíše se setkáváme s pruhy, pruhovaný je také ocas. Na dědičnost tohoto typu kresby se názory genetiků různí. Jedna

teorie praví, že ji podmiňuje nezávislý gen pro tečkování a způsobuje rozpad tygrované nebo mramorované kresby, jiná hovoří o dalších genech na jiných lokusech, které mají tuto kresbu způsobovat, další o tom, že se jedná o heterozygotní stav alel A- a T. Například Eizirik et al. (2010) uvádějí, že tečkovaná kresba je řízená alelou T^s, která se nachází jako druhá nejdominantnější alela alelické série lokusu T. Eizirik et al. (2010) se domnívají, že se zřejmě nejedná o alelickou variantu vykazující jednoduchou mendelistickou dědičnost. Navzdory neobjasněné dědičné podstatě to je nejoblíbenější typ kresby, v níž se chová velmi mnoho plemen, pro některá je to dokonce jediná barevná varieta (egypstská mau, ocicat) (Říhová, 1999).

Lokus B

Lokus B ovlivňuje černé zbarvení a zbarvení od černé barvy odvozená. Na tomto lokusu byly popsány alely pro černou (B), čokoládovou (b) a skořicovou barvu (b¹). Za hnědé zbarvení srsti odpovídají varianty v *TYRPI* genu (tyrosinase-related protein 1) (Lyons et al., 2005). Alela B je původní (wild type) a podmiňuje tmavé zbarvení. Alely genu B jsou sestupně dominantní: tedy B je dominantní nad geny b a b¹, b je dominantní nad b¹. Jinými slovy, abychom získali kočku s čokoládovým zbarvením, musíme spolu pářit rodiče, kteří oba nesou alespoň jednu alelu b – výsledný jedinec pak může mít genotyp bb a je čokoládový (Schmidt-Küntzel et al., 2005).

Zbarvení černé, čokoládové a skořicové

Podstatou odlišných barev srsti koček je různé množství, tvar a také různé rozmístění pigmentových zrněk v jednotlivých chlupech. Část genů, které podmiňují zbarvení srsti, leží na lokusu B, a to geny pro zbarvení černé, čokoládové a skořicové.

Černé zbarvení je jedno z nejméně frekventovaných zbarvení, se kterým se u plemen koček setkáváme. Recesivní, mutovaný gen b pak způsobuje zbarvení čokoládové (hnědé, brown). S tímto zbarvením se setkáváme podstatně méně často. Nejpravděpodobnějším původem tohoto mutovaného genu jsou kočky, dovezené v minulém století z Dálného východu (siamky a barmské kočky) a díky mnoha křížením se tento gen dostal záměrně do genotypů mnoha plemen dalších. Protože se nevyskytoval v přirozených populacích například plemene evropského, sibiřského či mainského mývalího, tato plemena se v něm chovat nemohou, neboť toto zbarvení by svědčilo o nežádoucím přikřížení jiného plemene.

Dalším recesivním genem tohoto lokusu je gen b^1 , pro skořicové, neboli světle hnědé zbarvení (brown light). Občas se v literatuře setkáváme také s názvem sorrel nebo červená nezávislá na pohlaví (non sex linked red). Gen b^1 je recesivní jak vůči genu B, tak vůči genu b. Vyskytuje se u několika plemen, jako jsou habešské a somálské kočky, orientální kočky a rexové. Ze všech genů této skupiny je nejméně frekventovaný (Říhová, 1999). Výsledné zbarvení srsti způsobené jednotlivými alelami genu B je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Vliv alel genu B na zbarvení srsti

Alela	Zbarvení
B	černé zbarvení
b	hnědé (čokoládové) u siamských koček hnědá nebo čokoládová barva odznaků
b1	světle hnědé, skořicové zbarvení

Lokus C

Alely lokusu C patří do tzv. albinotické série: C (full color) > c^b (burmese) = c^s (siamese) > c (complete albido). Gen *TYR* kóduje enzym tyrosinázu, který je nezbytný pro produkci melaninu. V tomto genu byly identifikovány mutace zodpovědné za produkci pigmentů vytvářející zbarvení typické pro siamské a barmské kočky (Schmidt-Küntzel et al., 2005).

Barmské zesvětlení

Vloha pro toto zbarvení (c^b) způsobuje nejmenší úbytek pigmentu ze všech alel této skupiny. Působí jednak celkové zesvětlení srsti, jednak přítomnost nepříliš kontrastních odznaků (maska, uši, končetiny a ocas jsou jen o málo tmavší než tělo). Vlivem této vlohy je barva očí těchto koček jantarová až žlutá. Toto zbarvení je typické pro barmské kočky, které se mohou vyskytovat nejen ve varietě hnědé (ta je ovšem geneticky černá), ale i v řadě zbarvení dalších, které způsobuje přítomnost již výše jmenovaných genů pro různá zbarvení. Alela c^b je recesivní vůči alele C, ale neúplně dominantní vůči alele c^s pro siamské zbarvení, což představuje typ intermediální dědičnosti. Kromě barmských koček se barmské zesvětlení vyskytuje pouze u koček bengálských ve varietě sépiové a u koček plemene rex (Říhová, 1999).

Siamské zesvětlení

Toto zbarvení je charakterizováno modrou barvou očí a značným kontrastem mezi barvou odznaků a těla. Také tato alela způsobuje i celkové zesvětlení srsti včetně zesvětlení barvy odznaků, a tak kočka s černými odznaky neexistuje – její odznaky jsou tmavě hnědé. Alela c^s byla často chovateli záměrně vnášena do genotypu mnoha plemen, aby se tak rozšířila paleta barevných variet. Dnes se s ní setkáme kromě siamek i u koček perských a exotických, britských, birem, ragdollů, a všech typů rexů, a dokonce i u bengálských koček. Typickou vlastností srsti s akromelanickými odznaky je její reakce na chlad. Kočky s odznaky, chované v chladném prostředí, výrazně ztmavnou. Po přemístění do teplejší oblasti a samozřejmě po přelínání opět zesvětlí (Říhová, 1999).

Tonkinské zesvětlení

Toto zesvětlení je charakteristické tím, že je přesně uprostřed mezi siamskými a barmskými odznaky. Podílejí se na něm jak gen c^b pro barmské zesvětlení, tak gen c^s pro siamské zesvětlení, mezi nimiž panuje vztah neúplné dominance genu c^b nad genem c^s . V důsledku toho se oba geny projeví stejnou měrou. Zbarvení očí je tyrkysové barvy. Plemeno tonkinských koček nelze chovat čistokrevně (Říhová, 1999).

Kompletní albinismus

Je podmíněn alelou c^a . Tyto kočky mají vodově modré oči, jsou sporadické a uznávají je pouze v ojedinelých chovatelských klubech v USA, a to v orientálním typu. O existenci červenookých albínů (gen c) mezi kočkami neexistují doložené materiály (Říhová, 1999). Výsledné zbarvení srsti řízené alelami genu C je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5: Vliv alel genu C na zbarvení srsti

Alela	Zbarvení
C	plné zbarvení (bez masky)
c^b	barmská depigmentace, podmiňuje zbarvení barmských koček, které mají hlavu, končetiny a ocas nepatrně tmavší než tělo
c^s	siamská depigmentace, podmiňuje akromelanické zbarvení terminálních, přesně vymezených oblastí těla, typické pro siamské kočky
c^a	modrooký albinismus
c	kompletní albinismus, podmiňuje bílé zbarvení a je třeba jej odlišovat od genu W , podmiňujícího dominantní bílou barvu. Úplní albíni mají nejen bílou srst, ale také červenou barvu očí

Lokus D

Gen zodpovědný za tzv. ředění barvy (dilution) se nazývá *MLPH* (*Melanophilin*). U koček se zředěným zbarvením byla prokázána delece 1 bp v genu *MLPH* (Ishida et al. 2006). Černá barva je ředěna na šedivou (mezi chovateli je ustálen termín - modrá barva). Některá plemena jsou chována pouze v této barvě, např. kartouzská, ruská modrá, korat, Chartreux. Tyto kočky nesou d/d genotyp lokusu D (Dilution). Fenotypový projev ředění barvy je děděn autozomálně recesivně; ředění barvy se projeví pouze u jedinců s genotypem d/d. Původní wild type D-alela (non-dilution allele) je alela bez deleční mutace; vyskytuje např. u plemen egyptské mau, kočky britské modré, kartouzské a ruské modré (Ishida et al., 2006). Se zředěnými barvami se setkáváme u plemen koček velmi často. Nejčastější je zbarvení modré, nejvzácnější pak je zbarvení plavé, které můžeme vidět například u habešských, somálských nebo orientálních koček (Říhová, 1999).

Gen d v konfiguraci dd působí na ostatní geny, určující zbarvení srsti. V tabulce 6 je uvedeno, jaké je působení genotypu dd na základní barvu srsti.

Tabulka 6: Působení genotypu dd na základní barvu srsti

základní barva	ředěná barva
černá (BBDD)	modrá (aadd)
čokoládová (bbDD)	lilová (bbdd)
skořicová ($b^1 b^1$ DD)	plavá ($b^1 b^1$ dd)
červená (O^x DD)	krémová (O^x dd)

Lokus I

Gen *I* – inhibitor, má dominantní charakter, vyznačuje se však neúplnou penetrací, což znamená, že se neprojeví u všech jeho nositelů tak, jak se normálně dominantní geny projevují. Tato vlastnost genu inhibitoru způsobuje chovatelům často problémy, neboť stříbřitost není vždy dokonale vyjádřena a barva bývá někdy poněkud nažloutlá. V důsledku toho se tato část chlupu jeví jako zářivá, stříbřitě bílá. Vždy se jedná o tu část chlupu, která je nejbližší kůži. Vliv alel genu *I* na zbarvení srsti koček znázorňuje tabulka 7.

Tabulka 7: Vliv genotypu II, Ii a ii na zbarvení srsti

Genotyp	Zbarvení
II	inhibice tvorby pigmentu v části chlupu, „stříbřité“ zbarvení srsti
Ii	inhibice tvorby pigmentu v části chlupu „zlaté“ zbarvení srsti
ii	pigmentace po celé délce chlupu

Kouřové kočky jsou ve své podstatě plnobarevné kočky (non aguti – aa), kde gen inhibitor způsobuje stříbřité zbarvení asi 1/3 chlupu od jeho nasazení. Zbylá část chlupu je pak černá, nebo jinak zbarvená, podle přítomnosti vloh pro různá zbarvení a případně i ředící vlohy.

Stříbřité kočky s kresbou (silver tabby) mají kresbu srsti umístěnou na stříbřité bílé základní barvě, která vznikla působením genu *I* na oblast aguti.

Kočky s tipingem – činčily a stříbřité stínované kočky – tyto variety vznikly selekcí z koček silver tabby, kde bylo docíleno takového podílu stříbřité barvy, že kresba přestala být patrná a zůstaly z ní jen zbarvené konečky chlupů. U koček typu **činčila** je zbarvena jen 1/8 délky chlupu, u koček typu **shaded** (stínovaných) je zbarvena asi jen 1/3 délky chlupu. Pokud je gen *I* přítomen u koček červené barvy, nazývají se tyto variety **kameo** (závojevé kameo a stínované kameo).

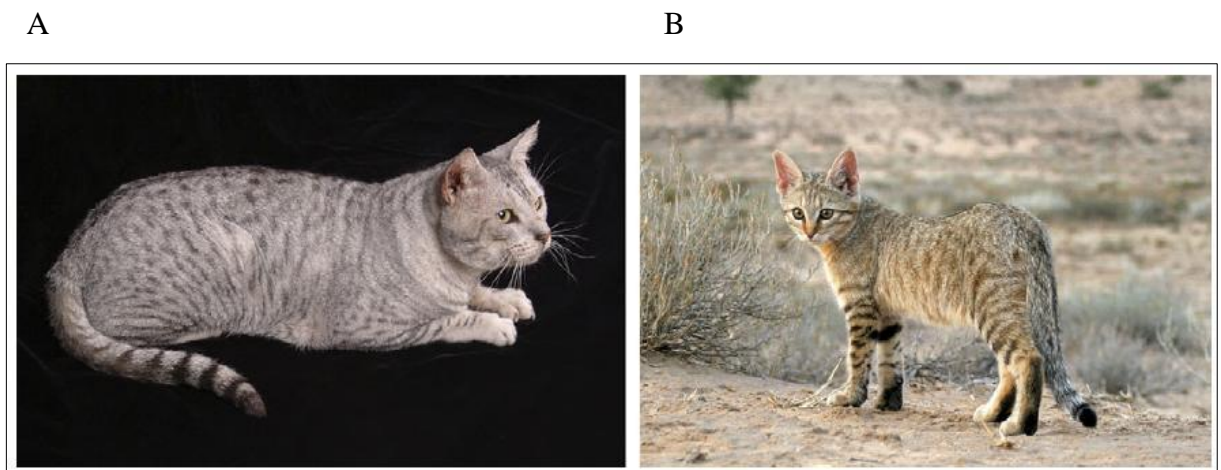
Gen inhibitor však může být vnesen do kteréhokoli zbarvení a tak se můžeme setkat například s modrými činčilami, čokoládově kouřovými kočkami, nebo dokonce s kočkami se stříbřitými odznaky – silver point a mnoha dalšími. Ve stříbřitých zbarveních se chová mnoho plemen, nejznámější jsou však u perských koček.

Stříbřitá zvířata nemusí být vždy homozygotní pro gen inhibitor (II), ale mohou být heterozygotní pro tuto vloh (Ii). Tato zvířata se označují jako **zlaté činčily a zlaté stínované**. Zlaté kočky se chovají především v perském plemeni, vzácněji i u exotických, případně britských koček (Říhová, 1999).

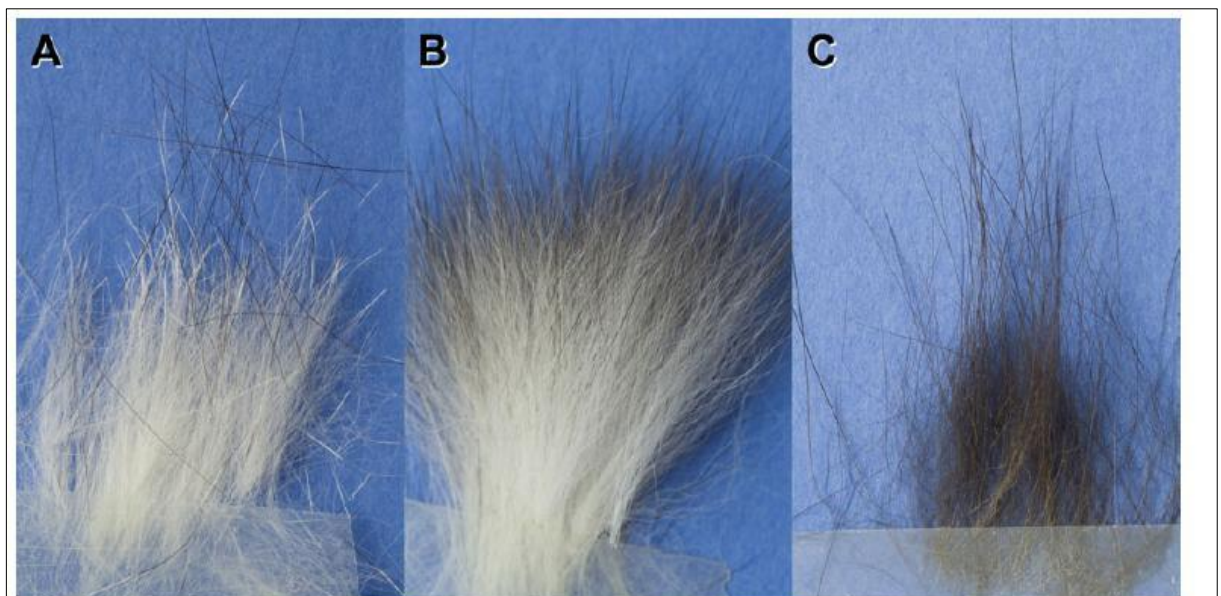
Problematice genetiky stříbřitého zbarvení srsti kočky domácí se věnovali na úrovni molekulární genetiky Menotti-Raymond et al. (2009). Ve své práci tento gen označili jako gen *SILVER*, předpokládají, že se rovněž jedná o supresor potlačující tvorbu melaninu. Typické oranžovožluté pruhování chlupů u divoké kočky je v případě nositelů genu *SILVER*

výrazně potlačené, tyto části chlupů jsou pak téměř bílé respektive bezbarvé. Eumelanické zbarvení se nachází pouze v koncové části každého chlupu. Na obrázku 2 je znázorněn typický rozdíl mezi kočkou divokou a stříbřitě zbarvenou kočkou domácí. Rozdíly mezi zbarvením jednotlivých chlupů u kočky domácí se stříbřitým a kouřovým zbarvením a divoce zbarvené aguti kočky je znázorněno na obrázku 3. Oba obrázky jsou upraveny podle práce Menotti-Raymond et al. (2009).

Obrázek 2: Stříbřité zbarvení plemene ocicat (A) a divoké zbarvení kočky divoké (*Felis silvestris lybica*) (B) – upraveno podle Menotti-Raymond et al. (2009)



Obrázek 3: detail chlupů kočky s stříbřitým (A), kouřovým (B) a aguti zbarvením (C) – upraveno podle Menotti-Raymond et al. (2009)



Zhou et al. (1994) identifikovali u myši protein, který byl zodpovědný za tvorbu melanosomů v raných fázích vývoje chlupu. Gen kódující tento protein byl označen jako *PMEL17*. Menotti-Raymond et al. (2009) předpokládají, že rovněž u kočky domácí je mutace tohoto genu zodpovědná za vznik stříbřitého respektive kouřového zbarvení srsti. Tito autoři identifikovali pozici tohoto genu na chromozómu D2. Potvrdili rovněž typickou autozomální dědičnost dominantní mutace tohoto genu vedoucí ke stříbřitému zbarvení.

Lokus S

Bílou skvrnitost způsobuje gen *S*, u kterého se setkáváme s neúplnou dominancí. Vzájemný poměr bílé a nebílé barvy srsti se vzhledem k celkovému povrchu těla může značně lišit. Velikost těchto ploch je řízena jinými geny. U ušlechtilých plemen koček podmiňuje tento gen bílé zbarvení u dvojbarevných koček (bikolor) a u koček želvovinových s bílou (trojbarevných) (Vařejčko, 1984).

Chovatelé rozeznávají tři typy bílé skvrnitosti. Jejich charakteristika je uvedena v tabulce 8.

Tabulka 8: Charakteristika různých typů bílé skvrnitosti srsti u koček

Typ	Charakteristika
bikolor	Bílá jedna třetina až polovina těla, zbytek je zbarven některou z jiných možných barev.
harlekýn	Bílá barva zaujímá dvě třetiny až tři čtvrtiny plochy srsti.
van	Bílá je v naprosté převaze a jsou zachovány jen ostrůvky barvy. Barva musí být na hlavě a zbarvený je také celý ocas. Tolerují se jen tři další malé skvrny na těle.

Nejpreciznější je standard u birem, kde se požaduje zcela přesné rozmístění bílých skvrn na nohách, což z tohoto plemene dělá chovatelský oříšek. Další plemeno s relativně tvrdým standardem pro toto zbarvení je ragdol. Nejvolnější standard pro bílé skvrnité kočky mají takzvaná přírodní plemena koček – mainské mývalí, norské lesní, turecké angory a sibiřské kočky. U nich je povolen jakýkoli podíl bílé barvy (Říhová, 1999).

Lokus W

Bíle zbarvené kočky se vyskytují u mnoha plemen. Nejedná se o albíny, jak by se na první pohled mohlo zdát. Jejich bílé zbarvení způsobuje dominantní alela W, která působí epistaticky na geny pro všechna ostatní zbarvení. Bílé kočky mohou mít modré nebo oranžové oči, vzácně i zelené oči. Bílé zejména modrooké kočky jsou známy tím, že se u nich vyskytuje hluchota. Protože se jedná o dědičnou poruchu, tyto kočky nelze používat k dalšímu chovu (Říhová, 1999).

3.5.3 Známé lokusy řídící barvu srsti a lokalizované na gonozómu X

Lokus O

Gen *O* – pro oranžové (červené) zbarvení je lokalizován na pohlavním chromozómu X, a proto je toto zbarvení vázáno na pohlaví (Vařejčko, 1984). Další jeho vlastností je, že působí epistaticky na ostatní geny pro zbarvení (kromě bílého), to znamená na geny jiného lokusu a „maskuje“ jejich přítomnost.

Liší se také funkce genu *O* u různého pohlaví. U kocourů s genotypem XY stačí jedna dominantní alela genu *O* pro červené zbarvení a kocour má červenou srst ($X^O Y$). U koček s genotypem XX však přítomnost pouze jedné dominantní alely genu *O* tedy $X^O X$ způsobuje zbarvení želvovinové, které sestává z nepravidelně se střídajících červených a černých skvrn. Aby kočka byla červená, je nutná přítomnost dvou dominantních alel genu *O*, tedy na obou X chromozómech $X^O X^O$.

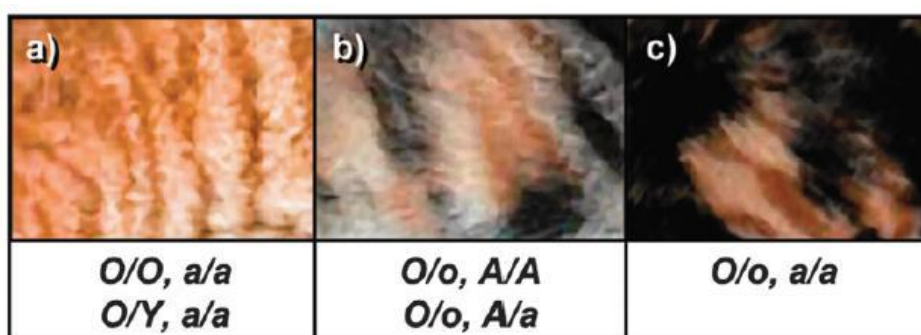
Z toho plyne několik závažných faktů pro chovatele. Želvovinová kocouři by tedy prakticky neměli existovat. Občas se však nějaký takový kocour narodí. Bývá slabší konstituce (má kočičí výraz) a je neplodný – jedná se u něj o chromozómový defekt – kocour má jeden X chromozóm navíc a jeho genotyp je $X^O X Y$. Ale protože v přírodě nic neplatí absolutně, vzácně se vyskytne i plodný želvovinový kocour normální konstituce. Tyto případy jsou však tak vzácné, že nemáme velkou šanci se s takovým kocourem setkat. Genotyp a podstata těchto plodných želvovinových kocourů doposud nebyla zcela objasněna (Říhová, 1999).

Červené zbarvení je zajímavé, ale také chovatelsky obtížné ještě z dalších důvodů. Ne všechny kočky mají stejně sytý odstín barvy. Známe kočky světle červené i mahagonově červené a mnoho dalších odstínů, které leží mezi těmito extrémy. Odstín červené barvy

ovládá skupina polygenů – genů modifikátorů, které lze ovlivnit pouze omezeně, a to pomocí selekce. Tento jev, provázející červenou barvu, se nazývá rufismus. V případě červené barvy se dále nedostatečně uplatňuje vliv homozygotní konfigurace genu pro nonaguti (aa), která způsobuje jednobarevnost srsti. V důsledku toho mají všechna červená a krémová zvířata menší nebo větší náznaky kresby v srsti (stínovaná kresba – ghostmarking). Dokonale stejnoměrně červené zvíře můžeme tedy klidně zařadit mezi nedostižné ideály. Ředěnou formou barvy červené je krémová, pro niž platí všechny informace, uvedené u červené barvy. Je způsobena přítomností alelického páru dd v genotypu červeného zvířete (Říhová, 1999).

Problematice heterozygotní kombinace alel v lokusu O (Oo) se u koček věnovali rovněž Schmidt-Küntzel (2009). Tito autoři u heterozygotů rozlišují dvě odlišná zbarvení. Prvním zbarvením je označeno jako želvovinové, které je charakteristické drobnou červenou skvrnitostí. Druhý typ zbarvení heterozygotů tito autoři označují jako calico, pro které je charakteristická mozaiková skvrnitost tvořená velkými skvrnami červené barvy. Na následujícím obrázku, který je převzatý z práce Schmidt-Küntzel (2009), je patrný vliv přítomnosti dominantní alely lokusu A (aguti) na výsledné zbarvení heterozygotních jedinců Oo.

Obrázek 4: Vliv aguti a plného černého zbarvení na projev heterozygotní kombinace alel Oo – a) červené zbarvení, b) aguti želvovinové zbarvení, c) černě želvovinové zbarvení – upraveno podle Schmidt-Küntzel et al. (2009)



3.5.4 Interakce mezi geny řídící zbarvení srsti

Bakalářská práce je zaměřená na hodnocení aguti zbarvení, plného zbarvení, červeného zbarvení a želvovinového zbarvení. Z tohoto důvodu se v této kapitole zaměřím pouze na popis interakcí mezi lokusem A (aguti) a lokusem O. Problematiku této interakce

objasnili na molekulární úrovni Schmidl-Küntzel et al. (2009). Tito autoři prokázali, že existuje dominantně epistatický vztah mezi dominantní alelou O a dominantní alelou A. Tento epistatický efekt je charakterizován v následující tabulce.

Tabulka 9: Interakce mezi lokusy A a O u kočky domácí

Pohlaví	Gen O	Gen A	Zbarvení
kočka	OO	AA	červené
	OO	Aa	červené
	OO	aa	červené
	Oo	AA	aguti želvovinová (calico)
	Oo	Aa	aguti želvovinová (calico)
	Oo	aa	černě želvovinová (calico)
	oo	AA	aguti - tabby (habešská, tygrovaná, mramorovaná, tečkovaná)
	oo	Aa	aguti - tabby (habešská, tygrovaná, mramorovaná, tečkovaná)
	oo	aa	černé plné zbarvení
kocour	O-	AA	červené
	O-	Aa	červené
	O-	aa	červené
	o-	AA	aguti - tabby (habešská, tygrovaná, mramorovaná, tečkovaná)
	o-	Aa	aguti - tabby (habešská, tygrovaná, mramorovaná, tečkovaná)
	o-	aa	černé plné zbarvení

3.6 Molekulární markery použitelné pro studium polymorfismu genů zodpovědných za zbarvení srsti

3.6.1 Izolace DNA

Pro úspěšnou aplikaci molekulárních markerů je nezbytné získat vysokomolekulární genomickou DNA s požadovanou čistotou. Cílem bakalářské práce nebyla optimalizace izolačních postupů, přesto se v této kapitole stručně zmíním o metodách izolace DNA výše citovaných autorů, kteří se rovněž věnovali výzkumu molekulární podstaty zbarvení srsti u koček. Pro izolaci DNA Menotti-Raymond et al. (2009) použili vzorky krve a pokožky, které byly odebrány při biopsii. Některé vzorky hodnocené výše uvedenými autory byly získány ze

stěrů bukálních sliznic. Pro izolaci použili QIAamp DNA Blood Midi a Mini Kit (Qiagen). Množství DNA tito autoři stanovovali fluorometricky.

Schmidt-Küntzel et al. (2009) použili pro izolaci DNA kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Jako výchozí materiál pro své analýzy použili vzorky krve, které byly získány na základě spolupráce s veterinárními ordinacemi a chovateli koček. Vzorky zvířat pocházející z Brazílie představovaly stěry bukálních sliznic, které byly izolovány výše uvedeným kitem.

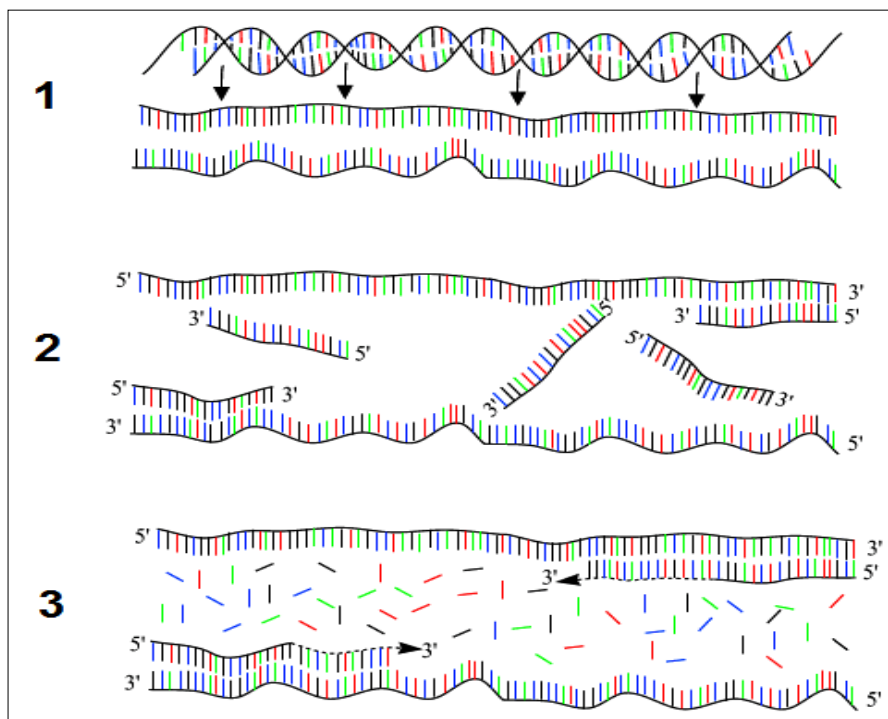
Eizirik et al. (2010) použil jako výchozí materiál vzorky krve a vzorky fibroblastů. Genomická DNA hodnocených zvířat byla izolována rovněž kitem QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen).

3.6.2 Metoda PCR

PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) je metoda používaná k množení (amplifikaci) určité sekvence DNA v *in vitro* podmínkách (Innis a Gelfand, 1990). Pomocí této techniky může být rychle a selektivně namnožena konkrétní nukleotidová sekvence obsažená v jakémkoliv DNA. Polymerázová řetězová reakce je v dnešní době široce používána, například v diagnostice při analýze genetických chorob nebo pro namnožení jakéhokoliv genu z malého vzorku DNA (Alberts et al., 1998). Objevitelem PCR byl americký biochemik Kary Mullis, který za tento objev získal v roce 1993 Nobelovu cenu (Griffin a Griffin, 1994).

Základní jednotkou PCR je jeden cyklus skládající se ze tří částí: denaturace templatové DNA, nasedání primerů tzv. „annealing“ a prodlužování nově vznikajícího řetězce „elongace“. Tento cyklus má obvykle 25 až 35 opakování (Snustad a Simmons, 2009).

Obrázek 5: Amplifikace templátové DNA: 1 – denaturace, 2 – annealing 3 – elongace –
upraveno podle Vierstraete (2001)



Jednotlivé fáze PCR:

1. Denaturační fáze

Principem denaturační fáze je zahřátí roztoku DNA na teplotu přibližně 94 – 95 °C a čímž dojde k rozštěpení vodíkových můstků a vzniku jednořetězcových molekul DNA (Watson et al., 1988). Substrátem pro enzym DNA-polymerázu jsou jednořetězcové molekuly DNA (Sambrook et al., 1989). Nejčastěji se používá denaturační teplota 95 °C po dobu 30 sekund, avšak první denaturace v rámci celého procesu PCR se doporučuje prodloužit na dobu 2 – 5 minut pro zajištění úplné separace DNA. V případě že by došlo jen k částečnému oddělení řetězců, molekula DNA by se znovu reasociovala a tím by nemohlo dojít k navázání primerů (Innis a Gelfand, 1990).

2. Annelační fáze

Po denaturaci je reakční roztok ochlazen na teplotu 55 – 70 °C a následuje připojení primerů na vlákno DNA na principu komplementarity dusíkatých bází. V reakční směsi je důležitý nadbytek primerů, což jsou krátké fragmenty jednořetězcové DNA, které mají

přibližně 8 – 30 bází s volnou hydroxylovou skupinou na 3' konci (Sambrook et al., 1989; Innis a Gelfand, 1990).

3. Prodlužovací fáze

Zahřátí templátové DNA s navázanými primery na teplotu optimální pro zahájení enzymatické reakce termostabilní DNA-polymerázy (obvykle 72 °C) umožní navázání volných nukleotidtrifosfátů na základě komplementarity s templátovou maticí do nově vznikajícího řetězce DNA (Sambrook et al., 1989, Innis a Gelfand, 1990).

V následujícím cyklu se produkty prvního cyklu replikace denaturují a po připojení primerů replikují DNA-polymerázou, tento proces se mnohokrát opakuje, dokud není dosaženo požadovaného stupně amplifikace (Snustad a Simmons, 2009).

3.6.3 Restrikční štěpení

Restrikční endonukleázy byly objeveny při vložení cizorodé DNA do bakterií. Nejzajímavější vlastností těchto nukleáz bylo, že štěpily DNA jen v určitých nukleotidových sekvencích. Vlastní DNA si bakterie před rozštěpením chránily chemickou modifikací těchto rozpoznávaných sekvencí. Restrikční endonukleázy používané v molekulární genetice pocházejí převážně z bakterií, a protože jsou jimi rozpoznávaná místa na DNA krátká (obvykle 4-8 nukleotidových párů), je vysoká pravděpodobnost, že se tato místa vyskytnou v každé delší molekule DNA. Proto mohou být tyto enzymy využity pro analýzu DNA z jakéhokoliv zdroje (Alberts, 1998). Enzymatické štěpení DNA v jisté vzdálenosti od cílové sekvence, která je rozeznávána enzymem, je charakteristické pro restrikční endonukleázy I. a III. typu. Oproti tomu restrikční endonukleázy II. typu štěpí molekuly DNA uvnitř cílové sekvence, takže jejich štěpící účinek je sekvenčně specifický. V roce 1978 získali Arber, Nathans a Smith za svůj výzkum restrikčních endonukleáz Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Do dnešní doby bylo purifikováno a charakterizováno přes 400 různých restrikčních enzymů (Snustad a Simmons, 2009).

3.6.4 Mikrosatelitní markery

Mikrosatelitní DNA neboli mikrosatelity, pro které se nejčastěji používají zkratky SSR (Simple Sequences Repeats) nebo STR (Short Tandem Repeats), jsou polymorfní tandemové repetice sekvencí dlouhých 1-6 párů nukleotidů např. (GA)_n, (GATA)_n (Snustad a Simmons,

2009). Jejich polymorfismus je dán především rozdílem v počtu opakování základního motivu (Tautz, 1989). Mikrosatelity se vyskytují nejvíce v nekódujících oblastech (Metzgar et al., 2000) všech eukaryotních i prokaryotních genomů (Field et Wills, 1998, Tóth et al., 2000). Dinukleotidové repetice nalézáme často v intronech, zatímco trinukleotidové a hexanukleotidové se vyskytují i v exonech (Tóth et al., 2000).

Mikrosatelity lze rozdělit podle opakujících se sekvencí na několik typů:

- Úplné (dokonalé) mikrosatelity obsahují jeden stále se opakující nepřerušovaný motiv (např. CACACA),
- Neúplné (nedokonalé), kde je repetice přerušena jednou jinou bází (např. CTCTCTGTCTCT),
- Složené mikrosatelity ze dvou a více přiléhajících mikrosatelitů s odlišným typem repetice (např. CACACATGTGTG),
- Přerušované mikrosatelity obsahují inserce malého počtu bází, které nenásledují strukturu repetice (např. CACACATGCGCCACACA) (Goldstein et Schlotterer, 1999).

3.6.5 Elektroforetická separace DNA fragmentů

Gelová elektroforéza

Výkonným nástrojem pro rozdělování makromolekul s různou velikostí a nábojem je gelová elektroforéza. Molekuly DNA mají v podstatě stejný náboj na jednotku hmotnosti, takže se dělí v agarózových nebo polyakrylamidových gelech téměř výhradně na základě své velikosti nebo konformace (Snustad a Simmons, 2009). Po nanesení směsi fragmentů DNA do žlábků na jednom konci agarózového nebo polyakrylamidového gelu a po umístění do elektrického pole se DNA díky svému negativnímu náboji začne pohybovat směrem ke kladné elektrodě (Alberts, 1998). Agarózové a polyakrylamidové gely působí jako molekulární síta, která zpomalují průchod velkých molekul více než malých. Agarózové gely jsou vhodnější pro velké molekuly (nad několik set nukleotidů), zatímco polyakrylamidové gely jsou lepší pro rozdělování malých molekul DNA (Snustad a Simmons, 2009). DNA však není možno v agarosovém ani polyakrylamidovém gelu vidět. Je proto nutné ji nějakým způsobem obarvit nebo označit. Jednou z citlivých metod detekce je smíchání DNA s látkou, která po navázání na DNA fluoreskuje v ultrafialovém světle (Alberts, 1998).

Kapilární elektroforéza

Vysokoúčinnou kapilární elektroforézou (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE) rozumíme celou řadu elektromigračních separačních metod realizovaných v kapilárním instrumentálním formátu (Lemos et al., 2001). Tyto metody vychází z elektroforetické pohyblivosti částic, které jsou určeny rychlostí pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě (Kašička, 1997).

Nejjednodušší elektromigrační metodou je **zónová elektroforéza**, kde se jednotlivé ionty oddělují ve stejnorodém prostředí základního nosného elektrolytu (vodního roztoku), kterým je naplněna křemenná kapilára a oba její konce jsou ponořeny do elektrodových nádobek s tímto roztokem. Křemenná kapilára má vnitřní průměr většinou 50 nebo 75 μm a délku 30 až 80 cm. Díky účinnému odvodu tepla a miniaturizaci separačního prostoru má tato metoda vysokou citlivost při výborné účinnosti i rychlosti separace. Po zavedení vzorku do kapiláry je konec kapiláry se vzorkem opět ponořen do elektrodové nádoby a k systému se připojí stejnosměrné elektrické pole. Složky vzorku se oddělují na principu svých různých elektroforetických pohyblivostí a odlišnou rychlostí migrují v kapiláře směrem k detektoru. Při zvolené vlnové délce je v určitém místě kapiláry měřena absorpce záření pohybujícího se nosného elektrolytu a zón vzorků určených k analýze (Kašička, 1997). U fluorescenčně značených vzorků po nasvícení laserem dojde k excitaci fluoroforů a výsledný signál je zaznamenáván fotodetektor (Ugaz a Christensen, 2007). Z elektroforegramu je získána kvalitativní informace, která je dána časem jeho „peaku“, a kvantitativní informace, která je přímo úměrná výšce, respektive ploše „peaku“. Obě informace jsou matematicky porovnávány softwarem vzhledem ke hmotnostnímu standardu (Kašička, 1997).

U **kapilární gelové elektroforézy** separace probíhá v kapiláře naplněné roztoky polymerů, které působí jako molekulární síto, kde se analyzované částice rozdělí podle svých různých elektroforetických pohyblivostí. Tato metoda má velké spektrum využití, může sloužit pro oddělení biologických makromolekul, jako jsou bílkoviny a fragmenty DNA, na základě jejich molekulové hmotnosti. Další možností, kde můžeme tuto metodu využít je například stanovení sacharidů, vitamínů a barviv (Lemos et al., 2001; Ugaz a Christensen, 2007).

3.6.6 Sekvence DNA

Naše dnešní schopnost sekvenovat v podstatě jakoukoliv molekulu DNA je výsledkem čtyř hlavních objevů. Nejdůležitějším průlomem byl objev restričních endonukleáz, další velký pokrok představovalo zdokonalení metody gelové elektroforézy až do té míry, že mohou být rozděleny fragmenty DNA lišící se o délku jednoho nukleotidu. Stejně tak důležité byly metody klonování genů a konečně, vědci vynalezli dva různé postupy, kterými mohou být stanoveny nukleotidové sekvence DNA (Snustad a Simmons, 2009).

První metoda, nazvaná Maxamova-Gilbertova se již dlouho nepoužívá. Druhá metoda, vyvinutá Frederickem Sangerem a kolegy, využívá *in vitro* syntézy DNA v přítomnosti radioaktivních nukleotidů a specifických terminátorů řetězců a vytváří čtyři soubory radioaktivně značených fragmentů, z nichž každý je zakončen A, G, C, respektive T (Snustad a Simmons, 2009).

Sangerova metoda sekvenování DNA je závislá na vytvoření souboru fragmentů DNA, z nichž všechny mají jediný společný začátek (5'-konec sekvenačního primeru). 3'-konec primeru obsahuje volnou -OH skupinu, která je místem prodlužování řetězce DNA-polymerázou. Jestliže je ke konci řetězce připojen 2',3'-dideoxynukleotid, bude blokováno následné prodlužování tohoto řetězce, protože 2',3'-dideoxynukleotid nemá 3'-OH skupinu. Při použití 2',3'-dideoxythymidintrifosfátu (ddTTP), 2',3'-dideoxycytidintrifosfátu (ddCTP), 2',3'-dideoxyadenozintrifosfátu (ddATP) a 2',3'-dideoxyguanozintrifosfátu (ddGTP) jako terminátorů ve čtyřech oddělených sekvenačních reakcích budou vytvořeny čtyři soubory fragmentů, kde každý soubor bude obsahovat řetězce, které jsou vždy zakončeny stejnou bází. Tyto fragmenty se separují polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a jejich pozice se v gelu detekují autoradiografií. Nejkratší fragment urazí největší vzdálenost a dá vznik pruhu, který leží nejbliže k anodě. Každý následující pruh obsahuje řetězce, které jsou o jeden nukleotid delší než předcházející. Kompletní nukleotidová sekvence řetězce DNA se pak stanovuje postupným čtením pruhů na gelu dle jejich pozice od anody (Snustad a Simmons, 2009).

V současnosti jsou všechny větší sekvenace DNA prováděny na automatických sekvenačních přístrojích (sekvenátorech), které používají modifikovanou dideoxyterminátorovou metodu popsanou výše. Hlavním rozdílem mezi metodou sekvenování na gelech umístěných mezi skleněnými deskami a automatickým sekvenováním DNA je použití fluorescenčních barviv místo radioaktivních izotopů pro detekci řetězců

DNA. Dalším rozdílem je elektroforetická separace produktů všech čtyř dideoxy-terminátorových reakcí společně v jedné dráze gelu nebo kapiláře. Třetím rozdílem je použití fotobuňky k detekci fluorescence barviv při jejich průchodu gelem nebo kapilárou a poslední odlišností je přímý přenos výstupu fotobuňky do počítače, který automaticky analyzuje, zaznamenává a tiskne výsledky. Přístroje pro automatické sekvenování DNA mohou provádět elektroforézu současně až v 96 kapilárách a nanášení vzorku, elektroforéza, sběr dat a jejich analýza je plně automatická (Snustad a Simmons, 2009).

4. Metodika

4.1 Výběr hodnocených zvířat

Pro vlastní experimenty byla vybrána kolekce zvířat s variabilním zbarvením srsti. Pro analýzy bylo použito celkem 75 jedinců. Plemeno Britská kočka (3 kocouři), kříženci Britská x Evropská krátkosrstá (1 kocour a 2 kočky), Evropská krátkosrstá (18 kocourů a 32 koček), Evropská krátkosrstá x Perská (1 kocour a 1 kočka), Kartouzská (2 kocouři), Perská (8 kocourů a 5 koček), Ragdoll (1 kočka) a Siamská (1 kočka).

Zvířata zařazená do plemene Evropská krátkosrstá představovala jedince bez průkazu původu, která svým exteriérem odpovídala tomuto plemeni. Jednalo se o jedince vzniklých v podstatě na základě nekontrolovaného chovu. Čistokrevná plemena odpovídala v naprosté většině jedincům s průkazem původu. Detailní přehled hodnocených zvířat je uveden v tabulce 21, která je součástí výsledkové části bakalářské práce.

4.2 Hodnocení zbarvení srsti

U všech jedinců uvedených v předchozí kapitole byl proveden popis zbarvení srsti podle klasifikace FIFe (Fédération Internationale Féline, 2012). U zvířat s průkazem původu byly použity charakteristiky zbarvení z průkazu původu. Hodnocené barvy jednotlivých zvířat jsou uvedeny v tabulce 21.

4.3 Izolace DNA

Vzorky DNA byly odebrány z bukální sliznice koček sterilním cytologickým kartáčkem firmy Lotus Global Co., Ltd., London. Aby nedošlo ke kontaminaci vzorku, musí mít odběratel pečlivě omyté ruce a zároveň kočka nesmí minimálně dvě hodiny před odběrem žrát. Po otevření tlamičky kočky byl kartáček vsunut mezi její tvář a dáseň a jemnými krouživými pohyby byla odebrána epiteliální vrstva buněk. Po oschnutí kartáčku na suchém čistém papíře, byl kartáček vložen do označené obálky a následovalo uchování vzorku zmražením při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po celou dobu odběru bylo s kartáčkem zacházeno asepticky. Postup vlastní izolace byl prováděn podle pokynů výrobce kitu NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel). Na obrázku 6 je znázorněn postup odběru bukálních sliznic.

Obrázek 6: Odběr bukálních sliznic pomocí cytologického kartáčku u kočky domácí



4.4 Stanovení kvality a kvantity izolované DNA

Izolovaná genomická DNA byla z hlediska vysokomolekularity elektroforeticky testována v elektroforetické cele SubCell (BioRad). Pro tento test byl použit 1 % agarózový gel v 1x TBE pufru. Složení pufru je uvedeno v příloze bakalářské práce. Separace probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Molekuly DNA byly vizualizovány pomocí ethidiumbromidu. Elektroforeogramy byly archivovány pomocí systému GelDoc (BioRad) s programem QuantityOne (BioRad).

Kvantita izolované DNA byla stanovena UV-spektrofotometricky s využitím přístroje NanoPhotometer (Implen). Současně bylo provedeno hodnocení parametrů A260/A280 a A260/A230, podle kterých lze odhalit případné kontaminace izolované DNA různými organickými látkami.

Izolovaná genomická DNA byla u všech vzorků naředěna 1x TE pufrem na koncentraci $7 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Složení použitých pufrů a roztoků je uvedeno v příloze bakalářské práce.

Obrázek 8: Část sekvence AY237394.1 *ASIP* genu kočky domácí – upraveno podle NCBI

Felis catus agouti signaling protein (ASIP) gene, complete cds	
GenBank: AY237394.1	
LOCUS	AY237394 4399 bp DNA linear MAM 17-MAR-2003
DEFINITION	Felis catus agouti signaling protein (ASIP) gene, complete cds.
ACCESSION	AY237394
VERSION	AY237394.1 GI:29027413
KEYWORDS	.
SOURCE	Felis catus (domestic cat)
ORGANISM	<u>Felis catus</u> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Feliformia; Felidae; Felinae; Felis.
REFERENCE	1 (bases 1 to 4399)
AUTHORS	Eizirik,E., Yuhki,N., Johnson,W.E., Menotti-Raymond,M., Hannah,S.S. and O'Brien,S.J.
TITLE	Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family
JOURNAL	Curr. Biol. 13 (5), 448-453 (2003)
PUBMED	12620197
REFERENCE	2 (bases 1 to 4399)
AUTHORS	Eizirik,E., Yuhki,N., Johnson,W.E., Menotti-Raymond,M., Hannah,S.S. and O'Brien,S.J.
TITLE	Direct Submission
JOURNAL	Submitted (14-FEB-2003) Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702, USA
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..4399 /organism="Felis catus" /mol_type="genomic DNA" /isolate="Fca273" /db_xref="taxon:9685" /chromosome="A3"
gene	<13..>4399 /gene="ASIP"
mRNA	join(<13..172,1824..1885,4214..>4399) /gene="ASIP" /product="agouti signaling protein"
CDS	join(13..172,1824..1885,4214..4399) /gene="ASIP" /codon_start=1 /product="agouti signaling protein" /protein_id="AAO62411.1" /db_xref="GI:29027414" /translation="MNILRLLLATLLVCLCLLTAYSHLAPEEKPRDRNLRNSSMMN LDLSSVSIVALNKKSKISRKEAEKRRSSKKKASMKNVAQPRRPRPPPPAPCVATRDS CKPPAPACCDPCASCQCRFFRSSCSCLRVLNPTC"
exon	<13..172 /gene="ASIP" /number=2
exon	1824..1885 /gene="ASIP" /number=3
exon	4214..>4399 /gene="ASIP" /number=4
ORIGIN	1 aggccttcaa ggatgaatat cctccgecta ctccctggcea cctgctggt ctgctgtgc 61 ctctcactg cctacagtea cctggcacct gaggaaaaac ccagagatga caggaacctg 121 aggagcaact cctc@atgaa catgttgat ctctctctg tctctatgt aggtaagtag 181 cccagcttga cccctggtct ctggactccg gtccatgaga aggggctgca agatgtcaaa 241 cgtgctcccc gagctgatac caggattcac tgacataggt cagagctctt tcgtgtaatc

V sekvenci AY237394.1 byla vybrána oblast exonu 2, která byla použita pro návržení dvojice specifických primerů ohraničujících předpokládanou kauzální mutaci. Pro návržení primerů byl použit program Primer3 Input v.0.4.0 (Rozen a Skaletsky, 2000). Tento program

Obrázek 10: Výstup programu Webcutter2.0 při navrhování PCR-RFLP markeru *ASIP* genu

ASIP-RFLP

150 base pairs

[Graphic map](#) | [Table by enzyme name](#)

```

aatatcctccgcctactcctggccaccctgctggctctgcctgtgcctcctcactgcctacagtcacctggcacct base pairs
ttataggaggcggatgaggaccggtgggacgaccagacggacacggaggagtgcaggatgtcagtgaccgtgga 1 to 75

                                     XcmI
gaggaaaaaccagagatgacaggaacctgaggagcaactcctccatgaacatggttgatctctcttctgtctct base pairs
ctccttttgggtctctactgtccttggactcctcgttgaggaggtacttgtacaacctagagagaagacagaga 76 to 150

base pairs
151 to 150
    
```

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
XcmI	1	126	ccannnnn/nnntgg More info

Every enzyme analyzed cuts this sequence.

4.5.2 Vlastní optimalizovaný metodický postup detekce kauzální mutace *ASIP* genu pomocí PCR-RFLP

Primery (*ASIP*-CAT-CZU-F: AATATCCTCCGCCTACTCCTG a *ASIP*-CAT-CZU-R: AGAGACAGAAGAGAGATCCAACA) jejichž navhování bylo popsáno v předchozí kapitole, byly použity pro PCR amplifikaci, jejíž složení je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 10: Složení PCR reakce pro amplifikaci části exonu 2 *ASIP* genu u kočky domácí

Složka	Koncentrace
DNA	21 ng.12,5 μl^{-1}
Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	2 mM
KCl	50 mM
<i>ASIP</i> -CAT-CZU-F	0,4 μM
<i>ASIP</i> -CAT-CZU-R	0,4 μM
dNTP	200 μM
BSA	5 ng.12,5 μl^{-1}
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
<i>Taq</i> polymeráza (Fermentas)	0,7 U . 12,5 μl^{-1}
Objem	12,5 μl
pH	8,3

Pro amplifikaci byl použit termocykler DNAEngine[®] Peltier Thermal Cycler (BioRad). Profil amplifikace je uveden v následující tabulce.

Tabulka 11: Teplotní a časový profil amplifikace PCR-RFLP markeru *ASIP* genu

Počáteční denaturace	95 °C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	95 °C	30 sekund	35 cyklů
Annealing	64 °C	30 sekund	
Prodlužování	72 °C	60 sekund	
Závěrečné prodlužování	72 °C	300 sekund	1 cyklus

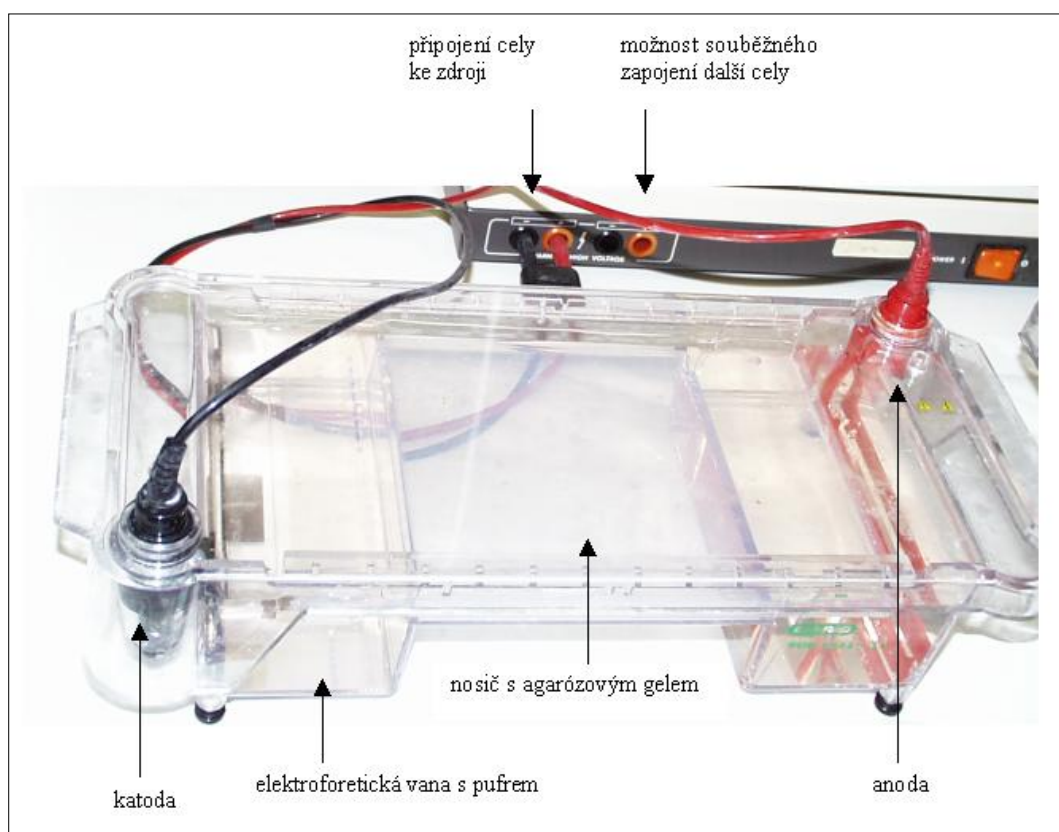
Podmínky restričního štěpení enzymem *XcmI* jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 12: Podmínky restričního štěpení PCR-RFLP markeru genu *ASIP*

Složka	Množství
PCR produkt	5,15 μ l
Pufr II	1,2 μ l
<i>XcmI</i>	0,3 μ l
ddH ₂ O	5,35 μ l

Restriční štěpení probíhalo v termocyklu DNAEngine[®] Peltier Thermal Cycler (BioRad) při 37 °C po dobu 16 hodin. Produkty restričního štěpení byly následně separovány v elektroforetické cele SubCell (BioRad) – obrázek 11.

Obrázek 11: Agarózová elektroforéza Sub Cell (Bio Rad, USA)



Separace probíhala v 5 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru při konstantním napětí 120 V po dobu 40 minut. Složení pufru je uvedeno v příloze bakalářské práce. Molekuly DNA byly vizualizovány pomocí ethidiumbromidu. Elektroforeogramy byly archivovány pomocí systému GelDoc (BioRad) s programem QuantityOne (BioRad).

4.5.3 Sekvenační analýza PCR amplikonu *ASIP* genu kočky domácí

Purifikace PCR produktů *ASIP* genu separovaných v agarózovém gelu

Po amplifikaci se v produktu nacházejí volné nukleotidy popřípadě teoreticky vznikající dimery primerů. Tyto komponenty reakce mohou negativně ovlivnit sekvenační reakci. Nespecifické dimery primerů a volné nukleotidy byly odstraněny na základě gelové purifikace. Pro tento účel byla připravena PCR reakce podle podmínek uvedených v kapitole 4.5.2 o celkovém objemu 50 μl u každého sekvenovaného vzorku. PCR produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu v prostředí 1x TBE pufru. Separace probíhala při laboratorní teplotě a při konstantním napětí 120 V po dobu 45 minut. PCR fragment o velikosti 150 bp respektive 148 bp byl pomocí sterilního skalpelu vyříznut a přenesen do polypropylenové zkumavky. Pro izolaci PCR amplikonu byl použit MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen). Izolace DNA z vyříznutého bločku gelu byla provedena přesně podle doporučeného postupu výrobce kitu. Pro eluci purifikovaného fragmentu byla použita ddH₂O. Bylo získáno 20 μl roztoku amplifikovaného fragmentu. Kvantifikace množství DNA byla provedena podle shodné metody jako kvantifikace izolované genomické DNA. Purifikované PCR produkty byly následně naředěny ddH₂O na konstantní koncentraci 5 ng DNA $\cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Sekvenační reakce a její příprava

Sekvenace amplikonu *ASIP* genu byla provedena pomocí BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). V tabulce 13 jsou uvedeny komponenty sekvenační reakce včetně jejich koncentrací.

Tabulka 13: Složení sekvenační reakce pro identifikaci dinukleotidové delece *ASIP* genu kočky domácí

Složka	Objem	Koncentrace
PCR produkt (5 ng . μl^{-1})	3 μl	15 ng. 20 μl^{-1}
5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems)	4 μl	1x
Primer F resp. R (1 pikomol . μl^{-1})	3,2 μl	3,2 pikomolů. 20 μl^{-1}
Terminator Ready Reaktion Mix (Applied Biosystems)	2 μl	2 μl . 20 μl^{-1}

Postup při vyčištění produktů sekvenační reakce

Prvním krokem čištění bylo vysrážení produktů sekvenační reakce. Toho bylo dosaženo přidáním 2 μl roztoku glykogenu (koncentrace 20ng . μl^{-1}), 2 μl 3M octanu sodného a 50 μl 96% čistého etanolu k 20 μl amplifikační reakce. Směs byla důkladně promíchána a ponechána inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě. Následně byly vzorky odstředěny při 13200 otáček . min^{-1} po dobu 30 minut ve stolní centrifuze Centrifuge 5415D (Eppendorf). Supernatant byl odsát pipetou a pelet usazený na dně zkumavky byl propláchnut 250 μl 70% čistého etanolu. Následovala centrifugace při 13200 otáček . min^{-1} po dobu 15 minut. Supernatant byl rovněž odsát. Proces oplachování 70% etanolem byl ještě jednou zopakován. Získaný pelet byl po odsátí etanolu důkladně vysušen ve vyhřívaném bloku Bio TDB-120 (Biosan). Vysoušení probíhalo při 50 °C po dobu 45 minut. Vysušený sediment, který obsahoval fragmenty DNA určené k sekvenaci, byl následně rozpuštěn v 15 μl Hi-Di formamidu. Rozpuštěné vzorky byly přeneseny do polypropylénových stripů, ve kterých proběhla nejprve jejich denaturace při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Stripy s vzorky byly při denaturaci zakryty PCR fólií. Denaturace probíhala v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad). Takto připravené vzorky byly přeneseny do podavače kapilární elektroforézy. Na obrázku 12 je znázorněn použitý typ termocykleru.

Obrázek 12: Termocyklu C1000™ Thermal Cycler (BioRad)



Obrázek 13: Genetický analyzátor ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)



Použití kapilární elektroforézy pro sekvenaci PCR produktů

Sekvence PCR produktů byla provedena pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) – obrázek 13.

V tabulce 14 jsou popsány podmínky sekvenace včetně použitého modulu a separačního polymeru.

Tabulka 14: Podmínky sekvenace PCR produktů *ASIP* genu kočky domácí

Parametry separace	Parametry
Délka kapiláry (cm)	50
Modul	SeqPOP6(1ml)E
Polymer	POP 6
Virtuální filtr	E
Doba nástřiku (s)	30
napětí při nástřiku (kV)	2,5
teplota při separaci (°C)	50
Napětí při separaci (kV)	11,3
Doba separace (minuty)	120

Výstupem sekvenační reakce byly chromatogramy, které byly vytvořeny programem DNA Sequencing Analysis Software ver. 5.1 (Applied Biosystems). Pomocí tohoto programu byly rovněž získány sekvence analyzovaných fragmentů.

4.5.4 Statistické a bioinformatické vyhodnocení polymorfismů *ASIP* genu

Získané sekvence vybraných jedinců, u kterých byly na základě metody PCR-RFLP identifikovány různé alely genu *ASIP*, byly vzájemně porovnány pomocí bioinformatického programu CLC Main Workbench 6.0.1. Získané sekvence byly rovněž porovnány

s mezinárodní databází nukleotidových sekvencí pomocí volně přístupného bioinformatického nástroje BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST je volně přístupný na adrese <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Vzhledem k tomu, že PCR-RFLP marker vykazuje kodominantní charakter, byla na modelovém souboru hodnocených zvířat provedena jednoduchá populační studie, jejíž cílem bylo vyhodnotit pozorovanou heterozygotnost (H_O) a předpokládanou heterozygotnost při platnosti Hardy-Weinbergova zákona (H_E). Pro tyto analýzy byl použit program Cervus Version 3.0.3 (Kalinowski et al, 2007).

4.6 Multiplex-SSR analýza markerů asociovaných s genem O pro červené zbarvení srsti

4.6.1 Výběr SSR lokusů s lokalizací na gonozómu X s předpokládanou vazbou ke genu O

Pro řešení práce byly vybrány tři mikrosatelitní lokusy (FCA1494, FCA1496, FCA1498), které charakterizovali Schmidt-Kützel (2009), a u kterých předpokládali těsnou vazbu s genem O. Byly vybrány takové mikrosatelitní lokusy, které u dvou potomstev záměrných křížení provedených Schmidt-Kützel (2009) nevykazovaly rekombinace z hlediska zbarvení srsti. V tabulce 15 jsou uvedeny sekvence primerů a jejich fluorescenční značení.

Tabulka 15: Sekvence primerů pro multiplex-SSR analýzy

Primery	Barva	Sekvence
FCA1494-F	6-FAM	GGGCAAGGAGCCTCTTTAAT
FCA1494-R		CCAAGCCCTGCATACTCCTA
FCA1496-F	VIC	TCTTCCCAACCTTTGCCTAA
FCA1496-R		CAGGCAGTAAACATATCCATCG
FCA1498-F	NED	TTTTTCCCCAGGCTGAGATA
FCA1498-R		GAAATGCCTATTTTCGCTTCA

4.6.2 Optimalizace složení a teplotního a časového profilu amplifikace multiplex-SSR markeru

Pro správné použití multiplex-SSR markerů je nezbytná specifická amplifikace alel jednotlivých lokusů a současně absence teoreticky možných nespecifických amplifikací. Z těchto důvodů bylo provedeno několik optimalizačních experimentů s cílem stanovit:

- Koncentraci templátové DNA v PCR reakci.
- Zvolit vhodný typ termostabilní polymerázy. Testovány byly polymerázy dodávané firmami Fermentas, Top Bio a Roche.
- Zvolit vhodnou koncentraci $MgCl_2$ v reakční směsi.
- Vybrat vhodný typ pomocných látek zvyšujících specifickou reakci – Enhancer (Top Bio) a BSA.

Optimalizované složení multiplex-SSR reakční směsi je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 16: Složení jednotlivých komponent multiplex-SSR reakční směsi.

Složka	Koncentrace
DNA	14 ng.12,5 μl^{-1}
Tris-HCl	10 mM
$MgCl_2$	1,5 mM
KCl	50 mM
FCA1494-F	0,16 μM
FCA1494-R	0,16 μM
FCA1496-F	0,24 μM
FCA1496-R	0,24 μM
FCA1498-F	0,24 μM
FCA1498-R	0,24 μM
dNTP	200 μM
BSA	5 ng.12,5 μl^{-1}
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
Taq polymeráza (Roche)	0,5 U . 12,5 μl^{-1}
Objem	12,5 μl
pH	8,3

4.6.3 Optimalizace teplotního a časového profilu multiplex-SSR markerů

Pro zajištění specifické amplifikace požadovaných alel byla pomocí gradientového termocyklieru C1000TM Thermal Cycler (BioRad) zvolena optimální annelační teplota. Vytvořený teplotní a časový profil je uveden v tabulce 17.

Tabulka 17: Teplotní a časový profil amplifikace multiplex-SSR markerů

Úvodní denaturace	95 °C	900 sekund	1 cyklus
Denaturace	94 °C	30 sekund	35 cyklů
Annealing	55 °C	60 sekund	
Prodlužování	72 °C	30 sekund	
Závěrečné prodlužování	72 °C	3600 sekund	1 cyklus

4.6.4 Příprava vzorků amplifikovaných multiplex-SSR markerů pro fragmentační analýzu

Před fragmentační analýzou byly vzorky naředěny apyrogenní ddH₂O. Ke vzorkům byl následně přidán Hi-Di formamid (Applied Biosystems). Pro stanovení velikosti amplifikovaných fragmentů byl použit velikostní standard GeneScanTM-600 LIZ[®] Size Standard (Applied Biosystems). Denaturace PCR produktů byla provedena v termocyklieru C1000TM Thermal Cycler (BioRad), ve kterém rovněž proběhlo následné ochlazení na teplotu 4 °C. Denaturace probíhala v stripech určených pro kapilární elektroforézu zakrytých speciální fólií. Podmínky přípravy vzorků jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tabulka 18: Ředění multiplex-SSR PCR produktů

Ředění PCR		Vzorek pro fragmentační analýzu		
PCR produkt (μl)	H₂O (μl)	Ředěný PCR produkt (μl)	LIZ 600 (μl)	Hi-DI formamid (μl)
1	9	1	0,2	12

Tabulka 19: Denaturace SSR-multiplex markerů

Denaturace	95 °C	600 sekund
Ochlazení	4 °C	600 sekund

Naředěné vzorky byly vloženy do podavače ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.6.5 Podmínky fragmentační analýzy multiplex-SSR markerů

Pro fragmentační analýzu byla použita kapilární elektroforéza ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Podmínky separace jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 20: Podmínky fragmentační analýzy multiplex-SSR markerů

Parametry separace	Multiplex
Délka kapiláry (cm)	36
Modul	GS STR POP4 (1ml) G5
Polymer	POP4
Virtuální filtr	G5
Doba nástřiku (s)	5
napětí při nástřiku (kV)	15
teplota při separaci (°C)	60
Napětí při separaci (kV)	15
Doba separace (minuty)	25

4.6.6 Vyhodnocení polymorfismů multiplex SSR markerů a jejich bioinformatické zpracování

Pomocí programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems) byly vyhodnoceny získané chromatogramy fragmentační analýzy. Pomocí tohoto programu byly rovněž identifikovány velikosti alel tří použitých mikrosatelitních lokusů.

Vzhledem k tomu, že gen *O* je lokalizován na gonozómu X, bylo možné získat kodominantní markery pouze u samičích jedinců. Proto pro následující odhad alelického složení markerů v populaci byly použity pouze kočky-samice. Vlastní bioinformatické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu Cervus Version 3.0.3 (Kalinowski et al, 2007). Pomocí tohoto programu bylo provedeno hodnocení frekvencí alel v jednotlivých lokusech, pozorovaná heterozygotnost (H_O), předpokládaná heterozygotnost při platnosti Hardy-Weinbergova zákona (H_E) a hodnota polymorfního informačního obsahu (PIC).

5. Výsledky

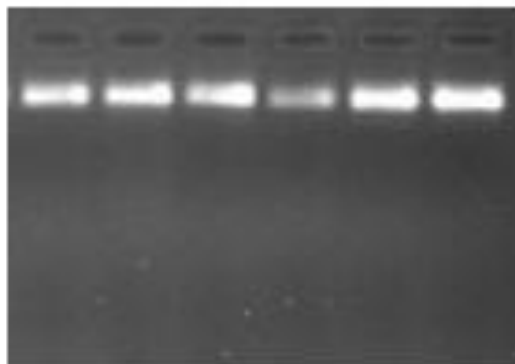
5.1 Správná identifikace barev srsti hodnocených zvířat

Správný popis barvy srsti hodnocených koček byl nutným předpokladem pro výběr modelových jedinců použitých pro optimalizaci molekulárních markerů. Při popisu zbarvení bylo postupováno podle mezinárodních standardů FIFe. U zvířat s průkazem původu byly použity údaje uvedené v tomto dokumentu. Správná identifikace zbarvení srsti nečinila žádný problém. Identifikované barvy a typy kreseb jsou uvedeny v tabulce 21.

5.2 Hodnocení kvality a kvantity izolované DNA

Na obrázku 14 je uveden elektroforeogram testování vysokomolekularity DNA. Z tohoto obrázku vyplývá, že použitým kitem byla vždy získána vysokomolekulární DNA. Na tomto obrázku je patrný jeden fragment. Elektroforetickým testem bylo potvrzeno, že použitý kit spolehlivě odstranil molekuly RNA.

Obrázek 14: Elektroforeogram testování vysokomolekularity genomické DNA kočky domácí



Množství extrahované DNA z jednoho cytologického kartáčku bylo zcela dostatečné a odpovídalo zkušenostem školícího pracoviště s použitím tohoto kitu i u jiných živočichů. Průměrné množství DNA získané z jednoho cytologického stěru bylo 3200 ng. Variabilita výtěžnosti DNA vyjádřená variačním koeficientem odpovídala 14,5 %. Přičemž nižší výtěžnosti DNA byla získána u koťat a u málo socializovaných dospělých jedinců. Poměr absorbcí A260/A280 dosáhl průměrné hodnoty 1,95 a jeho variabilita vyjádřená variačním koeficientem činila 1,3 %. Poměr absorbcí A260/A230 měl průměrnou hodnotu 2,13, jeho

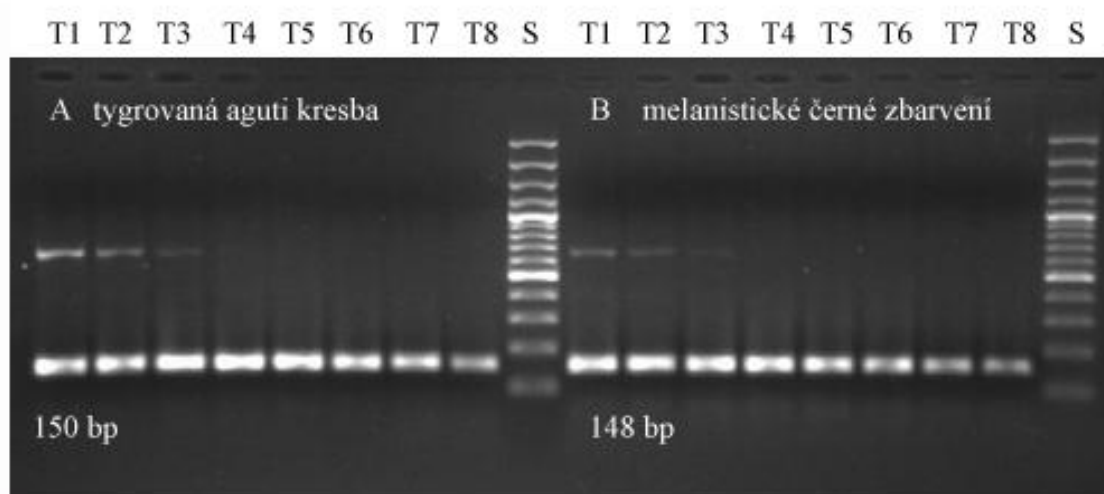
variabilita vyjádřená variačním koeficientem byla 2,4 %. Oba poměry absorbancí odpovídaly velmi čisté genomické DNA. Cílem bakalářské práce nebyla analýza parametrů kvantity a kvality izolované DNA, proto získaná data nebyla podrobněji statisticky zpracována.

5.3 Specifičnost PCR-RFLP markerů genu *ASIP*

5.3.1 Amplifikace PCR-RFLP markeru genu *ASIP*

O navržených primerech (*ASIP-CAT-CZU-F* a *ASIP-CAT-CZU-R*) se předpokládá, že jsou vysoce specifické, a že na templátové DNA kočky domácí nasedají pouze v oblastech *ASIP* genu. Na obrázku 15 jsou znázorněny elektroforeogramy při použití teplotního gradientu, který vedl k nalezení optimální annelační teploty. Z toho obrázku vyplývá, že při použití annelační teploty v intervalu od 60 °C do 66 °C vzniká skutečně jeden specifický produkt. Na tomto obrázku jsou patrné výsledky amplifikace u aguti a černě zbarvené kočky. Z kapitoly 4.5.1 je patrné, že očekávaná velikost u aguti zbarvené kočky je 150 bp a u černě zbarvené kočky 148 bp. Výsledek amplifikace po porovnání s velikostním standardem tomuto předpokladu skutečně odpovídá. Dinukleotidová delece, která způsobuje rozdíl mezi alelami *ASIP* genu však pomocí agarózové elektroforézy není detekovatelná.

Obrázek 15: Teplotní gradient použitý při optimalizaci PCR-RFLP markeru genu *ASIP*



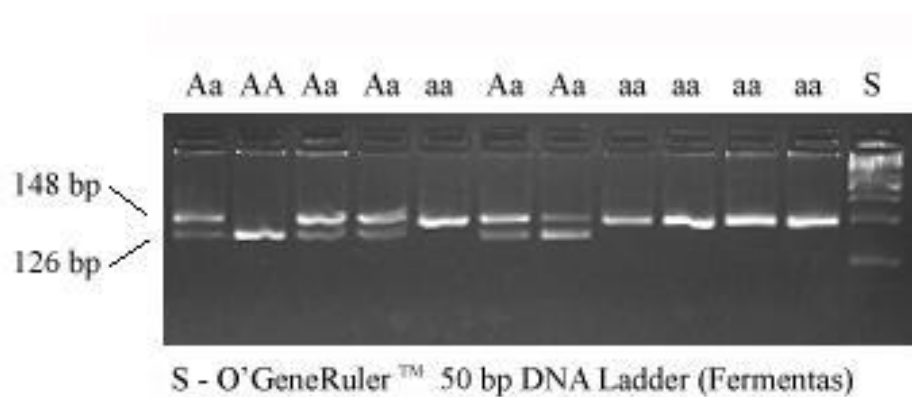
S - O'GeneRuler™ 100 bp Plus (Fermentas)

T1 = 56°C, T2 = 56,7°C, T3 = 58°C, T4 = 60°C, T5 = 62,4°C, T6 = 64,3°C, T7 = 65,5°C, T8 = 66°C

5.3.2 Detekce alel *ASIP* genu pomocí restriční štěpení

V kapitole 4.5.1 bylo popsáno specifické restriční místo enzymu *XcmI*, které se liší u nemutované a mutované alely. Obrázek 16 podává důkaz, že zvolený restriční enzym štěpí ampikon o velikosti 150 bp na očekávané fragmenty o velikosti 126 bp a 24 bp. Z obrázku je rovněž patrný kodominantní charakter navrženého markeru, který umožňuje spolehlivě odlišit homozygotní a heterozygotní jedince.

Obrázek 16: Elektroforeogram PCR-RFPL markeru *ASIP* genu u kočky domácí po rozštěpení enzymem *XcmI*



5.4 Detekované alely genu *ASIP* u hodnocených zvířat a jejich vztah k aguti zbarvení

Pomocí optimalizovaného markeru *ASIP* genu bylo hodnoceno všech 75 jedinců. Genotypy stanovené na základě dokumentovaných elektroforeogramů byly zpracovány v tabulkové formě. Vzhledem k tomu, že mutací (dinukleotidovou delecí) vzniká alela s recesivním způsobem dědičnosti, je tato mutovaná alela označena písmenem malé a. Původní nemutovaná alela vykazuje vůči mutované alele úplnou dominanci a je tudíž v tabulce 21 označena písmenem velké A.

Tabulka 21: Charakteristika hodnocených zvířat a detekované alely genu *ASIP* a mikrosatelitních lokusů – 1. část

Číslo	Plemeno	Pohlaví	Základní barva	Tabby kresba	Typ tabby kresby	Snížená pigmentace	Bílá skvrnitost	Gen <i>ASIP</i>	Mikrosatelitní lokusy - markery genu <i>O</i>		
									FCA1494	FCA1496	FCA1498
1	britská	kocour	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	234	217	233
2	britská	kocour	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	234	217	233
3	britská	kocour	modrá (a)	ne	ne	ne	ne	aa	234	217	231
4	britská x evropská krátkosrstá	kocour	čokoládová (b)	ne	ne	ne	bikolor (03)	aa	234	217	233
5	britská x evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	bikolor (03)	aa	230/234	217/225	233/239
6	britská x evropská krátkosrstá	kočka	modrá (a)	ne	ne	ne	ne	Aa	230/240	227/237	233/235
7	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	bikolor (03)	aa	230	227	239
8	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	230	237	237
9	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	238	231	235
10	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	240	239	233
11	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	ne	AA	240	241	239
12	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	harlekýn (02)	aa	238	233	231
13	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	bikolor (03)	Aa	238	231	235
14	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	van (01)	aa	240	241	235
15	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	230	225	239
16	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	bikolor (03)	Aa	238	233	237
17	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	bikolor (03)	aa	230	225	241
18	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	230	227	235
19	evropská krátkosrstá	kocour	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	230	227	235
20	evropská krátkosrstá	kocour	červená (d)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	aa	244	237	233
21	evropská krátkosrstá	kocour	červená (d)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	244	237	233
22	evropská krátkosrstá	kocour	modrá (a)	ano	tygrováná (23)	ne	bikolor (03)	Aa	230	217	233
23	evropská krátkosrstá	kocour	zlatá (ny)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	240	239	237

Tabulka 21: Charakteristika hodnocených zvířat a detekované alely genu *ASIP* a mikrosatelitních lokusů – 2. část

Číslo	Plemeno	Pohlaví	Základní barva	Tabby kresba	Typ tabby kresby	Snížená pigmentace	Bílá skvrnitost	Gen <i>ASIP</i>	Mikrosatelitní lokusy - markery genu <i>O</i>		
									FCA1494	FCA1496	FCA1498
24	evropská krátkosrstá	kocour	zlatá (ny)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	AA	238	231	235
25	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	240/240	237/239	235/239
26	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	240/242	227/237	233/235
27	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	238/240	233/237	231/233
28	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	230/230	227/241	237/241
29	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	bikolor (03)	aa	230/238	233/237	235/237
30	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	bikolor (03)	aa	242/242	231/231	235/235
31	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	234/238	217/231	235/235
32	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	234/238	217/231	235/237
33	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	230/238	227/231	231/233
34	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	238/238	231/237	235/235
35	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	238/238	227/227	233/235
36	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	harlekýn (02)	aa	238/240	233/239	233/235
37	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	harlekýn (02)	aa	240/240	237/237	233/239
38	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ano	tečkovaná (24)	ne	ne	Aa	240/240	237/237	233/239
39	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	230/240	225/237	239/245
40	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	238/240	233/233	235/245
41	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	234/240	217/237	233/235
42	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	230/240	235/235	233/233
43	evropská krátkosrstá	kočka	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	238/238	231/233	229/239
44	evropská krátkosrstá	kočka	černě želvovinová (f)	ano	mramorovaná (22)	ne	bikolor (03)	Aa	240/244	239/239	233/237
45	evropská krátkosrstá	kočka	černě želvovinová (f)	ano	mramorovaná (22)	ne	bikolor (03)	Aa	240/244	237/241	233/241
46	evropská krátkosrstá	kočka	černě želvovinová (f)	ne	ne	ne	bikolor (03)	aa	242/244	229/241	233/235

Tabulka 21: Charakteristika hodnocených zvířat a detekované alely genu *ASIP* a mikrosatelitních lokusů – 3. část

Číslo	Plemeno	Pohlaví	Základní barva	Tabby kresba	Typ tabby kresby	Snížená pigmentace	Bílá skvrnitost	Gen <i>ASIP</i>	Mikrosatelitní lokusy - markery genu <i>O</i>		
									FCA1494	FCA1496	FCA1498
47	evropská krátkosrstá	kočka	černě želvovinová (f)	ano	mramorovaná (22)	ne	bikolor (03)	Aa	242/244	231/237	233/235
48	evropská krátkosrstá	kočka	černě želvovinová (f)	ne	ne	ne	bikolor (03)	aa	238/244	233/237	233/235
49	evropská krátkosrstá	kočka	černě želvovinová (f)	ne	ne	ne	bikolor (03)	aa	238/244	231/237	229/233
50	evropská krátkosrstá	kočka	černě želvovinová (f)	ne	ne	ne	ne	aa	240/244	237/239	233/235
51	evropská krátkosrstá	kočka	černě želvovinová (f)	ne	ne	ne	ne	aa	240/244	233/237	233/233
52	evropská krátkosrstá	kočka	červená (d)	ano	tygrováná (23)	ne	bikolor (03)	aa	244/244	237/237	233/239
53	evropská krátkosrstá	kočka	červená (d)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	244/244	233/237	233/233
54	evropská krátkosrstá	kočka	modrá (a)	ano	tygrováná (23)	ne	bikolor (03)	Aa	230/238	223/233	235/237
55	evropská krátkosrstá	kočka	modrá (a)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	234/240	217/237	233/235
56	evropská krátkosrstá	kočka	stříbřitá (ns)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	AA	234/238	217/231	233/237
57	evropská krátkosrstá x perská	kocour	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	234	217	233
58	evropská krátkosrstá x perská	kočka	zlatá (ny)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	Aa	240/240	235/239	233/233
59	kartouzská	kocour	modrá (a)	ne	ne	ne	ne	aa	238	231	237
60	kartouzská	kocour	modrá (a)	ne	ne	ne	ne	aa	238	231	237
61	perská	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	234	217	233
62	perská	kocour	černá (n)	ne	ne	ne	ne	aa	234	217	233
63	perská	kocour	kouřová (ns)	ne	ne	ne	ne	aa	240	237	237
64	perská	kocour	stříbřitá (ns)	ano	mramorovaná (22)	ne	ne	Aa	240	235	237
65	perská	kocour	zlatá (y)	ano	mramorovaná (22)	ne	ne	Aa	238	229	231
66	perská	kočka	černá (n)	ano	tygrováná (23)	ne	ne	AA	230/238	225/229	231/239
67	perská	kočka	modrá (a)	ne	ne	ne	ne	aa	238/238	237/237	233/233
68	perská	kočka	stříbřitá (ns)	ano	mramorovaná (22)	ne	ne	Aa	230/240	225/235	237/239
69	perská	kočka	stříbřitá (ns)	ano	mramorovaná (22)	ne	ne	Aa	230/240	225/235	237/239
70	perská	kočka	stříbřitá (ns)	ne	ne	ne	ne	aa	240/244	235/237	233/235

Tabulka 21: Charakteristika hodnocených zvířat a detekované alely genu *ASIP* a mikrosatelitních lokusů – 4. část

Číslo	Plemeno	Pohlaví	Základní barva	Tabby kresba	Typ tabby kresby	Snížená pigmentace	Bílá skvrnitost	Gen <i>ASIP</i>	Mikrosatelitní lokusy - markery genu <i>O</i>		
									FCA1494	FCA1496	FCA1498
71	perská	kocour	štříbřítá (ns)	ano	mramorovaná (22)	ne	ne	Aa	234	217	233
72	perská	kocour	bílá (w)	ne	ne	ne	ne	AA	240	237	237
73	perská	kocour	černá (n)	ano	tygrovaná (23)	ne	ne	AA	240	237	237
74	ragdoll	kočka	černá (n)	ne	ne	barmská (31)	mitted (04)	aa	240/240	217/225	237/239
75	siamská	kočka	černá (n)	ne	ne	siamská (33)	ne	aa	240/240	235/237	233/235

Z tabulky 21 jasně vyplývá, že všechny melanistické kočky tj. kočky se základní černou barvou bez přítomnosti tabby kresby jsou z hlediska genu *ASIP* vždy recesivní homozygoti *aa*, a to bez ohledu na to zda tyto jedinci byli celoplášťově černí nebo zda byli bíle skvrnití. Recesivní homozygotní sestava *aa* byla rovněž zjištěna u všech koček bez tabby kresby se zředěnou základní barvou (modrá, čokoládová, stříbřitá, kouřová). Výskyt recesivních homozygotů *aa* byl prokázán rovněž u koček se siamskými a barmkými znaky. V kolekci hodnocených koček se nacházeli jedinci, kteří byli červeně a želvovinově zbarvení. U těchto zvířat se nacházely jak recesivní tak dominantní alely genu *ASIP*. Vzhledem k tomu, že se předpokládá, že gen *O* je epistatický nad genem *A*, může být kombinace alel genu *A* libovolná, zbarvení je vždy červené nebo želvovinové.

5.5 Vyhodnocení frekvencí alel genu *ASIP* z hlediska populační genetiky

Pomocí programu Cervus Version 3.0.3 (Kalinowski et al, 2007) byly stanoveny charakteristiky modelové populace koček z hlediska variability alel genu *ASIP*. Získané údaje jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 22: Frekvence alel genu *ASIP* v modelové populaci koček

Alela	Počet alel	Výskyt u heterozygotů	Výskyt u homozygotů	Frekvence [%]
A	41	29	6	27,33
a	109	29	40	72,67

Program Cervus Version 3.0.3 (Kalinowski et al, 2007) byl použit rovněž pro vyhodnocení pozorované heterozygotnosti – $H_O=0,387$ a očekávané heterozygotnosti $H_E=0,400$. Tímto programem bylo rovněž potvrzeno, že rozdíly mezi H_O a H_E jsou minimální a rozdělení genotypů a alel v této modelové populaci můžeme považovat za odpovídající podmínkám Hardy-Weinbergova zákona.

5.6 Sekvenační analýza genu *ASIP*

5.6.1 Zjištěné sekvence markeru genu *ASIP*

Sekvenační analýza byla provedena u jedinců, u kterých na základě PCR-RFLP markeru byla předpokládána homozygotní sestava nemutovaných alel AA (jedinci číslo 11, 24, 56), jedinců s homozygotní sestavou recesivních alel (jedinci číslo 4, 8, 12) a u heterozygotních jedinců Aa (jedinci číslo 1, 19, 41). Zbarvení srsti sekvenovaných jedinců je uvedeno v tabulce 21. Sekvence byla provedena od F i od R primeru a pomocí programu CLC Main Workbench 6.0.1. byla stanovena konsensus sekvence. Z tohoto hodnocení však jednoznačně vyplynulo, že všichni jedinci, kteří mají z hlediska genu *ASIP* shodný genotyp stanovený na základě PCR-RFLP markeru, vykazovali rovněž zcela identické sekvence. Výsledky sekvenace jsou znázorněny v následující tabulce.

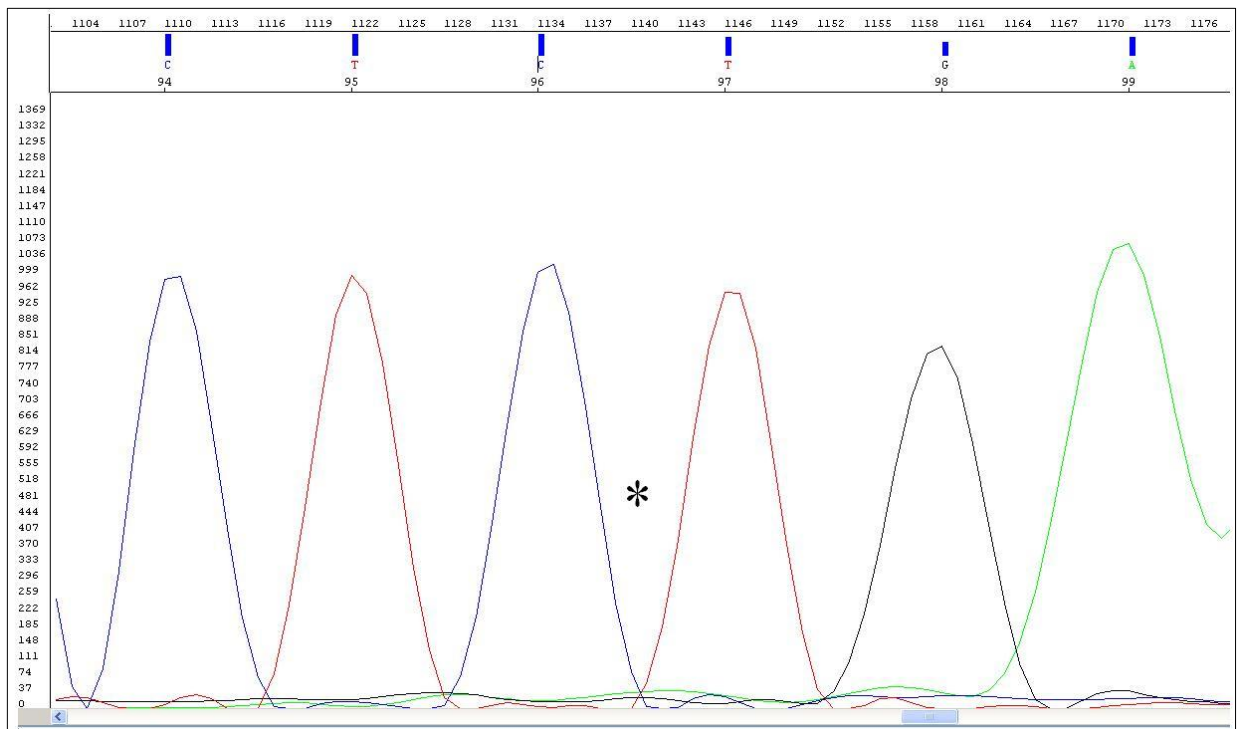
Tabulka 23: Sekvence PCR-RFLP markeru genu *ASIP* u kočky domácí s genotypem AA, aa a Aa

genotyp: AA AATATCCTCCGCCTACTCCTGGCCACCCTGCTGGTCTGCCTGTGCCTCCTCACTGC CTACAGTCACCTGGCACCTGAGGAAAAACCCAGAGATGACAGGAACCTGAGGAG CAACTCCTC CA TGAACATGTTGGATCTCTCTTCTGTCTCT
genotyp aa AATATCCTCCGCCTACTCCTGGCCACCCTGCTGGTCTGCCTGTGCCTCCTCACTGC CTACAGTCACCTGGCACCTGAGGAAAAACCCAGAGATGACAGGAACCTGAGGAG CAACTCCTC -- TGAACATGTTGGATCTCTCTTCTGTCTCT
genotyp Aa AATATCCTCCGCCTACTCCTGGCCACCCTGCTGGTCTGCCTGTGCCTCCTCACTGC CTACAGTCACCTGGCACCTGAGGAAAAACCCAGAGATGACAGGAACCTGAGGAG CAACTCCTC YRWRMAYRTKKRKMTCCTCTYYTSTSTCTCT

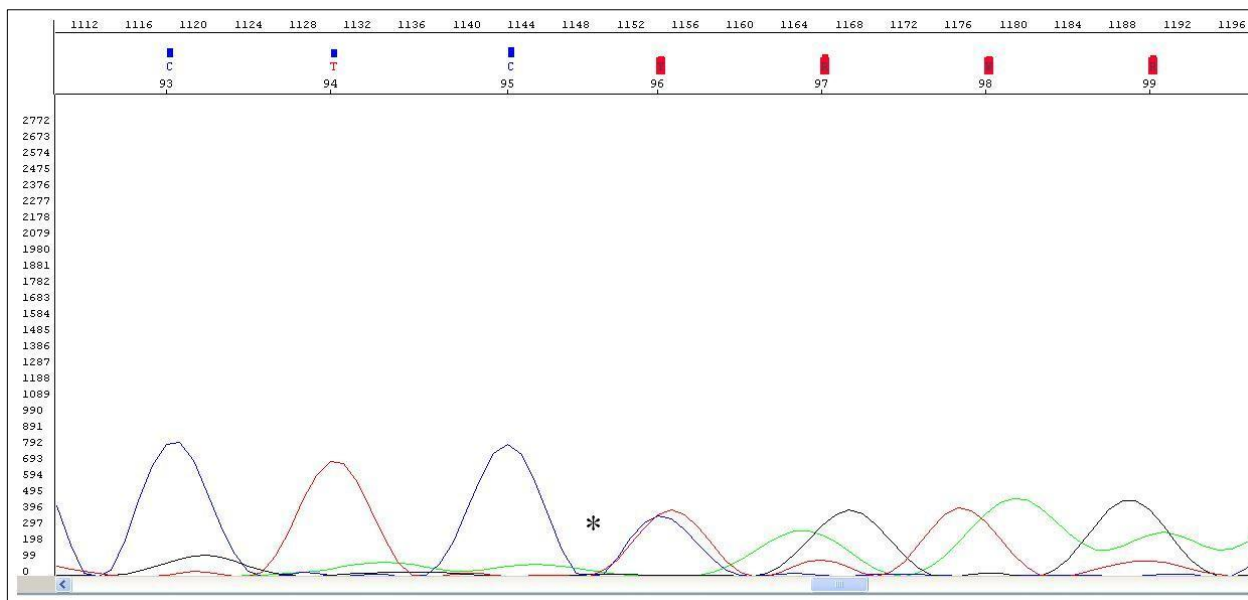
Ze sekvence heterozygotního genotypu je patrný překryv bází od místa delece, který je způsobený tím, že byly současně sekvenovány obě alely – nemutovaná alela o délce 150 bp a mutovaná alela o délce 148 bp. Pro označení překrývajících se bází byl použit systém dle

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, 2012). Na obrázcích 17 a 18 jsou uvedeny výřezy chromatogramů u homozygotní mutované kočky a u heterozygotní kočky.

Obrázek 17: Výřez sekvence mutované alely markeru genu *ASIP* – výstup programu DNA Sequencing Analysis Software ver. 5.1 (Applied Biosystems), místo, kde došlo k deleci CA je označeno hvězdičkou

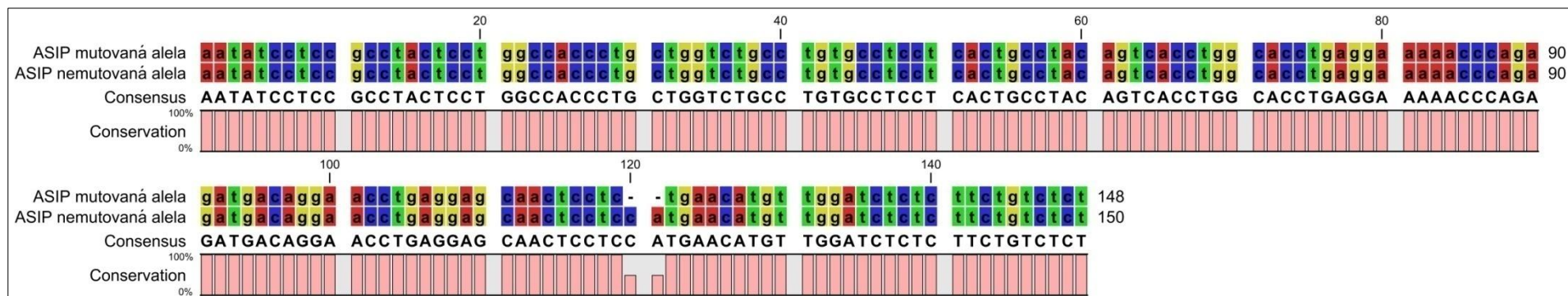


Obrázek 18: Výřez sekvence heterozygota markeru genu *ASIP* – výstup programu DNA Sequencing Analysis Software ver. 5.1 (Applied Biosystems), místo, kde došlo k delecí CA u mutované alely je označeno hvězdičkou



Porovnání sekvencí dominantní a recesivní alely je uvedeno na obrázku 19, který byl získán jako výstup programu CLC Main Workbench 6.0.1. Z tohoto obrázku je patrné, že i u jedinců hodnocených v bakalářské práci byl potvrzen rozdíl mezi alelami genu *ASIP* spočívající v dinukleotidové delecí CA.

Obrázek 19: Porovnání získaných sekvencí mutované a nemutované alely genu *ASIP* pomocí programu CLC Main Workbench 6.0.1.



5.6.2 Porovnání získaných sekvencí alel genu *ASIP* s mezinárodní nukleotidovou databází NCBI

Pomocí bioinformatického nástroje BLAST byly sekvence PCR-RFLP markeru nemutované i mutované alely porovnány s databází sekvencí jiných organismů než je člověk (*Homo sapiens*). Na následujících obrázcích 21 a 22 jsou uvedeny sekvenční podobnosti navrženého PCR markeru s ostatními organismy. Z obrázku 20 vyplývá, že v nukleotidové databázi je uložena sekvence nemutované alely genu *ASIP*. S touto sekvencí námi používaný PCR-RFLP marker vykazoval 100% sekvenční shodu. Sekvence mutované recesivní alely vykazovala s výše uvedenou sekvencí shodu pouze na úrovni 99%. Tento rozdíl byl způsoben již výše zmiňovanou dinukleotidovou delecí. Tento výsledek je dokumentován rovněž obrázky 21 a 22.

Obrázek 20: Porovnání sekvence alel markeru se sekvencí NCBI AY237394.1

A nemutovaná alela

```
>gb|AY237394.1| G Felis catus agouti signaling protein (ASIP) gene, complete cds
Length=4399

GENE ID: 492297 ASIP | agouti signaling protein [Felis catus]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 278 bits (150), Expect = 9e-72
Identities = 150/150 (100%), Gaps = 0/150 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1  AATATCCTCCGCCTACTCCTGGCCACCCTGCTGGTCTGCCTGTGCCTCCTCACTGCCTAC 60
      |||
Sbjct 16  AATATCCTCCGCCTACTCCTGGCCACCCTGCTGGTCTGCCTGTGCCTCCTCACTGCCTAC 75

Query 61  AGTCACCTGGCACCTGAGGAAAAACCCAGAGATGACAGGAACCTGAGGAGCAACTCCTCC 120
      |||
Sbjct 76  AGTCACCTGGCACCTGAGGAAAAACCCAGAGATGACAGGAACCTGAGGAGCAACTCCTCC 135

Query 121 ATGAACATGTTGGATCTCTTCTGTCTCT 150
      |||
Sbjct 136 ATGAACATGTTGGATCTCTTCTGTCTCT 165
```

B mutovaná alela

```
>gb|AY237394.1| G Felis catus agouti signaling protein (ASIP) gene, complete cds
Length=4399

GENE ID: 492297 ASIP | agouti signaling protein [Felis catus]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 265 bits (143), Expect = 7e-68
Identities = 148/150 (99%), Gaps = 2/150 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 1  AATATCCTCCGCCTACTCCTGGCCACCCTGCTGGTCTGCCTGTGCCTCCTCACTGCCTAC 60
      |||
Sbjct 16  AATATCCTCCGCCTACTCCTGGCCACCCTGCTGGTCTGCCTGTGCCTCCTCACTGCCTAC 75

Query 61  AGTCACCTGGCACCTGAGGAAAAACCCAGAGATGACAGGAACCTGAGGAGCAACTCCTC- 119
      |||
Sbjct 76  AGTCACCTGGCACCTGAGGAAAAACCCAGAGATGACAGGAACCTGAGGAGCAACTCCTCC 135

Query 120 -TGAACATGTTGGATCTCTTCTGTCTCT 148
      |||
Sbjct 136 ATGAACATGTTGGATCTCTTCTGTCTCT 165
```

Obrázek 21: Porovnání nemutované alely markeru genu *ASIP* s databází NCBI

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NM_001009190.1	Felis catus agouti signaling protein (ASIP), mRNA	278	278	100%	9e-72	100%
AY237394.1	Felis catus agouti signaling protein (ASIP) gene, complete cds	278	278	100%	9e-72	100%
NM_001007263.1	Canis lupus familiaris agouti signaling protein (ASIP), mRNA >gb AY714374.1 Canis fa	174	174	100%	1e-40	88%
DQ288670.1	Canis lupus agouti signal peptide (ASIP) gene, exon 2 and partial cds	174	174	100%	1e-40	88%
DQ288669.1	Canis familiaris agouti signal peptide (ASIP) gene, exon 2 and partial cds	174	174	100%	1e-40	88%
Y09877.2	Vulpes vulpes mRNA for agouti protein	174	174	100%	1e-40	88%
NM_001164331.1	Papio anubis agouti signaling protein (ASIP), mRNA	152	152	94%	6e-34	86%
NM_001135627.1	Pan troglodytes agouti signaling protein (ASIP), mRNA	152	152	94%	6e-34	86%
AB299220.1	Macaca sylvanus ASIP gene for agouti signaling protein, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
EF094492.1	Trachypithecus obscurus ASIP (ASIP) gene, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
EF094491.1	Trachypithecus francoisi ASIP (ASIP) gene, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
EF094490.1	Trachypithecus cristatus ASIP (ASIP) gene, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
EF094489.1	Trachypithecus auratus ASIP (ASIP) gene, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
EF094488.1	Semnopithecus entellus ASIP (ASIP) gene, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
EF094487.1	Papio anubis ASIP (ASIP) gene, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
EF094483.1	Macaca sylvanus ASIP (ASIP) gene, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
EF094481.1	Pan troglodytes ASIP (ASIP) gene, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
AB236881.1	Colobus polykomos gene for agouti signaling protein, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
AB236880.1	Trachypithecus cristatus gene for agouti signaling protein, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
AB236879.1	Trachypithecus obscurus gene for agouti signaling protein, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
AB236878.1	Semnopithecus entellus gene for agouti signaling protein, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
AB236877.1	Cercopithecus mitis gene for agouti signaling protein, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
AB236871.1	Gorilla gorilla gene for agouti signaling protein, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
AB236870.1	Pan paniscus gene for agouti signaling protein, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
AB236869.1	Pan troglodytes gene for agouti signaling protein, complete cds	152	152	94%	6e-34	86%
HM071838.1	Macaca nemestrina isolate 1215 agouti signaling protein (ASIP) gene, partial cds	150	150	94%	2e-33	86%
HM071836.1	Macaca nemestrina isolate 664 agouti signaling protein (ASIP) gene, partial cds	150	150	94%	2e-33	86%

Obrázek 22: Porovnání mutované alely markeru genu *ASIP* s databází NCBI

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NM_001009190.1	Felis catus agouti signaling protein (ASIP), mRNA	<u>265</u>	265	100%	7e-68	99%
AY237394.1	Felis catus agouti signaling protein (ASIP) gene, complete cds	<u>265</u>	265	100%	7e-68	99%
NM_001007263.1	Canis lupus familiaris agouti signaling protein (ASIP), mRNA >gb AY714374.1 Canis fa	<u>172</u>	172	100%	4e-40	88%
DQ288670.1	Canis lupus agouti signal peptide (ASIP) gene, exon 2 and partial cds	<u>172</u>	172	100%	4e-40	88%
DQ288669.1	Canis familiaris agouti signal peptide (ASIP) gene, exon 2 and partial cds	<u>172</u>	172	100%	4e-40	88%
Y09877.2	Vulpes vulpes mRNA for agouti protein	<u>172</u>	172	100%	4e-40	88%
NM_001164331.1	Papio anubis agouti signaling protein (ASIP), mRNA	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
NM_001135627.1	Pan troglodytes agouti signaling protein (ASIP), mRNA	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
AB299220.1	Macaca sylvanus ASIP gene for agouti signaling protein, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
EF094492.1	Trachypithecus obscurus ASIP (ASIP) gene, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
EF094491.1	Trachypithecus francoisi ASIP (ASIP) gene, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
EF094490.1	Trachypithecus cristatus ASIP (ASIP) gene, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
EF094489.1	Trachypithecus auratus ASIP (ASIP) gene, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
EF094488.1	Semnopithecus entellus ASIP (ASIP) gene, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
EF094487.1	Papio anubis ASIP (ASIP) gene, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
EF094483.1	Macaca sylvanus ASIP (ASIP) gene, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
EF094481.1	Pan troglodytes ASIP (ASIP) gene, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
AB236881.1	Colobus polykomos gene for agouti signaling protein, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
AB236880.1	Trachypithecus cristatus gene for agouti signaling protein, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
AB236879.1	Trachypithecus obscurus gene for agouti signaling protein, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
AB236878.1	Semnopithecus entellus gene for agouti signaling protein, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
AB236877.1	Cercopithecus mitis gene for agouti signaling protein, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
AB236871.1	Gorilla gorilla gene for agouti signaling protein, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
AB236870.1	Pan paniscus gene for agouti signaling protein, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
AB236869.1	Pan troglodytes gene for agouti signaling protein, complete cds	<u>150</u>	150	94%	2e-33	86%
HM071838.1	Macaca nemestrina isolate 1215 agouti signaling protein (ASIP) gene, partial cds	<u>148</u>	148	93%	7e-33	86%
HM071836.1	Macaca nemestrina isolate 664 agouti signaling protein (ASIP) gene, partial cds	<u>148</u>	148	93%	7e-33	86%

Z obrázků 21 a 22 vyplývá, že sekvence nemutované i mutované alely genu *ASIP* vykazovala poměrně vysoký stupeň homologie se sekvencemi genu *ASIP* u dalších savců. Homologie byla zjištěna se sekvencemi genu *ASIP* psa domácího (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758), vlka obecného (*Canis lupus* Linnaeus, 1758), lišky obecné (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758), paviána anubi (*Papio anubis* Lesson, 1827), šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes* Blumenbach, 1775), makaka magota (*Macaca sylvanus* Linnaeus, 1758), makaka vepřího (*Macaca nemestrina* Linnaeus, 1766), hulmana tmavého (*Trachypithecus obscurus* Reid, 1837), hulmana uzdičkového (*Trachypithecus francoisi* Pousargues, 1898), hulmana stříbrného (*Trachypithecus cristatus* Raffles, 1821), hulmana jávského (*Trachypithecus auratus* É. Geoffroy, 1812), hulmana posvátného (*Semnopithecus entellus* Dufresne, 1797), guerézy běloramenné (*Colobus polykomos* Zimmermann, 1780).

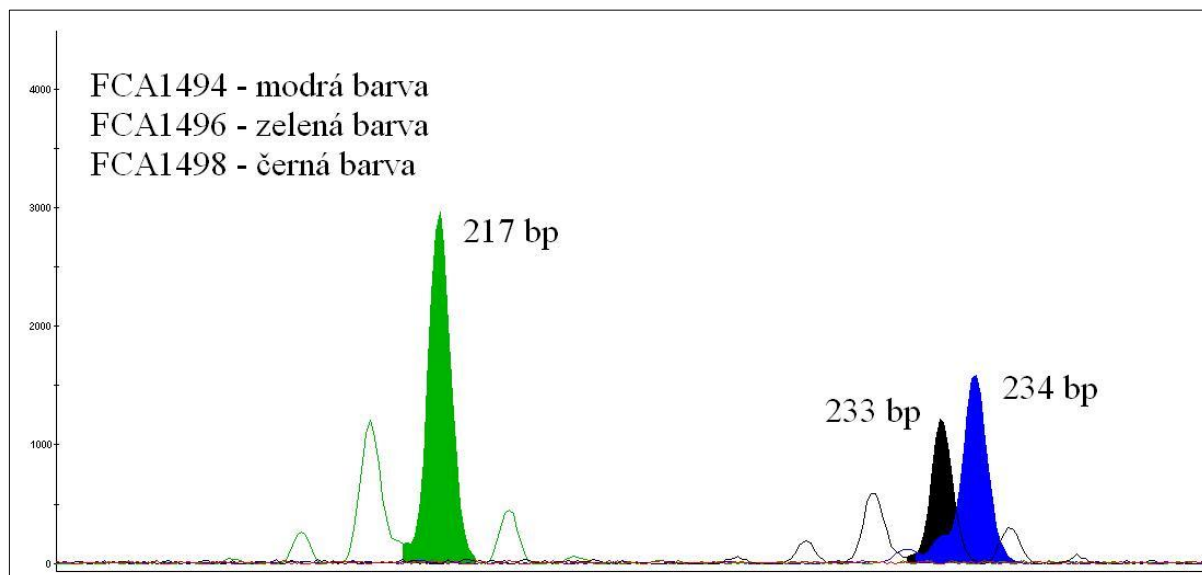
Tyto výsledky svědčí o značné homologii genu *ASIP* napříč různými druhy savců. Je obecně známo, že mutace tohoto genu vedou ke změně zbarvení srsti. Nelze však obecně konstatovat, že identická dinukleotidová delece, která byla popsána u kočky domácí, bude kauzální mutací vedoucí k melanismu i u jiných savců. Této problematice se budu věnovat v kapitole 6. Diskuze.

5.7 Detekované alely SSR markeru červeného zbarvení srsti a jejich vztah ke skutečnému fenotypu

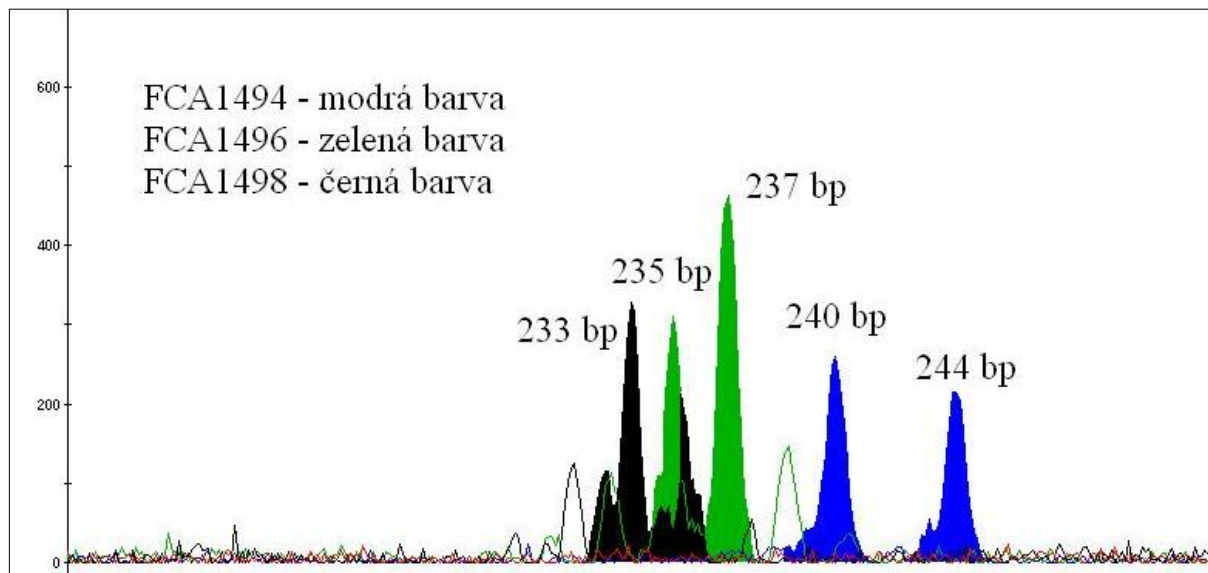
5.7.1 Polymorfismy mikrosatelitních markerů amplifikovaných v multiplex systému

Pro markerování alely genu *O* zodpovědné za červené zbarvení srsti byly při řešení bakalářské práce vybrány tři mikrosatelitní lokusy (FCA1494, FCA1496, FCA1498), u kterých je předpokládána vazba na gen *O* (Schmidt-Kützel et al, 2009). Tento autorský kolektiv se věnoval zejména mapování genu *O* na gonozómu X. Neuvádí však ani podmínky amplifikace výše uvedených mikrosatelitních lokusů, ani velikosti alel, které jsou vázány na gen *O*. Optimalizovaný metodický postup multiplex-SSR markeru uvedený v kapitole 4.6.3 je možné považovat rovněž za výsledek bakalářské práce. Na obrázcích 23 a 24 jsou uvedeny vzorové chromatogramy multiplex-SSR markeru.

Obrázek 23: Detekce alel mikrosatelitních lokusů FCA1494, FCA1496 a FCA1498 u kocoura



Obrázek 24: Detekce alel mikrosatelitních lokusů FCA1494, FCA1496 a FCA1498 u kočky – samice



V tabulce 21 jsou uvedeny detekované alelické kombinace hodnocených mikrosatelitních lokusů. Z této tabulky i z předchozích obrázků jasně vyplývá, že u všech kocourů byla u každého lokusu detekována vždy jedna alela. Tato situace odpovídá lokalizaci markerů na

nehomologní části gonozómu X. Proto jsou kocouři z tohoto pohledu hemizygotní. Naopak kočky – samice vykazovaly standardní podvojně založení dědičnosti.

5.7.2 Variabilita alel hodnocených mikrosatelitních lokusů

V následujících tabulkách jsou uvedeny počty alel a jejich frekvence, které byly zjištěny u modelové populace kočky domácí. Tyto tabulky jsou zpracovány odděleně pro kočky, kocoury a obě pohlaví dohromady.

Tabulka 24: Počty a frekvence alel mikrosatelitních lokusů zjištěných u samic

Mikrosatelitní lokusy	Alela	Počet	Frekvence [%]
FCA 1494	230	12	14,29
	234	6	7,14
	238	21	25,00
	240	28	33,33
	242	4	4,76
	244	13	15,48
FCA 1496	217	7	8,33
	223	1	1,19
	225	6	7,14
	227	6	7,14
	229	2	2,38
	231	10	11,90
	233	10	11,90
	235	7	8,33
	237	26	30,95
	239	6	7,14
	241	3	3,57
	FCA 1498	229	2
231		3	3,57
233		32	38,10
235		23	27,38
237		9	10,71
239		11	13,10
241		2	2,38
245		2	2,38

Tabulka 25: Počty a frekvence alel mikrosatelitních lokusů zjištěných u samců

Mikrosatelitní lokusy	Alela	Počet	Frekvence [%]
FCA 1494	230	7	21,21
	234	8	24,24
	238	8	24,24
	240	8	24,24
	244	2	6,06
FCA 1496	217	9	27,27
	225	2	6,06
	227	3	9,09
	229	1	3,03
	231	5	15,15
	233	2	6,06
	235	1	3,03
	237	6	18,18
	239	2	6,06
	241	2	6,06
FCA 1498	231	3	9,09
	233	11	33,33
	235	6	18,18
	237	9	27,27
	239	3	9,09
	241	1	3,03

Tabulka 26: Frekvence alel mikrosatelitních lokusů zjištěných u obou pohlaví - 1. část

Mikrosatelitní lokusy	Alela	Počet	Frekvence [%]
FCA 1494	230	19	16,24
	234	14	11,97
	238	29	24,79
	240	36	30,77
	242	4	3,42
	244	15	12,82
	FCA 1496	217	16
223		1	0,85
225		8	6,84
227		9	7,69
229		3	2,56
231		15	12,82
233		12	10,26
235		8	6,84
237		32	27,35
239		8	6,84
241		5	4,27

Tabulka 26: Frekvence alel mikrosatelitních lokusů zjištěných u obou pohlaví - 2. část

Mikrosatelitní lokusy	Alela	Počet	Frekvence [%]
FCA 1498	229	2	1,71
	231	6	5,13
	233	43	36,75
	235	29	24,79
	237	18	15,38
	239	14	11,97
	241	3	2,56
	245	2	1,71

5.7.3 Populačně genetická charakteristika alelických kombinací mikrosatelitních lokusů FCA1494, FCA1496 a FCA1498

Vzhledem k tomu, že všichni kocouři – samci jsou hlediska výše uvedených lokusů hemizygoti, není možné se na soubor všech jedinců dívat z hlediska možnosti programového vyhodnocení jako na populaci podvojně založených genotypů. Proto pro populační hodnocení byli použiti pouze samičí jedinci, pro které platí podvojně založení dědičnosti. Výstupem programu Cervus Version 3.0.3 (Kalinowski et al, 2007) bylo hodnocení pozorované heterozygotnosti, očekávané heterozygotnosti a parametru PIC. Tyto výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 27. U hemizygotních kocourů byl stanoven pouze počet alel v jednotlivých lokusech – tabulka 28.

Tabulka 27: Populační hodnocení alel mikrosatelitních lokusů u jedinců samičího pohlaví

Mikrosatelitní lokusy	Počet alel	Heterozygotnost		PIC
		pozorovaná (H_O)	Očekávaná (H_E)	
FCA1494	6	0,667	0,789	0,747
FCA1496	11	0,786	0,855	0,830
FCA1498	8	0,810	0,757	0,810

Tabulka 28: Počty alel mikrosatelitních lokusů u jedinců samčího pohlaví

Mikrosatelitní lokusy	Počet alel
FCA1494	5
FCA1496	10
FCA1498	6

Programem Cervus Version 3.0.3 (Kalinowski et al, 2007) bylo potvrzeno, že frekvence H_O a H_E v souboru hodnocených samic byly podobné a jejich distribuci lze chápat za odpovídající rovnováze podle Hardy-Weinbergova zákona. Z hodnot PIC vyplývá, že nejvyšší polymorfní informační obsah byl u lokusu FCA1496, který je současně charakterizován největším počtem detekovaných alel. Z porovnání počtu alel u koček a kocourů (tabulky 27 a 28) vyplývá, že u všech mikrosatelitních lokusů byl zjištěn vyšší počet alel u samic. Příčinu tohoto výsledku lze nalézt v tom, že kocouři mají oproti kočkám pouze jeden gonozóm X, kde jsou tyto alely lokalizovány.

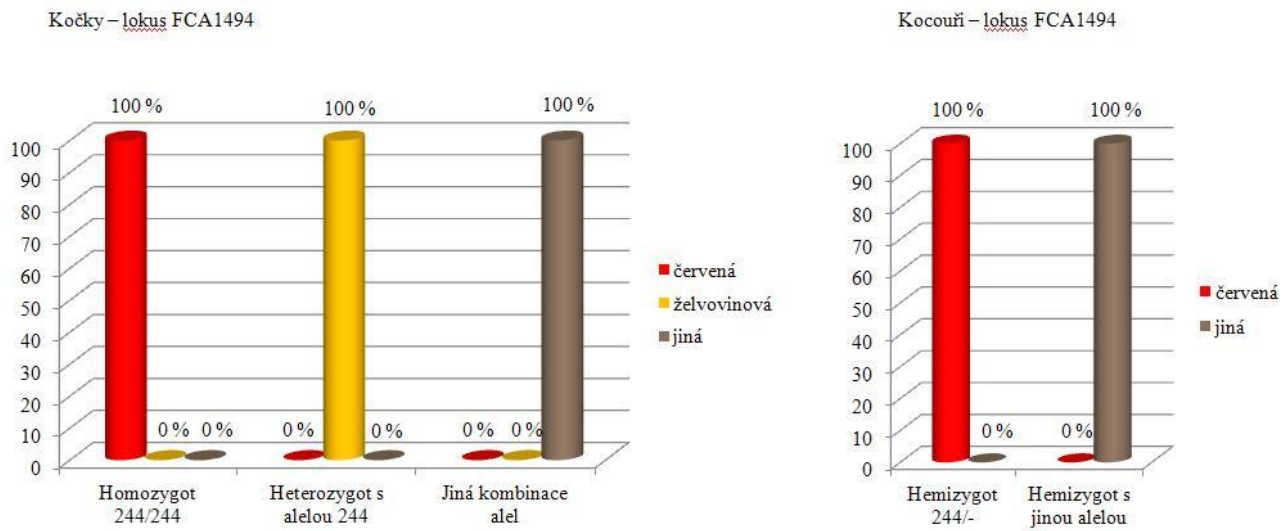
5.7.4 Identifikace alel mikrosatelitních lokusů vázaných na gen *O* a vyhodnocení frekvencí rekombinací

Již v literární rešerši bylo uvedeno, že Schmidt-Kützel et al (2009) nespécifikovali které konkrétní alely mikrosatelitních lokusů jsou vázány na dominantní alelu genu *O*. Při řešení bakalářské práce jsem vyšla z hypotézy, že pro identifikaci těchto alel budou nejvhodnější hemizygotní červeně zbarvení kocouři – tabulka 21. Z této tabulky lze vyvodit závěr, že s červenou barvou respektive genem *O* budou zřejmě ve vazbě následující alely FCA1494 – 244 bp, FCA1496 – 237 bp, FCA1498 – 233 bp.

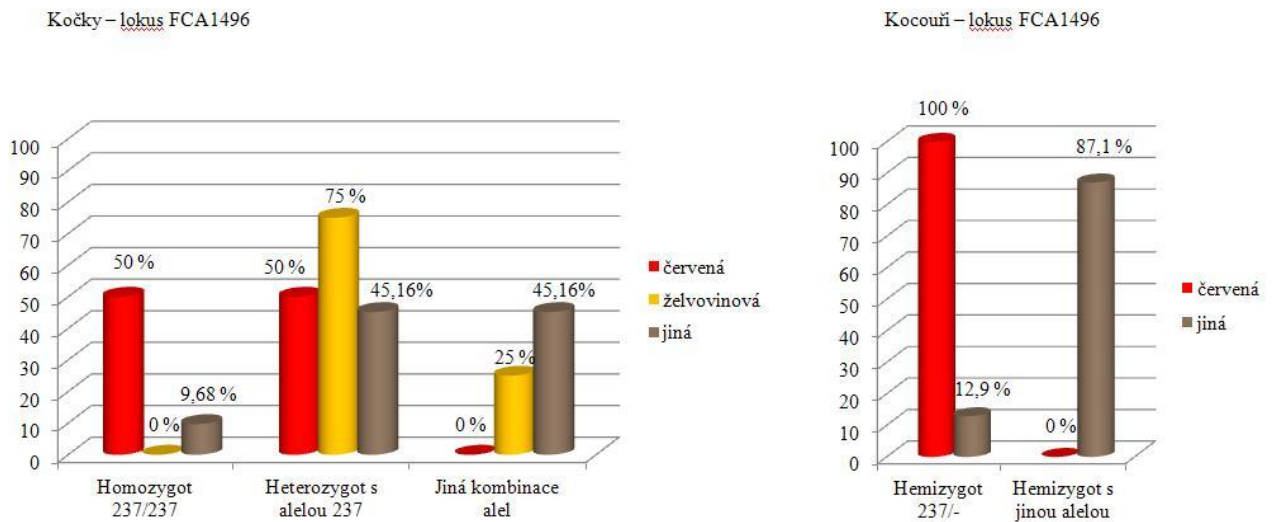
Použité mikrosatelitní markery představují vazebný typ markeru. Čím blíže je tento marker vůči genu *O*, tím budou vznikat rekombinovaní jedinci s menší frekvencí. Jako rekombinovaný jedinec je míněno zvíře, které nese markerující alelu a nemá při tom červené respektive želvovinové zbarvení nebo se naopak jedná o jedice s červenou nebo želvovinovou barvou srsti, který nenesé předpokládanou markerující alelu.

Pro studium rekombinací bylo stanoveno, jaká část homozygotů a hemizygotů s markerující alelou, heterozygotů s markerující alelou, jedinců s oběmi nemarkerujícími alelami současně vykazuje červené zbarvení, želvovinové zbarvení a jiný typ zbarvení. Výsledky hodnocení rekombinací jsou zpracovány formou grafů 1, 2 a 3.

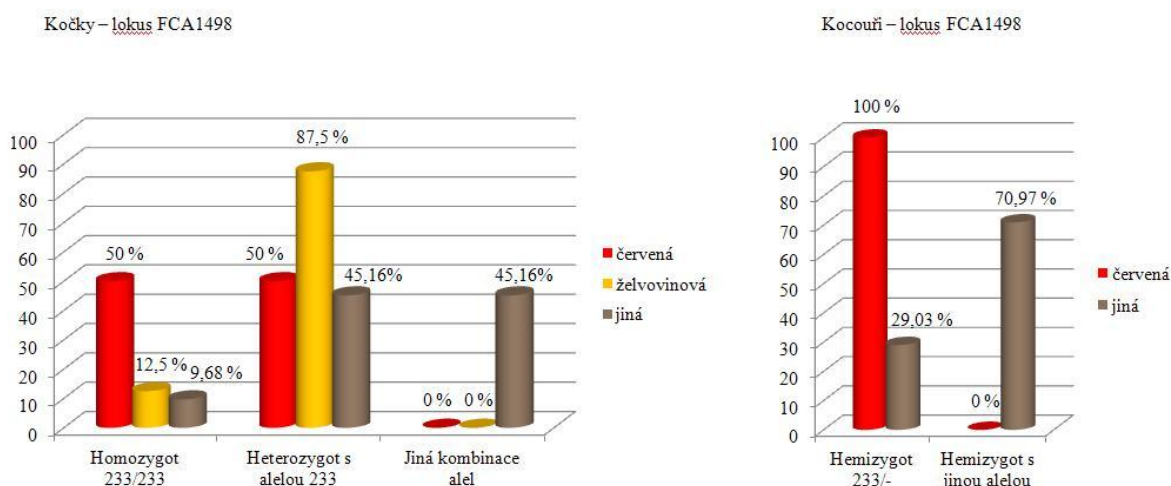
Graf 1: Studium rekombinací u lokusu FCA1494



Graf 2: Studium rekombinací u lokusu FCA1496



Graf 3: Studium rekombinací u lokusu FCA1498



Z výše uvedených grafů vyplývá, že u lokusu FCA1494 nebyly zjištěny žádné rekombinace mezi markerující alelou 244 bp a očekávaným fenotypovým projevem červené respektive želvovinové barvy. To znamená, že všichni kocouři s hemizygotní kombinací 244/- měli červené zbarvení srsti. Hemizygoti s jinou alelou nebyli nikdy zbarveni červeně. Všechny kočky s homozygotní kombinací alel 244/244 byly rovněž zbarveny červeně. Všechny kočky s heterozygotním genotypem, které nesly právě jednu alelu 244 bp byly želvovinové. Kočky, které měly jiné než červené nebo želvovinové zbarvení srsti, nikdy nebyly nositelky alely 244 bp.

Z grafu 2, který se týká lokusu FCA1496 vyplývá, že u 12,9 % kocourů došlo k rekombinaci mezi přítomností markerující alely a patřičným zbarvením srsti. U koček je patrné, že pouze 50 % homozygotních samic 237/237 vykazovalo červené zbarvení srsti. Rovněž u želvovinového zbarvení byly zjištěny rekombinace. Pouze 75 % koček s heterozygotním genotypem nesoucí právě jednu alelu 237 bp mělo skutečně želvovinové zbarvení srsti.

Na grafu 3 je znázorněna situace u lokusu FCA1498. Z tohoto grafu vyplývá, že u kocourů došlo k rekombinaci mezi markerující alelou 233 bp a odpovídajícím zbarvením srsti s četností 29,03 %. U samic bylo zjištěné červené zbarvení srsti pouze u 50 % homozygotů 233/233. Rekombinace byly rovněž zjištěny u želvovinového zbarvení, kdy toto zbarvení bylo charakteristické pouze pro 87,5 % heterozygotů právě s jednou alelou 233 bp.

6. Diskuze

6.1 Výběr hodnocených zvířat a zajištění biologického materiálu

6.1.1 Hodnocená zvířata a správná identifikace jejich zbarvení

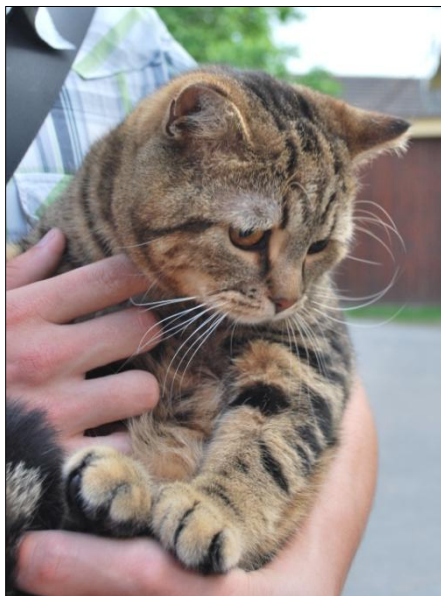
Jako modelové zvíře pro studium barvy srsti byla vybrána kočka domácí a to hned z několika důvodů. Jedním z důvodů je skutečnost, že mezi jedinci domestikované kočky se nacházejí zástupci, kteří mají zcela identické zbarvení srsti jako nedomestikovaný předek – kočka divoká. Dalším z důvodů byla ta skutečnost, že napříč plemeny kočky domácí se nachází široká variabilita ve zbarvení srsti. Neposledním důvodem byl fakt, že počet čistokrevných i nečistokrevných koček je poměrně vysoký a zejména u majitelů nečistokrevných zvířat se dal očekávat jejich souhlas s neinvazivním odběrem biologického materiálu.

Z obdobných předpokladů vychází i řada autorů, kteří studovali geny zodpovědné za zbarvení srsti. Například Menotti-Raymond et al. (2009) získali vzorky kočky domácí od jednotlivých chovatelů nebo z veterinárních klinik. Eizirik et al. (2010) se ve svých experimentech zaměřených na molekulární studie typu kresby aguti koček věnovali zejména nečistokrevným zvířatům běžně chovaných v domácnostech. Podobný přístup k volbě výchozího biologického materiálu použili i Schmidt-Küntzel et al. (2009). Při řešení své bakalářské práce jsem se rovněž obrátila na řadu chovatelů zvířat s průkazem původu i bez průkazu původu. Za významný zdroj vhodných zvířat považuju i útulky a depozity opuštěných koček.

Správná identifikace zbarvení byla klíčová pro výběr jedinců pro následné molekulární analýzy. U zvířat s průkazem původu nebyl problém provést správnou charakterizaci jejich zbarvení. Určité problémy obvykle nastávaly u nečistokrevných zvířat chovaných v běžných domácnostech. Snad s výjimkou melanistického – černého zbarvení, bylo zbarvení zvířat popsané chovatelem popsáno mnohdy velice laickým způsobem. Často nejednoznačné zbarvení srsti se týkalo zejména různých typů tabby kresby (Eizirik et al., 2010) nebo různého typu ředění základní barvy srsti (Menotti-Raymond et al., 2009). U koček s variabilní tabby kresbou bylo typické označení chovatelem, že se jedná o hnědého, šedého nebo šedohnědého mourka. Na základě velice dobré komunikaci s majiteli se podařilo získat fotodokumentaci zvířat a z ní správně určit jejich zbarvení. Značné polymorfismy ve zbarvení tabby kresby zmiňují například Lyons et al. (2006) nebo Ragni a Possenti (1996). Na následujícím obrázku

je uveden příklad zvířete, jehož zbarvení bylo chovatelem laicky označeno jako hnědý mourek. Na základě fotodokumentace a dle standardů Fédération Internationale Féline (2012) však byl jedinec správně označen jako černá (n) mramorovaná (22).

Obrázek 25: Černá mramorovaná kočka



6.1.2 Použitý postup izolace DNA

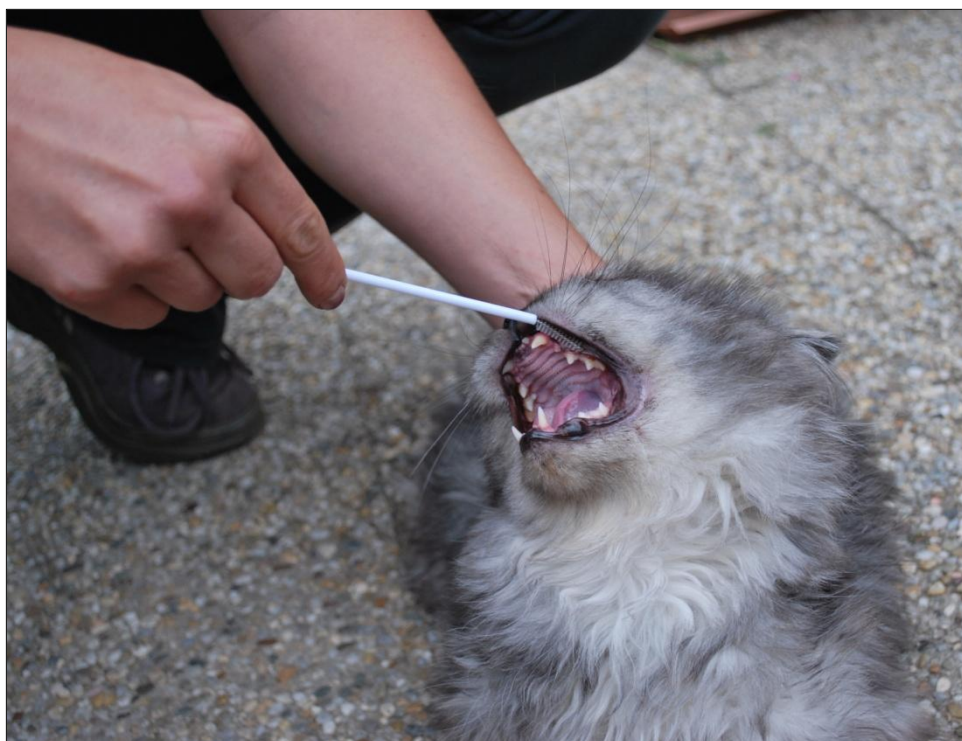
Při řešení bakalářské práce byla použita neinvazivní metoda odběru biologického materiálu – stěry z bukálních sliznic. Ve vědeckých publikacích použitých pro sestavení literární rešerše většinou pracuje s biologickým materiálem, který byl odebrán na různých veterinárních klinikách v souvislosti s klinickým vyšetřením zvířat nebo s jejich operacemi. Například Menotti-Raymond et al. (2009) extrahovali DNA ze vzorků odebrané krve a tkání odebraných při biopsiích. Postup izolace DNA z krevních derivátů a fibroblastů uvádějí například Schmidt-Küntzel et al. (2009) a Eizirik et al., (2010). Při řešení bakalářské práce nebyla jako výchozí materiál použita krev z několika důvodů. Odběr krve je způsobit pouze veterinární lékař a preventivní vyšetření běžně chovaných koček na základě odebraných vzorků krve není v České republice běžné. Dalším z důvodů je, že odběr krve by byl zbytečně stresující pro jinak zdravá zvířata.

Neinvazivní způsob odběru bukálních sliznic lze rovněž považovat za vhodný způsob zajištění výchozího biologického materiálu. Jeho velkou výhodou je zejména to, že odběr

zvládne provést každý chovatel a že vysušené cytologické kartáčky vložené do čistých papírových obálek je možné zasílat do laboratoře běžnou poštou. Tuto strategii odběru vzorků použili například Schmidt-Küntzel et al. (2009), kteří se zabývali molekulárními analýzami koček pocházejících například až z Brazílie.

S odběrem bukálních sliznic má školící pracoviště velice dobré zkušenosti u psů. Kočka domácí je však často výrazně méně socializovaná a komunikace mezi zvířetem a chovatelem nebo osobou provádějící odběr je mnohdy nesnadná. Pro psy účastníci se například výstav je naprosto běžná kontrola chrupu spojená s otevřením tlamy. Setření bukálních buněk nečiní obvykle žádný problém. Pro kočku je vsunutí odběrové části kartáčku o délce 2 cm do tlamičky mnohdy zcela neznámou záležitostí. A reakce zejména odchycených zvířat umístěných v depozitech odpovídala situaci na obrázku 26.

Obrázek 26: Podrážděná reakce kočky při odběru buněk bukálních skliznic



Ze studia vědecké literatury dále vyplývá, že všichni autoři zabývající se molekulárními analýzami genů zodpovědných za zbarvení srsti využívali pro izolaci DNA komerčně vyráběné kity. Například Menotti-Raymond et al. (2009) použili kity QIAamp DNA Blood Midi a Mini Kit (Qiagen). Shodný typ kitu použili rovněž Eizirik et al. (2010).

Schmidt-Küntzel et al. (2009) použili obdobě fungující DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen).

Při řešení své bakalářské práce jsem s úspěchem použila univerzální kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel). Lze předpokládat, že principy většiny dodávaných kitů jsou velice obdobné. Odebrané buňky jsou lyzovány proteiny a membrány jsou enzymaticky degradovány a extrahovaná DNA je po precipitaci zachycena na filtr separační kolonky. Po následném proplachování je eluována genomická DNA, která má podle výrobce kitu odpovídat vysoce čisté DNA. Univerzální použití tohoto kitu bylo potvrzeno rovněž při mých experimentech s buňkami kočky domácí. U všech vzorků bylo získáno zcela dostatečné množství DNA pro provádění velkého množství analýz na principu PCR. Kvalita DNA vyjádřená poměrem A260/A280 se vždy pohybovala v intervalu 1,9 – 2,0. Poměr absorbancí A260/A230 se vždy nacházel v rozpětí 2,0 – 2,2. Tyto výsledky svědčí o tom, že byla získána skutečně vysoce čistá DNA. Rovněž výsledky testovací elektroforózy prokázaly, že během izolace z buňkách kočky domácí nedochází k fragmentaci DNA.

6.2 Polymorfismus markeru *ASIP* genu a jeho vztah k melanistickému zbarvení srsti

6.2.1 Detekce polymorfismů metodou PCR-RFLP

Experimenty zabývající se genem *ASIP*, které jsem prováděla při řešení bakalářské práce, vycházely z publikace autorského kolektivu Eizirik et al. (2003). Tito autoři se věnovali hledání kauzálních mutací genu *ASIP* nejenom u kočky domácí, ale i u řady kočkovitých šelem, které jsou charakteristické melanistickým zbarvením srsti. Mimo jiné se věnovali melanismu u jaguára amerického, levharta skvrnitého a jaguarundi. Dinukleotidová delece v exonu 2 genu *ASIP*, kterou výše uvedení autoři považují za kauzální pro vznik melanismu kočky domácí, jsem použila jako výchozí bod pro navržení diagnostického PCR-RFLP markeru.

Eizirik et al. (2003) provedli detekci této mutace na úrovni sekvenace genu *ASIP*. Domnívám se, že molekulární diagnostická metoda založená na přímé sekvenaci je sice velice přesná, ale současně pracovně i finančně náročná pro rutinní aplikaci. Z těchto důvodů jsem se zaměřila na navržení PCR-RFLP diagnostického markeru. Experimenty, jejichž výsledky jsou prezentovány v bakalářské práci, jsem potvrdila hypotézu Eizirik et al. (2003), že

dinukleotidová delece je zodpovědná za melanismus kočky domácí. Aplikace navrženého PCR-RFLP markeru byla vždy spolehlivá. Marker prokazoval kodominantní charakter a umožňoval odlišit jedince s homozygotními a heterozygotními kombinacemi genu *ASIP*. Specifičnost navrženého PCR-RFLP markeru byla potvrzena rovněž na základě sekvenačních analýz.

6.2.2 Fenotypový projev koček s mutovanou a nemutovanou alelou genu *ASIP*

Eizirik et al. (2003) předpokládá, že homozygotní jedinci, kteří mají obě zmutované alely (aa) se vyznačují melanismem. Tento výsledek jsem potvrdila i při řešení své bakalářské práce. Všechny melanisticky zbarvené kočky měly genotyp aa. Tento výsledek odpovídá i praktickým zkušenostem chovatelů (Vařejčko, 1984), kteří jsou si vědomi recesivní dědičnosti černého zbarvení kočky domácí. To znamená, že dvěma rodičům s černým zbarvením se nikdy nemohou narodit mláďata s aguti zbarvením. V bakalářské práci jsem rovněž zjistila, že recesivně homozygotní genotyp (aa) je charakteristický rovněž pro kočky se zředěným pigmentem. Jedná se o jedince zbarvené modře a čokoládově. Tento výsledek je v plném souladu se závěry molekulárních analýz provedených Ishida et al. (2006).

Dále bylo potvrzeno, že recesivní homozygoti v genu *ASIP* (aa) mohou mít rovněž i červené nebo želvovinové zbarvení. Tento výsledek je rovněž v souladu se závěry Schmidt-Küntzel et al. (2009), kteří popsali epistatický účinek genu *O* pro červené zbarvení srsti. Problematice interakcí mezi genem *ASIP* a *O* se budu dále věnovat v samostatné kapitole.

Výsledky získané při řešení bakalářské práce bych ráda diskutovala se závěry Ragni a Possenti (1996), kteří se zabývají variabilitou tabby kresby u aguti zbarvených divokých a domácích koček. Tito autoři se věnují variabilitě zbarvení divokých koček kontinentálního a ostrovního původu. Ve svých závěrech předpokládají existenci variability různých typů tabby kresby, ale současně předpokládají, že kočka divoká se nikdy nemůže vyznačovat melanismem. Výskyt melanismu v populacích kočky divoké může s velkou pravděpodobností svědčit o tom, že dochází ke křížení populace kočky divoké s ferálními populacemi kočky domácí. Vzhledem k tomu, že melanismus odpovídá recesivní mutaci genu *ASIP*, je tudíž možné, že i u takových to hybridních populací se mohou vyskytovat přenašeči této recesivní alely (Aa). Proto se domnívám, že navržený diagnostický marker by bylo možné použít i pro ekologické studie zaměřené na potenciálně možné křížení kočky divoké s kočkou domácí.

6.2.3 Sekvenační analýzy PCR-RFLP markeru genu *ASIP*

Sekvenační analýzy genu *ASIP* byly při řešení bakalářské práce použity jako nástroj pro posouzení spolehlivosti navrženého PCR-RFLP markeru. Z této analýzy vyplývá, že byl potvrzen předpoklad Eizirik et al. (2003) o významu dinukleotidové delece exonu 2 genu *ASIP* pro vznik melanismu kočky domácí. Sekvenační analýzou bylo potvrzeno, že všechny černě zbarvené kočky skutečně nesou výše zmiňovanou deleci.

Pro sekvenační analýzy byli použiti rovněž jedinci s černou barvou a různým typem a rozsahem bílé skvrnitosti. Rovněž u nich byla potvrzena dinukleotidová delece genu *ASIP* (Eizirik et al, 2003). Lze se tudíž přiklonit k závěrům, že bílá skvrnitost srsti je řízena samostatně fungujícím lokusem S (Vařejčko, 1984, Říhová, 1999).

Pro sekvenování byli použiti jedinci, kteří jsou z hlediska mutace genu *ASIP* heterozygotní. Protože kauzální mutace je způsobena delecí, jsou u heterozygota současně sekvenovány dva fragmenty o velikosti 150 bp a 148 bp. Bylo předpokládáno, že od místa delece dojde v důsledku dinukleotidového posunu k výskytu překrývajících se píků. Tento výsledek byl skutečně potvrzen a je dokumentován obrázkem 24. Na základě porovnání sekvence nemutované a mutované alely s využitím symbolů bází podle International Union of Pure and Applied Chemistry (2012), bylo rozšifrováno, že sekvence heterozygota uvedená v tabulce 23 skutečně odpovídá překrytí 148bp a 150 bp fragmentů.

Z výsledků porovnání získaných sekvencí mutované a nemutované alely *ASIP* genu s mezinárodní nukleotidovou databází na NCBI vyplynulo, že námi navržený marker vykazoval homologii s *ASIP* geny dalších savců. Původní aguti zbarvení různých savců lze považovat za jeden z univerzálních mechanismů vedoucí k takovému zbarvení srsti, které volně žijícím savcům poskytuje účinné mimikry. Skřídání tmavě a světle zbarvených zón chlupů vede ke vzniku barvy, která mnohdy dobře splývá s okolním prostředím. Význam genu *ASIP* a s tím spojený biosyntetický aparát signálních proteinů popsali například Jackson (1994), Robinson (1976). Z obrázků 21 a 22 rovněž vyplývá, že mutace genu *ASIP* jsou široce zkoumány u různých savců ve spojitosti se změnami jejich zbarvení. Přesto, že sekvence genu *ASIP* vykazují určité homologie mezi různými druhy, nejsou tyto geny zcela identické. Tento výsledek deklarují i hodnoty vzájemných sekvenčních identit použitého PCR-RFLP markeru, které jsou uvedeny v obrázcích 21 a 22.

Dinukleotidovou mutaci v exonu 2 genu *ASIP*, kterou jsem studovala v bakalářské práci, není možné považovat za všeobecně příčinnou pro vznik melanismů u všech

kočkovitých šelem. Tento výsledek je důkazem toho, že shodný fenotypový projev – černé zbarvení srsti může být i u taxonomicky příbuzných živočichů (kočkovitých šelem) způsoben mutacemi odlišných genů. Například Eizirik et al. (2003) se pokusili identifikovat mnou studovanou dinukleotidovou delecí u jaguárů amerických. Přesto, že fenotypový projev melanistických jaguárů a melanistické kočky domácí je naprosto identický, nelze navržený metodický postup PCR-RFLP markeru aplikovat u této velké kočkovité šelmy.

6.3 Mikrosatelitní lokusy vázané na gen *O* pro červené zbarvení koček

6.3.1 Metody detekce polymorfismů mikrosatelitních lokusů

Při řešení bakalářské práce jsem vycházela z informací, které publikovali Schmidt-Küntzel (2009). Jejich závěry považuji za velmi cenné, protože jako jediní autoři navrhli mikrosatelitní lokusy o kterých předpokládají nulové rekombinace s genem *O* zodpovědné za červené zbarvení srsti kočky domácí. Tyto experimenty jsou zejména zaměřeny na sestavení zahuštěné mapy gonozómu X, ve které je lokalizována pozice genu *O*. Po prostudování této výchozí publikace jsem zjistila, že výše citovaní autoři neuvádějí bližší informace k metodě detekce polymorfismů mikrosatelitních lokusů.

Předpokládám, že Schmidt-Küntzel (2009) rovněž použili fluorescenčně značené primery a PCR amplikony následně separovali pomocí kapilární elektroforézy. V roce 2009 byla kapilární elektroforéza zcela jistě považována za nezbytné vybavení pro fragmentační analýzu spojenou se studiem mikrosatelitních markerů. Ve své bakalářské práci jsem navrhla systém multiplex SSR, který umožňoval v jedné amplifikační reakci současně hodnotit polymorfismy tří lokusů FCA1494, FCA1496, FCA1498. Tento postup poskytoval jednoznačně detekovatelné polymorfismy, které byly vzájemně odlišeny při použití tří různě fluorescenčně značených F primerů. Systémy multiplex SSR markerů jsou běžně používány při různých typech forenzních analýz, jako je například určení paternity. Tato problematika zřejmě nebude u koček tak často využívána jako je tomu například u psů, kde Asch et al. (2007) publikovali metodický postup aplikace multiplex SSR markerů pro určení paternity.

6.3.2 Rekombinace mezi markerujícími alelami a fenotypovým projevem – zbarvením srsti

Již v předchozí kapitole jsem se zmínila, že experimentální část bakalářské práce vychází z vazbové mapy gonozómu X, kterou sestavili Schmidt-Küntzel et al. (2009). V této mapě je poloha genu O lokalizována v oblasti 6 mikrosatelitních lokusů, které podle výše zmíněných autorů nevykazovaly rekombinace s fenotypovým projevem červené barvy. Na základě hodnoty LOD skóre jsem si vybrala pro řešení bakalářské práce lokusy FCA1494, FCA1496, FCA1498.

V rámci diskuze považuji za vhodné se zmínit, že sestavená vazbová mapa (Schmidt-Küntzel et al., 2009) vznikla na základě dvou rodin vzniklých záměrným křížením. Lze proto předpokládat, že nulový výskyt rekombinací zaznamenaný výše citovanými autory nemusí všeobecně platit pro širší populace kočky domácí. Přesně takovou širokou populaci kočky domácí velice různorodého původu jsem použila při řešení bakalářské práce. Z výsledků prezentovaných v grafech 1, 2 a 3 jasně vyplývá, že nejtěsněji je s předpokládaným genem O vázaná alela o velikosti 244 bp v lokusu FCA1494. U tohoto lokusu a této alely nebyla zjištěna žádná rekombinace s předpokládaným zbarvením srsti. Naopak u alely lokusu FCA1496 o velikosti 237 bp a u alely o velikosti 233 bp lokusu FCA1498 byly zjištěny rekombinace, a to vždy s menší frekvencí u jedinců samčího pohlaví. Přítomnost rekombinací u těchto dvou mikrosatelitních lokusů neodpovídá zcela závěrům Schmidt-Küntzel et al., (2009), kteří publikovali rovněž u lokusů FCA1496 a FCA1498 nulový výskyt rekombinací.

Na základě studia populace koček v bakalářské práci lze tudíž vyslovit hypotézu, že alela o velikosti 244 bp lokusu FCA1494 může být těsněji vázána na lokus genu O oproti alelám zbývajících lokusů. Získané výsledky nelze však použít pro sestavení vazbové mapy (Schmidt-Küntzel et al., 2009), protože tento soubor hodnocených jedinců nepředstavuje sourozence odpovídající konkrétním rodinám.

6.4 Interakce mezi genem *ASIP* a genem *O*

Pro řešení bakalářské práce jsem si vybrala dva major geny (*ASIP* a *O*), které spolurozhodují o vzniku některých typů zbarvení kočky domácí. Již na základě chovatelské a šlechtitelské praxe bylo zjištěno, že gen pro červené zbarvení srsti je lokalizován na gonozómu X a je pro něj charakteristická dědičnost křížem (Vařejčko, 1984; Říhová, 1999).

Chovatelskou praxí bylo rovněž potvrzeno, že želvovinově nebo tříbarevně mohou být zbarveni pouze jedinci samičího pohlaví s výjimkou kocourů s trisomií XXY (Schmidt-Küntzel et al., 2009).

Již v kapitole 6.2.2 jsem se zmínila o tom, že gen *O* bude vykazovat epistázi nad projevem genu *ASIP*. Tuto teorii vyslovili mimo jiné Schmidt-Küntzel et al., (2009). Platnost této teorie jsem se pokusila dokázat i při řešení bakalářské práce. Je potřeba si však uvědomit, že geny *ASIP* a *O* jsou markerovány dvěma typy rozdílných markerů. Mutace genu *ASIP* je markerována genovým markerem, který jednoznačně detekuje konkrétní mutaci exonové části genu vedoucí ke vzniku odlišného polypeptidového řetězce signálního proteinu (Eizirik et al., 2003). Pro markerování genu *O* byly použity tři vazbové mikrosatelitní markery. Princip těchto vazbových markerů je založený na detekci specifických polymorfismů v nekódujících sekvencích gonozómu X, u kterých se předpokládá těsná vazba k doposud neobjevenému genu *O*. Existence rekombinací, která byla diskutována v kapitole 6.3.2 je tudíž důkazem proběhlých crossing overů mezi mikrosatelitním lokusem a lokusem genu *O*. Proto jsem si pro důkaz epistatického působení genu *O* vybrala markerující lokus FCA1494, který vykazovat nulovou rekombinaci.

Získané výsledky jsou v plném souladu se závěry Schmidt-Küntzel et al., (2009) a Eizirik et al., (2003). Z výsledkové tabulky 21 jasně vyplývá, že jedinci nesoucí markerující alelu o velikosti 244 bp lokusu FCA1494 nikdy neměli aguti zbarvení, i když z hlediska mutace genu *ASIP* byli homozygoti AA nebo heterozygoti Aa. Tento výsledek potvrzuje hypotézu, že i pro populaci kočky domácí, kterou jsem použila při řešení bakalářské práce, platí dominantní epistáze genu *O* nad dominantní alelou (A) genu *ASIP*.

V bakalářské práci jsem se rovněž zaměřila na molekulární analýzu koček s želvovinovým a tříbarevným zbarvením. Z hlediska klasické genetiky Vařejčko (1984) a Říhová (1999) uvádějí, že želvovinově zbarvené kočky vznikají v důsledku neúplné dominance mezi dominantní a recesivní alelou genu *O*. Na molekulární úrovni tuto teorii potvrdili Schmidt-Küntzel et al., (2009). Ke shodnému závěru jsem se dopracovala i při řešení bakalářské práce. U lokusu FCA1494, který měl nulové rekombinace, bylo zjištěno, že všechny želvovinové a tříbarevné kočky nesly právě jednu alelu 244 bp. Na základě provedených molekulárních analýz nebylo možné pomocí polymorfismů genu *ASIP* a *O* vzájemně odlišit želvovinové a tříbarevné kočky. Tento výsledek je rovněž v plném souladu se závěry Schmidt-Küntzel et al. (2009), kteří uvádějí, že tříbarevná kočka je kočka želvovinově zbarvená s bílými skvrnami, které jsou řízeny nezávislým lokusem S.

7. Závěr

V bakalářské práci jsou shrnuty výsledky pilotních experimentů, které byly na Katedře genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze provedeny u modelového organismu – kočky domácí. Bakalářské práce je zaměřená na studium zbarvení srsti. Jedná se o znak, který je velice dobře charakterizovatelný na úrovni fenotypu. Současně se předpokládá, že varianty zbarvení srsti kočky domácí jsou mnohdy důsledkem jednoduchých bodových mutací major genu. Z tohoto důvodu považují řešenou problematiku za vhodný model pro aplikaci molekulární genetiky ve šlechtění zvířat.

Výsledky získané při řešení bakalářské práce je možné shrnout do následujících bodů:

- Byla vybrána modelová populace koček o celkovém rozsahu 75 jedinců s variabilním zbarvením srsti. Varianty zbarvení srsti byly u všech jedinců jednoznačně identifikovány s využitím mezinárodní nomenklatury FIFe.
- Stěry buněk bukalálních sliznic provedené pomocí cytologického kartáčku se ukázaly jako vhodná neinvazivní metoda pro odběr biologického materiálu určeného k izolaci genomické DNA.
- Použitý izolační kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel) se ukázal jako vhodný pro extrakci genomické DNA. Výtěžnost DNA i parametry její kvality (elektroforetický test, poměry A260/A280 a A260/A230) prokázaly, že u všech vzorků byla získána vysoce čistá vysokomolekulární DNA.
- Podařilo se navrhnout PCR-RFLP marker, kdy pomocí dvojice primerů byla amplifikována sekvence exonu 2 v oblasti předpokládané kauzální dinukleotidové delecce. Předpokládaná velikost amplikonu byla u nemutovaných homozygotů 150 bp, u mutovaných homozygotů 148 bp. Rozdíl dvou nukleotidů nebylo možné ověřit na základě gelové agarózové elektroforézy.
- Přímou sekvenací bylo potvrzeno, že skutečně černě zbarvené melanistické kočky jsou charakteristické již výše zmíněnou dinukleotidovou delecí. Sekvenační analýzou bylo potvrzeno, že kočky domácí s aguti zbarvením jsou charakteristické původní nemutovanou alelou, která je typická rovněž pro kočku divokou.
- Bioinformatickou analýzou sekvence PCR-RFLP markeru genu *ASIP* bylo potvrzeno, že tato sekvence je zcela identická se sekvencí nemutované alely genu *ASIP*, která je umístěná v mezinárodní nukleotidové databázi na NCBI. Sekvence mutované alely byla rovněž porovnána s databází na NCBI a bylo zjištěno, že taková to mutovaná

alela *ASIP* genu nebyla doposud u kočky domácí do databáze na NCBI vložena. Dinukleotidová delece popsaná v bakalářské práci se plně shoduje s delecí popsanou v literárních zdrojích.

- Z porovnání výsledků hodnocení modelové populace kočky domácí pomocí navrženého PCR-RFLP markeru jednoznačně vyplynulo, že všechny kočky s černým melanistickým zbarvením nesly vždy obě mutované alely. Všechny kočky s aguti zbarvením byly charakteristické přítomností alespoň jedné nemutované alely, přičemž jedinců s heterozygotní kombinací alel genu *ASIP* bylo výrazně více.
- Z populační studie alelických frekvencí markeru genu *ASIP* bylo na základě porovnání pozorované a očekávané heterozygotnosti potvrzeno, že tato náhodně vybraná a značně variabilní populace odpovídá podle distribuce alel genu *ASIP* rovnovážné populaci podle Hardy-Weinbergova zákona.
- Podle literárních zdrojů byly vybrány tři mikrosatelitní lokusy lokalizované na gonozómu X (FCA1494, FCA1496, FCA1498), u kterých by nemělo docházet k rekombinacím s fenotypovým projevem červeného zbarvení srsti. Tato hypotéza byla potvrzena pouze u jednoho mikrosatelitního lokusu FCA1494, u kterého alela o velikosti 244 bp skutečně nerekombinovala a byla charakteristická pouze pro jedince s červeným respektive želvovinovým zbarvením srsti. U mikrosatelitního lokusu FCA1496 byla identifikována markerující alela o velikosti 237 bp. U lokusu FCA1498 červené zbarvení srsti markerovala alela o velikosti 233 bp. U obou výše uvedených lokusů však docházelo k rekombinacím, jejíž frekvence se pohybovala od 12,9 % do 50 %.
- Na základě alelických kombinací mikrosatelitního lokusu FCA1494 byla potvrzena hypotéza, že zbarvení želvovinových nebo tříbarevných koček odpovídá heterozygotní kombinaci Oo. Markerující alela tohoto lokusu o velikosti 244 bp se u želvovinových a tříbarevných koček vyskytla vždy právě jedenkrát a vždy byla kombinována s mikrosatelitní alelou o jiné velikosti.
- Všechny tři navržené mikrosatelitní markery plně korespondovaly s jejich předpokládanou lokalizací na nehomologní části gonozómu X. To znamená, že u všech kocourů byla zjištěna vždy pouze jediná alela těchto markerů. Naopak u koček se vyskytovaly alely dvě v případě, že se jednalo o jedince heterozygotního genotypu, nebo jedna alela, které však odpovídala jedinci homozytnímu s dvěmi identickými alelami.

- Z porovnání zbarvení srsti a výsledků genotypizace PCR-RFLP markerem genu *ASIP* a markerem genu *O* pro červené zbarvení srsti (mikrosatelitní lokus FCA1494) vyplývá, že byla potvrzena hypotéza o epistatickém účinku dominantní alely genu *O* nad účinkem nemutované alely genu *ASIP*. Konkrétně to znamená, že všichni jedinci s aguti zbarvením srsti nesli vždy alespoň jednu nemutovanou alelu genu *ASIP* a současně u nich nebyla detekována ani jedna markerující alela 244 bp lokusu FCA1494 pro dominantní alelu *O*.

Z praktického hlediska bych ráda v závěru shrnula, že v průběhu řešení bakalářské práce byly získány metodické postupy, které umožnily jednoznačně identifikovat polymorfismus genu *ASIP*. Domnívám se, že získané výsledky je možné využít například z praktického hlediska jako sevisní metodu pro chovatele, která jim umožní jednoznačně identifikovat genotyp zvířete a současně napomůže k predikci zbarvení srsti očekávaných potomků záměrných křížení. Dále se domnívám, že navržený postup identifikace recesivní alely genu *ASIP* by mohl nalézt své praktické uplatnění v různých studiích volně žijících populacích kočky divoké. Navržená analýza umožňuje spolehlivě identifikovat, zda-li hodnocený jedinec, který vykazuje aguti zbarvení divoké kočky, je nebo není nositelem recesivní alely genu *ASIP*.

8. Seznam literatury

- Asch, B., Alves, C., Pereira, F., Gusmão, L., Amorim, A. 2007. A new autosomal STR multiplex for canine genotyping. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 1 (1). 628–629.
- BioLib - Mezinárodní encyklopedie rostlin, hub a živočichů. 1999 - 2011. [on-line]. [cit. 2012-02-22]. Dostupné z <<http://www.biolib.cz/>>.
- Bultman, S. J., Michaud, E. J., Woychik, R. P. 1992. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*. 71 (7). 1195-1204.
- Candille, S. I., Kaelin, C. B., Cattanach, B. M., Yu, B., Thomson, D. A., Nix, M. A., Kerns, J. A., Schmutz, S. M., Millhauser, G. L.; Barsh, G. S. 2007. A β -Defensin Mutation Causes Black Coat Color in Domestic Dogs. *Science*. 318 (5855). 1418-1423.
- Cutts, P. 2002. Plemena koček celého světa. Svojtka & Co. Praha. 128 s. ISBN: 8072374486.
- Dittrich, L. 1979. Die vererbung des melanismus beim jaguar (*Panthera onca*). *Zool. Garten*. 49, 417-428.
- Doncaster, L. 1904. On the inheritance of tortoiseshell and related colors in cats. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*. 13, 35-38.
- Dostál, J. 2007. Genetika a šlechtění psů. Dona. České Budějovice. 260 s. ISBN: 9788073221041.
- Eizirik, E., Yuhki N., Johnson W. E., Menotti-Raymond M., Hannah S. S., O'Brien S. J. 2003. Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Current Biology*. 13 (5). 448-453.
- Fédération Internationale Féline [on-line]. 2012. [cit. 2012-02-22]. Dostupné z <<http://fifeweb.org>>.
- Field, D., Wills, C. 1998. Long polymorphic microsatellites in simple organism. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological sciences*. 263 (1367). 209-215.

- Fontanesi, L., Tazzoli M., Beretti F., Russo, V. 2006. Mutations in the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Animal Genetics*. 37 (5). 489-493.
- Freinkel, R. K., Woodley, D. T. 2001. *The Biology of the Skin*. The Parthenon Publishing Group Inc. New York. p. 432.
- Genomia - mezinárodně akreditovaná veterinární genetická laboratoř, 2012 [on-line]. [cit. 2012-03-04]. Dostupné z <<http://www.genomia.cz/>>.
- Goldstein, D. B., Schlötterer, Ch. 1999. *Microsatellites, Evolution and Application*. Oxford University Press. p. 336.
- Griffin, H. G., Griffin, A. M. 1994. *PCR Technology - Current Innovations*. PCR Press. London. p. 370.
- Hearing, V. J. 2005. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *Journal of Dermatological Science*. 37 (1). 3-14.
- Hearing, V. J., Tsukamoto, K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB Journal*, 5 (14). 2902-2909.
- Hustad, C. M., Perry, W. L., Siracusa, L. D., Rasberry, C., Cobb, L., Cattanach, B. M., Kovatch, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. 1995. Molecular genetic characterization of six recessive viable alleles of the mouse agouti locus. *Genetics*. 140 (1). 255-265.
- Imes, D., L., Geary L., A., Grahn R., A., Lyons, L., A. 2006. Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a tyrosinase (*TYR*) mutation. *Animal Genetics*. 37 (2). 175-178.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H. 1990. Optimization of PCRs. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. New York. Academic Press Inc. p. 3-12. ISBN: 0123721806.
- International Union of Pure and Applied Chemistry [on-line]. 2012 [cit. 2012-03-30]. Dostupné z <<http://www.iupac.org/>>.
- Ishida, Y., David V. A., Eizirik E., Schäffer A. A., Neelam B. A., Roelke M.E., Hannah S.S., O'Brien S.J., Menotti-Raymond M. 2006. A homozygous single-base deletion in

- MLPH causes the dilute coat color phenotype in the domestic cat. *Genomics*. 88 (6). 698-705.
- Ishida, Y., David, V. A., Eizirik, E., Schäffer, A. A., Neelam et al, 2006. A homozygous single-base deletion in MLPH causes the dilute coat colour phenotype in the domestic cat. *Genomics*. 88 (6). 698-705.
- Jackson, I. J. 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annual Review of Genetics*. 28 (1). 299-305.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 16 (5). 1099-1106.
- Kašička, V. 1997. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické Listy*. 91 (5). 320-329.
- Kijas, J. M. H., Wales, R., Törnsten, A., Chardon, P., Moller, M., Andersson, L. 1998. Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. *Genetics*. 150 (3) 1177-1185.
- Klungland, H., Våge, D. I., Gomez-Raya, L. Adalsteinsson, S., Lien, S. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mammalian Genome*. 6 (9). 636-639.
- Lemos, N.P., Bartolotti, F., Manetto, G., Anderson, R.A., Cittadini, F., Tagliaro, F. 2001. Capillary electrophoresis: a new tool in forensic medicine and science. *Science & justice*. 41 (3). 203-210.
- Lightner, J. K. 2009. Genetics of coat color II: The Agouti Signaling Protein (ASIP) Gene. *Answers Research Journal*. 2. 79-84.
- Lyons, L. A., Foe I. T., Rah H. C., Grahn R. A. 2005. Chocolate coated cats: *TYRPI* mutations for brown color in domestic cats. *Mammalian Genome*. 16 (5). 356-366.
- Lyons, L. A., Imes, D. L., Rah, H. C., Grahn, R. A. 2005. Tyrosinase mutations associated with Siamese and Burmese patterns in the domestic cat (*Felis catus*). *Animal Genetics*. 36 (2) 119-126.

- Metzgar, D., Bytof, J., Wills, C. 2000. Selection against frameshift mutation limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome research*. 10 (1). 72-80.
- Mountjoy, K. G., Robbins, L. S., Mortrud, M. T., Cone, R. D., 1992. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*. 257 (5074). 1248-1251.
- Rixon, A. 2007. *Ilustrovaná encyklopedie koček*. Svojtka & Co. Praha. 256 s. ISBN: 9788073529550.
- Robbins, L. S., Nadeau, J. H., Johnson, K. R., Kelly, M. A., Roselli-Reh fuss, L., Baak, E., Mountjoy, K. G., Cone, R. D. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*. 7 (6). 827-834.
- Robinson, R. 1976. Homologous genetic variation in the Felidae. *Genetica*. 46 (1). 1-31.
- Robinson, R., 1966. Sex-linked yellow in the Syrian hamster. *Nature*. 212. 824-825.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 365-386. Dostupné na <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>.
- Ruvinsky, A., Sampson, J. 2001. *The Genetics of the Dog*. CABI. Wallingford. p. 576. ISBN: 0851995209.
- Říhová, M. 1999. *Chováme kočky*. DONA. České Budějovice. 172 s. ISBN: 8086136302.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. F. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York. p. 545. ISBN: 0879693096
- Schmidt-Küntzel, A., Eizirik E., O'Brien S. J., Menotti-Raymond M. 2005. Tyrosinase and tyrosinase related protein 1 alleles specify domestic cat coat color phenotypes of the albino and brown loci. *Journal of Heredity*. 96 (4). 289-301.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. 2009. *Genetika*. Masarykova univerzita. Brno. 894s. ISBN: 9788021048522.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development*. 4. 1193-1199.
- Tóth, G., Gáspari, Z., Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome research*. 10 (7). 967-981.

- Ugaz, V. M., Christensen, J. L. 2007. Electrophoresis in Microfluidic Systems. In: Hardt, S., Schönfeld, F., (eds.). Microfluidic Technologies for Miniaturized Analysis Systems. Springer Science+Business Media. LLC. New York. p. 393-438. ISBN: 9780387285979.
- Vařejčko, J. 1984. Atlas plemen koček. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 176 s. ISBN: 07085840448.
- Vierstraete, A. 2001. PCR to amplify the requested gene [www publikace]. University of Ghent. Dostupné z <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
- Watson, J. D., Tooze, J., Kurtz, D. T. 1988. Rekombinantní DNA. Academia. Praha. 293 s.
- Willis, M. B. 1989. Genetics of the Dog. H. F. & G. Witherby Ltd. London. p. 417. ISBN: : 0854931767.
- Wright, S., 1918. Color inheritance in mammals: X. The cat-curious association of deafness with blue-eyed white color and or femaleness with tortoise-shelled color, long know-variations of tiger pattern present interesting features. Journal of Heredity. 9 (3). 139-144.

9. Seznam použitých zkratek

A	adenin
ASIP	<i>agouti signal peptid</i>
bp	počet párů bází v molekule nukleové kyseliny
C	cytosin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CFA	Asociace chovatelů koček (Cat Fanciers Association)
ddATP	dideoxyadenosin-5'-trifosfát
ddCTP	dideoxycytidin-5'-trifosfát
ddGTP	dideoxyguanin-5'-trifosfát
ddTTP	dideoxytymidin-5'-trifosfát
DHI	5,6-dihydroxyindol
DKK1	<i>dickkopf 1</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid-5'-trifosfát (obecně)
DOPA	3,4-dihydroxyfenilalanin
DQ	dopachinon
EDTA	disodná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové
EDTA	disodná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové
EMS	Easy Minde System
ERI	<i>endothelin 1</i>
F₁	první filiální generace
FIFe	Mezinárodní organizace chovatelů koček (Fédération Internationale Féline)
F-primer	přímý primer
G	guanin

GCCF	Řídící výbor chovatelů koček (Governing Council of the Cat Fancy)
H_E	očekávaná heterozygotnost
H_O	pozorovaná heterozygotnost
LOD skóre	statistická metoda vyjádření síly vazby založená na výpočtu dekadického logaritmu relativně vyjádřené pravděpodobnosti vzniku rekombinací
<i>MC1R</i>	<i>melanocortin 1 receptor</i>
<i>MLPH</i>	<i>melanophilin</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PKA	proteinkináza A
RFLP	metoda využívající délkového polymorfismu restričních fragmentů analyzované DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism)
R-primer	zpětný primer
SSR	repetice jednotlivých sekvencí (Simple Sequence Repeat)
T	thymín
TBE	tris-borátový pufr (SAMBROOK et al., 1989)
TE	tris-EDTA pufr (SAMBROOK et al., 1989)
TRIS	tris[hydroxymetyl]aminometan
<i>TYRP1</i>	<i>tyrosinase-related protein 1</i>
<i>TYRP2</i>	<i>tyrosinase-related protein 2</i>
αMSH	melanocyty stimulující hormon

Přílohy

Příloha 1: Fotodokumentace zbarvení srsti koček

Perská červená, krémová harlekýn, černě želvovinová harlekýn a modře želvovinová bikor



Zdroj: <http://www.monarcha.cz/>

Britská čokoládová, čokoládově želvovinová, černá stříbřitě mramorovaná a lilová



Zdroj: <http://www.silkyangels.cz/>, <http://www.airforcecat.cz/>

Britská skořicová a plavá



Zdroj: <http://www.royalsapphire.cz/>

Mainská mývalí černá mramorovaná a modřeželvovinová mramorovaná



Zdroj: <http://www.amazing-tigers.cz/>

Siamská s modrými a černohnědými odznaky



Zdroj: <http://bedrunka-siamky.aspone.cz/>

Evropská krátkosrstá



Příloha 2: Složení pufrů použitelných pro gelovou elektroforézu

Vzorkový pufr (Sambrook et al., 1989)

- 0,25 % bromfenolové modři - sodná sůl (Serva, SRN)
- 0,25 % xylencyanolové modři FF (Sigma, USA)
- 15,0 % ficolu (Sigma, USA)
- vše rozpustit ve sterilní 2x deionizované H₂O
- uchovávat při 4°C

10xTBE pufr (Sambrook et al., 1989)

- 450 mM Tris-kyselina boritá (Sigma, USA), pH 8,0
- 10 mM EDTA (Sigma, USA)
- uchovávat při 4°C

1xTBE pufr (Sambrook et al., 1989)

- naředit 10xTBE pufr 1x deionizovanou H₂O
- uchovávat při 4°C

Zásobní roztok ethidium bromidu (Sambrook et al., 1989)

- 10 mg ethidium bromidu (Sigma, USA)
- 1 ml sterilní 2x deionizované H₂O
- při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných rukavicích
- uchovávat ve tmě při teplotě 4°C

Elektrodový pufr

- 1500 ml 1xTBE

- 75 μ l zásobního roztoku ethidium bromidu
- při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných rukavicích
- pufr je určen pro okamžité použití.

1x TE (Sambrook et al., 1989)

10 mM Tris (pH 8) (Sigma, USA)

1 mM EDTA (Sigma, USA)

pufr byl připravován jako 10x koncentrovaný zásobní roztok