

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra etologie a zájmových chovů (FAPPZ)**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Využití celogenomových asociačních studií (GWAS) v  
predikci chorob u koní**

**Bakalářská práce**

**Zuzana Reslová  
PETIBH Chov koní**

**Ing. Barbora Hofmanová, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití celogenomových asociačních studií (GWAS) v predikci chorob u koní" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Barboře Hofmanové Ph.D. za ochotu a odborné vedení při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkému okolí za podporu a motivaci.

# Využití celogenomových asociačních studií (GWAS) v predikci chorob u koní

## Souhrn

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout principy a možnosti využití celogenomových asociačních studií, a to zejména v predikci vybraných nemocí v chovech koní.

Mezi vybrané choroby byly zahrnuty melanomy u běloušů, sarkoidy, equinní astma, osteochondróza, dwarfismus a lymfedémy u fríských koní, rekurentní laryngeální neuropatie, myeloencefalopatie způsobená EHV-1 a equinní metabolický syndrom. Tyto choroby byly předmětem GWAS v období let 2010-2022. Melanomy neboli nádory melanocytů jsou častým onemocněním u běloušů starších pěti let. U tohoto onemocnění bylo zjištěno pravděpodobné zapojení genů RCBTB1, LITAFD, NUBPL a PTP4A1. Dále byla prokázána spojitost s výskytem melanomu u SNP AX-105009843, lokalizovaném v intronu genu DPF3. Sarkoidy jsou běžné nádorové onemocnění koní, zapříčiňující přes polovinu případů kožních nádorů u koní a byl u nich identifikován významný SNP BIEC2-530826, který se nachází v intronu genu DQA1 MHC třídy II. Osteochondróza (OC) je jedním z nejčastějších a nejnebezpečnějších vývojových ortopedických onemocnění u koní. V oblasti tibio tarzálního kloubu neboli hlezna a spěnky byl výskyt OC nejčastější a odhaleno bylo několik SNP asociovaných s onemocněním u různých plemen. Dwarfismus je dědičné onemocnění koní, projevující se trpasličím vzrůstem. S jeho projevem byla zjištěna asociace SNP nejvyšší významnosti BIEC2-239376 a BIEC2-239391 na ECA14. Rekurentní laryngeální neuropatie způsobuje omezení pohyblivosti svalů hrtanu a bylo u ní zjištěno několik SNP lokalizovaných na různých chromozomech, které měly zároveň spojitost s výškou zvířat. Equinní metabolický syndrom je spojen s obezitou, hyperinzulinémií a laminitidou. Jeho projev je spojen s genem FAM174A, lokalizovaným na ECA14.

V některých studiích byl odhalen kandidátní SNP významně asociovaný s projevem onemocnění, avšak v případech lymfedémů u fríských koní, závažného equinního astma a equinní herpesvirové myeloencefalopatie (EHM) nedošlo k identifikování kandidátního genu či SNP. Po 12 letech výzkumu nelze očekávat odhalení veškerých genů a SNP asociovaných s danými nemocemi.

Asociační studie by v budoucnu mohly napomoci v chovatelské praxi k identifikaci náchylnosti koní k chorobám, ještě před jejich projevem.

**Klíčová slova:** celogenomová asociační studie, heritabilita, genotyp, fenotyp, kůň, onemocnění

# Genome-wide association studies in prediction of equine diseases

## Summary

The goal of this bachelor's thesis was to summarize the principles and possibilities of using whole-genome association studies, especially in the prediction of selected diseases in horse breeding.

Selected diseases included melanomas in grey horses, sarcoids, equine asthma, osteochondrosis, dwarfism and lymphedema in Friesian horses, recurrent laryngeal neuropathy, EHV-1 myeloencephalopathy and equine metabolic syndrome. These diseases were the subject of GWAS in the period 2010-2022. Melanomas or tumours of melanocytes, are a common disease in grey horses over the age of five. RCBTB1, LITAFD, NUBPL and PTP4A1 genes have been found to be likely involved in this disease. Furthermore, an association with the incidence of melanoma was demonstrated for SNP AX-105009843, located in the intron of the DPF3 gene. Sarcoids are a common equine malignancy, accounting for over half of equine skin tumors, and a significant SNP BIEC2-530826, located in the intron of the DQA1 MHC class II gene, has been identified. Osteochondrosis (OC) is one of the most common and most dangerous developmental orthopedic diseases in horses. In the region of the tibio-tarsal joint, i.e. hock and fetlock, the occurrence of OC was the most frequent, and several SNPs associated with the disease were detected in distinct breeds. Dwarfism is a hereditary disease of horses, manifested by dwarfism. An association with SNP BIEC2-239376 of highest significance and BIEC2-239391 on ECA14 was found with its manifestation. Recurrent laryngeal neuropathy causes limitation of the mobility of the muscles of the larynx, and several SNPs located on different chromosomes were found to be associated with the height of the animals. Equine metabolic syndrome is associated with obesity, hyperinsulinemia and laminitis in horses and its expression is associated with the FAM174A gene, located on ECA14.

In some of the studies, a candidate SNP significantly associated with the manifestation of the disease was revealed, but in cases of lymphedema in Friesian horses, severe equine asthma and equine herpesvirus myeloencephalopathy (EHM), no candidate gene or SNP was identified. However, it cannot be expected to reveal all the genes and SNPs associated with the given diseases after only 12 years of research.

In the future, association studies could help in breeding practice to identify the susceptibility of horses to diseases, even before they manifest.

**Keywords:** genome-wide association study, heritability, genotype, phenotype, horse, disease

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce.....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Úvod do GWAS .....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Genom.....	11
3.1.1.1 Genotyp a fenotyp .....	12
3.1.1.2 SNP .....	12
3.1.2 Význam .....	13
<b>3.2 Využití GWAS v predikci chorob u koní .....</b>	<b>13</b>
3.2.1 Melanomy u běloušů.....	13
3.2.2 Sarkoidy .....	15
3.2.3 Equinní Astma .....	16
3.2.4 Osteochondróza .....	17
3.2.5 Dwarfismus a lymfedémy u fríských koní.....	20
3.2.5.1 Dwarfismus .....	20
3.2.5.2 Lymfedémy .....	20
3.2.6 Rekurentní Laryngeální neuropatie .....	21
3.2.7 Myeloencefalopatie způsobená EHV-1 .....	22
3.2.8 Equinní metabolický syndrom .....	23
<b>4 Závěr .....</b>	<b>27</b>
<b>5 Literatura.....</b>	<b>28</b>
<b>6 Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>33</b>

# 1 Úvod

Domestikace koní proběhla v období přibližně před 5500 lety. V průběhu let se stal kůň důležitým pomocníkem lidstva, ať už při přepravě, práci na poli nebo při bitvách. Dnes je kůň chován pro zájmové účely, jako je například rekreace či jezdecký sport (Outram et al. 2009).

Většina majitelů koní, stejně tak jako majitelé hospodářských zvířat, chtějí docílit nejvyšší a nejdéle trvající užitkovosti zvířete. Tu však mohou silně narušit polygenní onemocnění, která nejsou dosud kompletně geneticky zmapována. GWAS, která využívá jednonukleotidový polymorfismus s vysokou hustotou (SNP), nabízí způsob, jak tyto problémy identifikovat. U hospodářských zvířat již bylo odhaleno několik kandidátních genů a SNP, které ovlivňují jejich užitkovost. U koní je užitkovost varabilní dle jejich využití, avšak obecně ji snižují či omezují onemocnění. Mezi nejzávažnější polygenní onemocnění můžeme zařadit osteochondrózu, equinní metabolický syndrom či lymfedémy (Haberland et al. 2012; Zhang et al. 2012).

Polygenní onemocnění mají složitou, dosud kompletně nezmapovanou genetickou základnu a často jsou chronická, mohou působit bolest a mít fatální následky pro organismus. Asociační studie mají za cíl identifikovat kandidátní geny či jejich SNP asociované s projevem onemocnění (Zhang et al. 2012).



## **2 Cíl práce**

Cílem práce je vytvořit přehlednou literární rešerši ke zvolenému tématu. V rešerši budou vysvětleny principy a možnosti využití celogenomových asociačních studií a popsány vybrané choroby.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Úvod do GWAS

Celogenomová asociační studie (GWAS) je velmi mladá metoda, jejíž první provedení bylo zveřejněno v publikaci Ozaki et al. (2002). Autoři se zaměřili na nemoc populačně rozšířenou, a to infarkt myokardu u něhož se jim podařilo zjistit, že změny na genu LTA jsou rizikovým faktorem pro tuto nemoc a podporují její průběh.

Jak již název metody napovídá, zabývá se celým genomem subjektů daného průzkumu. Většina jiných genetických vyšetření se zabývá pouze jedincem nebo jejich malou skupinou a sleduje omezené množství genů. V humánní medicíně je nejčastější test paternity, určení predispozice k chorobě nebo určení, zda je testovaný subjekt jejím přenašečem. U zvířat můžeme zjistit genotyp pro zbarvení, a tím při plemenitbě dopředu určit s jakou pravděpodobností bude mít potomek barvu, kterou chovatel požaduje. Testování jednotlivých genů je postačující tedy jen v případě, kdy nepotřebujeme pochopit celý obraz dané patologie, nemoci či znaku. GWAS nám tento obraz odhalí zaměřením se na kumulativní účinky kauzálních genů (Ishigaki 2022).

Základem pro GWAS je vytyčit znak, u kterého chceme zjistit, co podmiňuje jeho expresi. Pokud je znakem nemoc, je třeba do studie zahrnout dostatek jedinců s prokazatelným projevem nemoci a kontrolní skupinu v podobném množství. Při výběru jedinců je důležité zohlednit věk, pohlaví, původ a u zvířat i plemeno, to ale záleží na typu a výskytu nemoci. Tyto dvě skupiny je dále třeba genotypizovat a fenotypizovat, aby bylo možné doložit rozdíly mezi genotypem nemocných a zdravých jedinců. V dnešní době to již nebude velkou překážkou, ale GWAS lze provádět pouze u organismů, které mají zmapovaný genom, u koní se tomu stalo roku 2007 prostřednictvím Horse Genome Project (Broad Institute 2007). GWAS má za cíl identifikovat jednonukleotidové polymorfismy (SNP, z angličtiny single-nucleotide polymorphism) genu v genomu, které jsou statisticky spojeny s rizikem onemocnění či výskytem sledovaného znaku. Metoda zahrnuje průzkum genomů mnoha subjektů, jejich statistické vyhodnocení a porovnání s fenotypovými hodnotami jedinců. Výsledkem následovně bude identifikace kandidátních genů či jejich SNP, které jsou častější u subjektů s danou nemocí nebo určitým znakem v porovnání se subjekty, u nichž se nemoc nebo znak neprojeví. Jakmile jsou tyto genomové varianty identifikovány, jsou dále sledovány, aby došlo k odhalení genu či jeho SNP, který přímo přispívá k onemocnění nebo znaku. Pro průkazné určení kandidátního genu či jeho SNP se využívá koncept vazebné nerovnováhy (LD; z angličtiny linkage disequilibrium. Hodnota LD, označována jako hodnota P, indikuje korelaci mezi genotypy dvou variant. To, že bude dané variantě vyhodnocena vysoká hodnota LD, však nemusí znamenat, že je kauzální. Je možné, že je pouze ve vazbě s kauzální variantou (Ishigaki 2022).

Pro co nejpřesnější výsledek se využívá Bonferriho korekce. Jde o vícenásobné srovnání, používané v případech, kdy se současně provádí několik závislých nebo nezávislých statistických testů. Aby se předešlo mnoha falešným pozitivům, je třeba hodnotu alfa snížit, aby odpovídala počtu prováděných srovnání. Hodnota alfa je číslo  $0 \leq \alpha \leq 1$  (Bonferroni 1936).

### 3.1.1 Genom

Genom je označení pro veškerou DNA v organismu, kódující i nekódující. DNA obsahuje informace pro jeho správný vývoj od početí po celou délku života. DNA se nachází v jádře každé buňky v organismu (s výjimkou erytrocytů) v podobě lineární dvoušroubovice a v mitochondriích jako cyklická dvoušroubovice. Mitochondriální DNA se odliší od jaderné DNA nejen tvarem, ale i obsahem. Navíc se dědí jen od matek, proto se podle ní dá jednoduše zjistit původ ze strany matky daleko do minulosti. DNA je tvořena čtyřmi bazemi: adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a thymin (T). Na obou vlákních dvoušroubovice se naproti sobě nachází vždy dvě kompatibilní báze spojené vodíkovým můstkem, a to po celé délce DNA, přičemž A je kompatibilní s T a C s G. Z vnější strany se na každou bázi váže deoxyribóza (sacharid) a na ni fosfátová skupina. DNA je segmentovaná do kratších oddílů, chromozomů, jejichž počet je závislý na daném druhu organismu. Člověk má chromozomů 46 (23 párů) a kůň 64 (32 párů). Chromozomy se dělí základně na dva typy, a to na autozomy a gonozomy X a Y určující pohlaví (samice XX, samci XY). X a Y není zcela náhodné označení, chromozomy ve své kondenzované formě skutečně připomínají písmeno X nebo Y. Jsou tvořeny dvěma páry sesterských chromatid spojených centromerou. Jejich tvar je určen podle umístění centromery na chromozomu. Tvar připomínající X se nazývá metacentrický, přičemž každá chromatida (raménko) je přibližně stejně dlouhá, centromera se tedy nachází téměř ve středu chromozomu. Chromozomy s výrazně kratším ramínkem jsou submetacentrické a pokud je chromatida extrémně kratší je akrocentrická. Telocentrické chromozomy druhou chromatidu postrádají, centromera je tedy položena na konci chromozomu. Žádný z autozomů není označen písmenem Y, protože mají zpravidla oba chromozomy v páru podobně dlouhé, avšak gonozom Y je od X výrazně kratší, akrocentrický. Jelikož má zkrácenou chromatidu, nenese odpovídající geny do páru, které nezkrácený chromozom X obsahuje, jsou tedy heterologní. Sesterské chromatidy obsahují každá jednu alelu daného genu, to znamená, že jsou homologní. Alela může být buď dominantní nebo recesivní a na každé chromatidě může být jiná. Počet alel na chromatidě se různí na každém chromozomu, stejně tak i jejich funkce. Jak bylo zmíněno, chromozomy můžeme vidět rozdělené ve svých homologních párech, párech nesoucích stejné geny na chromatidách, pouze v jejich kondenzovaném stavu. Tento stav nastane pouze při buněčném dělení, kdy jsou chromozomy v jádře viditelné pod mikroskopem. Po zbytek času jsou chromozomy dekonenzované a rozprostřené v jádře buňky v podobě chromatinu, což je lidově řečeno rozmotaný chromozom. DNA je namotaná na histony (bílkovina), v případě dělení buňky se kondenzuje do chromozomu, a naopak při replikaci se DNA z histonů uvolní (Lee 1998).

Replikace je proces s cílem vytvořit z jedné DNA dvě identické. Probíhá v jádru buňky. Replikaci počíná enzym helikáza narušením vodíkových můstků, a tím dvoušroubovici rozplete do replikační vidličky připomínající písmeno Y. Na vedoucí vlákno usedne polymeráza a začne dotvářet nové vlákno. Replikace vždy probíhá nejprve na vedoucím vlákně a poté na druhém (opožděném), na kterém probíhá postupně po Okazakiho fragmentech. Po dokončení replikace získáme dvě identické DNA, z nichž každá má jedno vlákno mateřské a jedno nově syntetizované (Rossi 2006).

K získání cenných informací z DNA v podobě peptidů, musí DNA projít transkripcí a následně translací.

Iniciátor transkripce je enzym RNA polymeráza spolu s transkripčními faktory. Enzym vyhledává promotor (sekvence DNA), v této části je obsažena informace o začátku transkripce. Dvoušroubovice se po působení enzymu z části rozplete. Na jednom z vláken DNA se nasyntetizuje molekula RNA. Po přepsání celého genu do messenger RNA (mRNA) putuje tato lineární molekula z jádra do cytoplazmy buňky, přesněji k ribozomu, ve kterém bude probíhat translace. Než k tomu dojde, musí mRNA projít posttranskripčními úpravami, jednou z nich je vystřížení nepřekládajících oblastí neboli intronů. (Barton 2001).

Posledním krokem pro získání aminokyselin je zajistit úspěšnou cestu transferové RNA (tRNA) na ribozom připojený k mRNA. Na mRNA postupně usedají tRNA podle komplementarity bází (baze thymin je nahrazena v RNA uracilem) po kodonech (tripletech, trojice bází), přičemž každý kodon představuje jinou aminokyselinu. Jakmile je tRNA na mRNA proběhne syntéza peptidu, který zůstane na tRNA v peptidovém řetězci. Po jednom peptidu své místo na mRNA opouští a vrací se na jiné do té doby, než dojde na *stop kodon*. To je triplet oznamující ukončení syntézy (UAA, UAG nebo UGA). Peptidový řetězec je poté uvolněn z tRNA do buněčné cytoplazmy (Pollard & Earnshaw 2007).

### 3.1.1.1 Genotyp a fenotyp

Genotyp je soubor všech genů daného jedince či organismu. Může být označen písmeny, čísly či symboly. Například BB, Bb, bb, což nám znázorňuje sílu exprese dané varianty genu. Velkými písmeny budou označeny geny s dominantní genovou expresí a malými písmeny geny s expresí recesivní. Projev dominantního genu převládá nad recesivním v nepřítomnosti interakcí mezi geny. Některé genotypy se podílejí na projevu znaků pozorovatelných na organismu, které nazýváme fenotyp. Tyto znaky mohou být kvantitativní (měřitelné) nebo kvalitativní. Hlavními kvantitativními znaky je výška, hmotnost, u zvířat počet mláďat ve vrhu a jiné. Kvalitativní znaky nejsou přímo měřitelné, ale lze u nich určit přítomnost daného znaku, například barva srsti či očí, přítomnost rohů u zvířat. Znaky kvantitativní jsou řízeny velkým množstvím genů malého účinku (minorgeny), můžeme je označit jako polygenní znaky. Kvalitativní jsou řízeny většinou jedním genem velkého účinku (majorgenem) a jedná se o monogenní znaky (Otová et al. 2008).

### 3.1.1.2 SNP

SNP neboli jednonukleotidový polymorfismus jsou jedním z nejběžnějších typů genetických variant v genomu. SNP je nejmenší možná genetická změna, týkající se pouze 1 páru bází. Přesněji se SNP objevuje tam, kde jeden nukleotid, například adenin, je nahrazen jiným, a to ve významné části populace (>1 %). Při změně jednoho nukleotidu dojde ke změně 1 páru bází v DNA. Jestliže dojde k záměně A s C, musí být v komplementárním řetězci T nahrazen G. SNP se nachází v různých oblastech genů, jako jsou promotory, exony, introny a také nepřekládané oblasti (5'- a 3' UTR), většina se však nachází mimo kódující oblasti genu. Pokud jsou SNP uvnitř exonu, často nemají vliv na sekvenci aminokyselin v důsledku degenerace genetického kódu. SNP je často využíváno v medicíně, kdy je onemocnění podmíněno množstvím různých mutací a známá je pouze přibližná chromozomální lokalizace genetického postižení. Použitím SNP, které je v blízkosti lokalizace daných mutací se dá stanovit genotyp zdravých a nemocných členů sledované

populace. Jedinou nevýhodou této metody je potřeba úplné populace s již postiženými jedinci a že v každé populaci může být onemocnění ve vazbě s jinou alelou polymorfismu (Otová et al. 2008).

### **3.1.2 Význam**

Domácí zvířata jsou neocenitelným zdrojem pro studium molekulární architektury komplexních znaků. Přestože mapování kvantitativních lokusů (QTL) odpovědných za užitkovost u domácích zvířat dosáhlo v posledních desetiletích pozoruhodných výsledků, ne všechny genetické variace v komplexních vlastnostech byly zachyceny kvůli nízké hustotě markerů používaných při mapování QTL. GWAS, která využívá jednonukleotidový polymorfismus s vysokou hustotou (SNP), poskytuje nový způsob, jak tento problém řešit. Použití GWAS přineslo povzbudivé úspěchy v detailní analýze genetických mechanismů komplexních onemocnění u lidí. V současné době je GWAS aplikována v oblasti chovu domácích zvířat a genetiky a došlo zde k určitému pokroku. Bylo identifikováno mnoho genů nebo markerů, které ovlivňují užitkovost u domácích zvířat (Zhang et al. 2012).

## **3.2 Využití GWAS v predikci chorob u koní**

Koně, stejně jako psi, krávy, prasata a další hospodářská zvířata, si prošli domestikací. První zmínky o tom jsou z období přibližně před 5500 lety. Pro svou sílu, velikost, a hlavně poddajnost se stal kůň nedocenitelným pomocníkem lidstva. Sloužil především při přepravě nebo práci na poli. Při bitvách měli vojáci na koních výhodnou pozici. Dnes se jejich úloha pracovních zvířat změnila a jsou z nich ve většině zájmová zvířata chovaná pro radost nebo ke sportovnímu využití (Outram et al. 2009).

Jelikož se koně dožívají v průměru 25-30 let, jejich pořízení i následná péče je finančně nákladná, je genomická selekce výhodná metoda pro zajištění co nejvyšší pravděpodobnosti narození zdravého a v požadované oblasti výkonného hříběte (Haberland et al. 2012). Spousta koní již byla subjekty GWAS, a to v různě zaměřených studiích. Některá častá onemocnění koním způsobí bolest, která je blokuje v projevu jejich plného potenciálu, a to zapříčiní ztrátu jejich využitelnosti, pro chovatele jsou tyto koně pouze ekonomickou zátěží. První aplikací GWAS u koní byla studie zaměřená na lokalizaci genu pro nanismus (dwarfism) u fríských koní (Orr et al. 2010).

### **3.2.1 Melanomy u běloušů**

Nádory melanocytů (pigmentová buňka v kůži) neboli melanomy jsou běžným kožním onemocněním u běloušů starších pěti let. Mohou mít různé velikosti a vyskytovat se po celém těle, tím se mění i jejich invazivita na organismus koně. Nejcitlivějším odbobím na vytváření melanomu je vybělování, které u vybělujících běloušů začíná během druhého roku života a ukončuje se s fyzickou dospělostí koně, kdy je jeho srst již celoplášťově bílá. Kůže pod vybělenou srstí je šedá na rozdíl od vitiligo skvrn, kde chybí melanocyty, a tudíž i pigment, pokožka je růžová. Jako první vyběluje srst v okolí očí a řitního otvoru koně, to má spojitost s vysokým výskytem melanomů v těchto oblastech (Pulley & Stannard 1990).

Velké melanomy ( $\geq 4$  cm) způsobují obstrukci v konečníku nebo předkožce, zhoršení příjmu potravy a mohou zasahovat do horních dýchacích cest a tím ztěžovat dýchání.

V případech, kdy melanom svým umístěním omezuje koně v pohybu nebo ho ohrožuje na životě, bývá nejlepším řešením chirurgická excize melanomu (Groom & Sullins 2018).

Melanocytový protein 17/gp100 (PMEL17) a protein příbuzný tyrozináze 1/gp75 (TYRP1/gp75), jsou dva geny z kaskády melanocytů a melaninu, které vykazují mutace – recesivní stříbrné zbarvení a dominantní světle hnědé – které vedou k předčasné buněčné smrti a následkem je progresivní šedivění srsti u myši (Kwon et al. 1995). U koní dle Li et al. (2014) způsobují polymorfismy genu TYRP1 missense mutaci, která způsobuje (v dané studii u mongolských) tmavé zbarvení srsti, nejčastěji přítomné u ryzého zbarvení. Studie vedená Brunberg et al. (2006) dokazuje, že Gen PMEL17 způsobuje dominantní zbarvení Silver, které ředí vrané nebo hnědé zbarvení a na ryzé nemá efekt. Nejvíce je znatelné na hřívě a ocasu, které jsou oproti základní barvě světlejší až bílé.

Byl zjištěn nápadný rozdíl v expresi mRNA PMEL17/gp100 a TYRP1/gp75 porovnáním vzorků kůže jednobarevných (normální hladina exprese) a šedých koní (nízká hladina) a také vzorků melanomového nádoru koní (vysoká hladina). Barvení vzorků kůže protilátkami rozpoznávajícími PMEL17/gp100 potvrdilo výsledky analýzy. Zdá se, že PMEL17/gp100 a TYRP1/gp75 se podílejí na postupném šedivění koní (Rieder et al. 2000).

S fenotypem zbarvení vybělující bělouš je asociována 4,6 kb duplikace na genu STX17 (Rosengren Pielberg et al. 2008). To, že je duplikace skutečnou kauzální mutací způsobující tento fenotyp, potvrdila studie Sundström et al. (2012). V této studii byla resekvenována oblast 350 kb Gray haplotypu (kombinace alel způsobující vybělování) a nebyly nalezeny žádné jiné mutace spojené s fenotypem.

Obecně platí, že vitiligo skvrny se vyskytují u 26-67,0 % běloušů a u koní jiného zbarvení je výskyt vitiliga zanedbatelný (0,8-3,5 %) (Druml et al. 2021).

V GWAS zaměřené na souvislost vitiligo depigmentace u běloušů s geny zapojenými do imunitní odpovědi a nádorovými metastázemi bylo v populaci 152 lipicánů, z nichž 33 koní mělo projev vitiliga, identifikováno sedm kandidátních genů na čtyřech chromozomech (ECA1, ECA13, ECA17 a ECA20), které se údajně podílejí na patogenezi vitiliga u běloušů. Geny asociované s vrozeným imunitním systémem jsou PHF11, SETDB2, CARHSP1 a LITAFD, kdežto geny RCBTB1, LITAFD, NUBPL a PTP4A1 jsou zapojené do suprese, tedy potlačení nádoru a metastázování. Tato antagonistická patogeneze vitiliga ve vztahu k zvýšené motilitě specifických rakovinných buněk a/nebo metastázám na místech typických pro výskyt melanomů podtrhuje pravděpodobné zapojení genů RCBTB1, LITAFD, NUBPL a PTP4A1 (Druml et al. 2021).

Dle nejnovější studie provedené na populaci 141 lipicánech, 62 klisen a 79 hřebců, byl identifikován kandidátní SNP na chromozomu ECA24, který se pravděpodobně podílí na patogenezi melanomu u běloušů. Asociované SNP se nachází v intronové oblasti genu DPF3. Tento gen je u člověka předmětem velkého množství provedených GWAS a bylo prokázáno, že SNP tohoto genu mají silnou spojitost rakovinou (v dané studii rakovina prsu), metastázemi s lymfatických uzlinách a velikostí nádoru (Hoyal et al. 2005). U skupiny lipicánů byli vysledovány tři SNP s prokazatelnou spojitostí s výskytem melanomu, přičemž SNP AX-105009843, lokalizované právě v intronu genu DPF3, vykazovalo největší rozdíl u koní bez melanomu (stupeň 0) a koní se stupněm melanomu 1-3 (Druml et al. 2022).

### 3.2.2 Sarkoidy

Sarkoidy jsou běžné nádorové onemocnění koní, způsobené infekcí bovinního papillomaviru typu 1 nebo 2 (BPV1, BPV2) (Chambers et al. 2003), celkově zapříčiňují přes polovinu případů kožních nádorů u koní. Jsou lokálně velmi invazivní a celosvětově nejčastější je fibroblastický typ sarkoidu (Ragland et al. 1970) s výskytem 12,5-67 % všech nádorů (Baker & Leyland 1975). Sarkoidy tedy můžeme odlišovat a řadit do dané skupiny (typu), kterých je celkem 6, dle jejich vzhledu a invazivity. Jsou to typy okultní, verukózní, nodulární, již zmiňovaný fibroblastický, smíšený a malevolentní (Knottenbelt & Walker 1994).

Okultní sarkoidy jsou ploché, dochází k vypadávání srsti a kůže může šupinatět. Verukozní připomínají bradavici, jsou vyvýšené, šupinaté a mají lichenifikovaný vzhled se ztluštěním kůže. Nodulární sarkoidy jsou pevné podkožní léze. Fibroblastické působí jako odhalená živá tkáň, jsou masité, ulcerované s lokální infiltrací. Smíšené sarkoidy mohou být kombinace, z kteréhokoliv z výše uvedených typů a pokud u nich dojde k fibroblastické transformaci, stávají se agresivnější s postupem přeměny. Malevolentní jsou nezácnější forma sarkoidu, jsou však velmi agresivní, invazivní, rychle proliferují a mohou se šířit podél fascie a cév. Vyskytovat se na těle koně mohou buď jako jeden jednotný nádor nebo více nádorů různého typu. Nejčastějšími místy výskytu na těle je hlava (okolí očí, uší a huby) a krk (39 %), končetiny (35 %) a břicho (26 %) (Sullins et al. 1986).

Výskyt sarkoidů je u každého plemene koní jiný. Z výběrové populace koní jimi byli nejméně postiženi koně plemene Standardbred, kteří jsou využíváni na klusácké dostihy v sulkách (Angelos et al. 1988). Právě tyto rozdíly výskytu sarkoidů u různých plemen poukazují na to, že rozdíly budou v jejich genetické základně pro rezistenci nebo náchylnost k onemocnění. Dřívější studie potvrdily spojitost mezi výskytem sarkoidů a alelami equinního MHC (hlavní histokompatibilní komplex) (Lazary et al. 1985). Blíže bylo zjištěno, že antigen(y) MHC třídy I. ELA (Equine Leukocyte Antigen) A3 má spojitost s výskytem sarkoidů, a ještě silnější spojitost byla naznačena u MHC třídy II. taktéž haplotypu ELA A3 (Lazary et al. 1994).

Subjekty GWAS bylo 59 koní s diagnostikovanými sarkoidy a kontrolní skupina čítající 118 koní. U 10 koní nebylo specifikováno plemeno, jinak převažovalo plemeno quarter horse u koní ze Spojených států a anglický plnokrevník u koní ze Spojeného království. Plemeno Standardbred do studie nebylo zahrnuto pro vzácnost výskytu sarkoidu u těchto koní (Staiger et al. 2016).

Alelické asociační testy identifikovaly kandidátní lokusy na chromozomech ECA1, ECA4, ECA20, ECA22, ECA24 a X. Bayesovská analýza však potvrdila kandidátní lokusy pouze na ECA20 a ECA22, zbylé lokusy měly jen malý vliv na fenotypovou variabilitu. Z výchozí skupiny bylo potvrzeno, že 90 % z koní s diagnostikovanými sarkoidy je postiženo rizikovou alelou alespoň na jednom lokusu. Pro porovnání mělo 53 % koní z kontrolní skupiny rizikovou alelu alespoň na jednom lokusu. Přesněji byla vyhodnocena genotypová frekvence, při které je alela G na ECA20 SNP a alela A na ECA22 SNP označena za rizikovou alelu pro zvýšenou citlivost pro sarkoid (viz Obrázek I). Nebyla však mezi SNP ECA20 a ECA22 prokázána žádná interakce. Bylo proto provedeno podrobnější mapování (fine mapping) a byli zjištěny následující výsledky. Na ECA22 byli alelickou asociací

identifikovány dva vysoce významné SNP (BIEC2-619323 a BIEC2-619325), které překročili práh významnosti po Bonferroniho korekci pro vícenásobné testování. Identifikovaný region (24 877 024 bp až 26 914 845 bp) na ECA22 je genově velmi bohatý. Geny pro endoteliální receptory C proteinu (PROCR), enzymy degradující endoplazmatické retikulum (ER) EDEM2 (ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase I-like protein 2), eukaryotický translační iniciační faktor 6 (EIF6) a matrixová metallopeptáza 24 (MMP24) jsou SNP BIEC2-619323 nejbližší. Genotypové frekvence tohoto SNP u koní s diagnostikovanými sarkoidy, oproti kontrolní skupině, potvrzují alelu A jako rizikovou pro zvýšenou náchylnost k výskytu sarkoidu (Staiger et al. 2016).

MHC panel, který sloužil pro fine mapping, obsahoval 60 markerových SNP zahrnujících 4 Mb equinního MHC (ECA20: 28 089 836-33 947 047 bp) a byl použit k testování 48 koní trpících sarkoidy a 71 kontrolních koní. Výsledkem testů alelické asociace v oblasti MHC SNP byla identifikace významného lokusu BIEC2-530826. Tento SNP se nachází v intronu genu DQA1 MHC třídy II. Alelická frekvence (viz Obrázek I. c) toho SNP u koní se sarkoidy a kontrolní skupinou naznačuje, že alela C je asociována se zvýšenou náchylností k výskytu sarkoidů (Staiger et al. 2016).

### 3.2.3 Equinní Astma

Závažné equinní astma je chronické zánětlivé onemocnění dolních dýchacích cest projevující se konstrikcí průdušek s příznaky jako je kašel, dušnost, hyperreaktivity průdušek, nebo zvýšené produkce hlenu. Onemocnění může být také známé pod zkratkou RAO (rekurentní obstrukce dýchacích cest), která zahrnuje dvě plicní onemocnění, a to chronické obstrukční plicní onemocnění (COPD) a obstrukční plicní onemocnění spojené s letní pastvou (SPAOPD) (Durham 2001).

Toto onemocnění postihuje 10-15 % dospělých koní chovaných v běžných podmínkách ustájení v mírném klimatu. Právě podmínky v ustájení, obsahující antigeny z prašnosti ze sena nebo posdestýlky v boxech, u koní vyvolávají těžké astma (Gerber et al. 2015).

Lék, který by astma vyléčil není dosud znám. Léčba astmatických koní tedy spočívá v prevenci, a to co největším vyloučením dráždivých antigenů z prostředí, ve kterém kůň žije. Delší pobyt koně na travnaté pastvě může projevy astmatu zmírnit či odstranit během několika dnů či měsíců, záleží na závažnosti a délce trvání onemocnění. Pokud kůň pobývá ve stáji, kde není prašnost příliš vysoká, mohou i tak příznaky přetrvávat. Velkou efektivitu při zmírnění příznaků astmatu přináší podávání kortikosteroidů. Nebyly zaznamenány rozdíly u klasického a inhalačního podávání (Leclere et al. 2011).

Pro simulaci systémové reakce na dané antigeny provedla skupina vedená Lanzem et al. (2013) izolaci PBMC (periferní krevní mononukleární buňky) u 31 koní, z nichž 17 bylo postiženo RAO a 14 sloužilo jako kontrolní skupina. Koně byli nevlastní sourozenci (polo příbuzní), z toho důvodu byli rozděleni ještě do skupiny dle příbuznosti, tedy F1 a F2 (family 1 a 2). Na PBMC byla provedena po dobu 24 hodin stimulace antigeny, které prokazatelně podporují projevy RAO. Mezi tyto antigeny patřil extrakt senného prachu (HDE – hay dust extract), extrakt houby *Aspergillus fumigatus* (AFE) a lipopolysacharidy (LPS), dalšími použitými antigeny byl například extrakt cyatostominu (CE), rekombinovaný cyatostominový antigen (RCA) nebo konkavalin A (ConA). Stimulace HDE nebo RCA



způsobila výrazné rozdíly v hladinách cytokinů IL-4R mRNA u F1 koní s RAO a kontrolní skupinou, ovšem u F2 výrazné rozdíly zaznamenány nebyly. Podobně tomu bylo při expresi cytokiny IL-10 mRNA, u F1 koní s RAO i kontrolních byly stimulací pouze HDE vysledovány významné rozdíly, u F2 nikoliv. U F2 koní s RAO a zdravých koní F1 bylo dosaženo rozdílných hodnot exprese cytokinu IL-10 mRNA stimulací CE. U ostatních antigenů nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly. Tyto výsledky naznačují, že imunologická odpověď, konkrétně exprese cytokinu IL-4R, v reakci na senný prach a antigeny cyatostominu je jiná u koní s RAO a koí zdravých na základě jejich genetického pozadí (Lanz et al. 2013).

Studie vedená Mason et al. (2018) se zaměřila na hledání eQTL (exprese lokusu kvantitativního znaku) analýzou PBMC ze dvou rodin nevlastních sourozenců a nepříbuzné kohorty, dohromady 82 evropských teplokrevníků. Z této skupiny bylo 40 koní s RAO příznaky a 42 zdravých. 50 koní mezi sebou nemělo žádný příbuzenský vztah, 32 koní bylo nevlastními sourozenci, přičemž 17 jich bylo z F1 a 15 v F2. Tato skupina koní, tedy jejich izolované PBMC, podstoupila in vitro stimulaci následujícími činidly: žádná stimulace (MCK – mock treatment), LPS, RCA a HDE. Identifikováno bylo 4347 vysoce spolehlivých eQTL při 4 testováních PBMC, objeveny byly také dva trans regulační hotspoty zapojené do souvisejících biologických drah.

Pomocí GWAS provedené skupině 361 koní, z nichž 168 bylo zdravých a 193 s RAO, bylo vyfiltrováno přes milion SNP. Jako v předchozích obdobných studiích byly objeveny dva genomické úseky asociované s RAO na chromozomu ECA13 (pozice 23 001 364 a 32 843 309-33 525 948). Žádné z SNP však nebylo významné po vícenásobném celogenomovém testování. Zaměření tedy přešlo na MCK a HDE, protože představují rozdíly v genové expresi mezi základní linií a zhošením RAO.

Tři ze čtyř SNP asociovaných s MCK se nacházely na ECA13 (33502488, 32844446, 32843309) (jeden zbylý na ECA21, 52625145) v intronu thioredoxinové domény obsahující protein 11 (TXNDC11) a trans aktivátor MHC třídy II (CIITA), oba byly asociovány s genovou expresí proteinu dexametazonu (DEXI).

U HDE byl jeden SNP totožný jako u MCK (33502488) a druhý lokalizovaný na ECA28 (3692072), avšak oba SNP regulují jiné geny. Nebyla tedy nalezena žádná významná asociace mezi genovou expresí a stavem onemocnění pro geny regulované SNP, které jsou asociované s RAO (Mason et al. 2018).

### **3.2.4 Osteochondróza**

Osteochondróza (OC) je jedním z nejčastějších a nejnebezpečnějších vývojových ortopedických onemocnění u koní, které je multifaktoriální, dědičné a nejčastějšími příčinami vzniku může být rychlý růst zvířete, drobné úrazy nebo nutriční faktory. Při růstu mladého zvířete je onemocnění nejdynamičtější, léze se na kloubech mohou objevit spontánně a následně ustoupit, což naznačuje, že má OC dualistický charakter. Znamená to tedy, že je konečný stav OC určován výše zmíněnými příčinami a procesem oprav vyvolaným lézemi. U zvířat starších více než 1 rok, nelze očekávat zásadní změnu ve vývoji OC, proto u zvířat do 1 roku věku nedoporučuje využít pro léčbu artroskopickou operaci. Diagnostika OC se provádí pomocí klinických a radiografických nálezů, magnetické rezonance nebo pomocí použití

biomarkerů. Pro chovatele většinou OC znamená ztrátu hodnoty a potenciálu koně pro další využití. Výkon postižených koní nemusí být nutně poznamenán, ale jejich výsledky již nejsou tak relevantní, jelikož koně s tímto onemocněním bývají vyřazeni z chovu. Další formou nemoci je disekující osteochondróza (OCD), je také ortopedicky nebezpečná. Při OCD je postižena chrupavka i kost a dochází k jejich degeneraci. OCD se může vyskytnout již několik dní po narození až do věku 3 let, kdy se dokončuje vývoj distálních končetin (Van Weeren 2006).

Jak bylo zmíněno, OC i OCD vážně postihuje chrupavky i kosti kloubů. U koní byly provedeny asociační studie tohoto onemocnění v oblasti tibio tarzálního kloubu neboli hlezna a spěnky, jelikož to jsou nejčastěji postižené oblasti.

Prvním krokem k odhalení QTL, které by mohly být asociovány s projevem OC nebo OCD, byl genomový sken mikrosatelitů populace 211 polopříbuzných hanoverských koní. Významné QTL byly lokalizovány na chromozomech ECA2, ECA4, ECA5 a ECA16. Na těchto chromozomech se částečně překrývaly QTL asociované s projevem OC na spěnce a na hleznu. Tato skutečnost naznačuje možnou genetickou příbuznost projevu OC na těchto kloubech (Dierks et al. 2007).

Na základě předchozí studie se Lampe et al. (2010) zaměřili na ECA16, taktéž na obdobné populaci hanoverských koní. Cílem bylo upřesnit QTL pomocí rozšířené sady markerů 34 nově vyvinutých mikrosatelitů a 15 SNP. QTL pro OCD v hlezenních kloubech na ECA16 bylo možné vymezit v intervalu mezi 17,60 a 45,18 Mb pomocí vícebodových neparametrických vazebných analýz. Kromě toho bylo šest mikrosatelitů a jeden SNP významně asociován s hlezenním OCD v oblasti QTL mezi 24,26 a 42,41 Mb. Dále tato analýza odhalila druhý QTL pro OC na spěnce mezi 6,55 a 24,26 Mb na ECA16. Takovéto výsledky znázorňují postup k odhalení genů, které jsou základem QTL pro equinní OC a k vývoji markerového testu OC u hannoverských teplokrevníků (Lampe et al. 2009b).

V populaci plnokrevníků se zacílilo na identifikaci QTL asociovaného s projevem OCD. Na úrovni významnosti pro celý genom bylo identifikováno jediné SNP na ECA3 v intergenové oblasti. Na tomto modelu byly testovány i QTL dříve identifikované v populaci hanoverských koní (Lampe et al. 2009b; Komm 2010), to napomohlo ke zjištění dalších dvou SNP asociovaných s OCD. Avšak potvrzení QTL identifikovaného na ECA3 vyžaduje validaci na nezávislém vzorku. To naznačuje, že pro efektivní studium takto komplexních onemocnění, jako je osteochondróza, je potřeba vytvořit dostatečně velké soubory dat (Corbin et al. 2012).

Asociační studie provedená na populaci 161 francouzských klusáků lokalizovala několik oblastí asociovaných s projevem OC. Posuzoval se součet lézí různé závažnosti jako celek a přítomnost OC na spěnce, hleznu a na dalších místech. Na ECA13 byla lokalizována jedna oblast pro součet lézí. Na ECA 3 a ECA 14 po jedné oblasti pro OC na hleznu. A jedna pro OC na jiných místech, než je spěnka a hlezno na ECA15. Oblast na ECA3 vykazovala nejsilnější asociaci s OC na hleznu. Byly také porovnány QTL projevu OC a zajímavým zjištěním bylo, že se QTL pro OC na spěnce a hleznu nepřekrývaly, ani nebyly společné pro oba znaky, jak tomu bylo ve studii Dierks et al. (2007). Naopak byly QTL pro součet lézí spojeny buď s OC na spěnce, anebo s OC na hleznu, v žádném případě s oběma (Teyssèdre et al. 2012).

Ve studii Lykkjen et al. (2010) byly rentgenové snímky a vzorky krve pro výzkum získány od 363 norských ročků plemene Standardbred v roce 2007 a od 101 ročků v roce 2008. Koně byli vybráni podle svých otců, kteří museli mít v roce 2006 aspoň 10 potomků. Vybraná populace dohromady čítala 464 koní, kteří byli potomky 22 různých hřebců a 424 klisen. Na základě rentgenového vyšetření bylo z této populace vybráno ke genotypizaci 162 koní, z nichž 80 jedinců mělo nálezy OCD na intermediálním hřebeni distální tibie (holenní kost) a 82 bylo bez známek lézí ve sledovaných kloubech a sloužili jako kontrolní skupina. Analýza GWAS smíšeného modelu (mixed-model) odhalila sedm SNP, které vykazovaly mírnou asociaci s OCD, lokalizované na chromozomech ECA5, ECA10, ECA27 a ECA28. Na ECA5 vykazoval SNP BIEC2-920265 mírnou asociaci. Na ECA10 vykazovaly SNP BIEC2-132748 a BIEC2-132753 asociaci nejsilnější. SNP BIEC2-721410 a BIEC2-722382 lokalizované na ECA27 vykazovaly mírnou asociaci. Sousedící SNP na ECA28 BIEC2-744792 a BIEC2-744794 vykazovaly taktéž mírnou asociaci.

Plemenu Standardbred se věnovali také McCoy et al. (2016) a zaměřili se na projev OC v oblasti hlezna. Odhaleno bylo 12 kandidátních SNP, z nichž se 9 nacházelo na ECA14 a po jednom na ECA1, ECA10 a ECA21, které vykazovaly mírnou asociaci s OC. SNP na ECA14 byly rozděleny na chromozomu na dvě skupiny po 5 a 4. Skupiny od sebe byly vzdálené 15 Mb. Po korekci skruktury populace v dané studii (182 amerických a 139 norských koní) byla asociace s OC nejsilnější v oblastech výše zmíněných SNP na ECA14. To nám přináší odlišné výsledky než studie provedená Lykkjen et al. (2010).

Studie provedená na populaci 144 koní příslušných plemeni P.R.E. (pura raza española) odhalila 48 analyzovaných polymorfismů, z nichž 3 SNP byly silně asociované s projevem OC na různých místech postižení. U tohoto plemene byl nejčastěji postiženým místem OC hleznový kloub, avšak studie se na něj neomezila. To přineslo výsledek v podobě 3 SNP lokalizovaných na genech FAF1, FCN3 a COL1A2. Podrobněji bylo SNP na genu FAF1 asociováno s OC na spěnce pravé pánevní končetiny, SNP na FCN3 s OC v pravém kolenním kloubu a SNP na COL1A2 způsobilo zvýšení celkového součtu lézí na různých místech u stejného zvířete. Všechny 3 SNP se nacházely v intronové oblasti genů. Tato data přispívají k nahlédnutí do komplexních genových sítí, které jsou základem multifaktoriální nemoci OC, a související SNP by mohly být použity ve strategii selekce za pomoci markerů ke zlepšení zdraví koní, dobrých životních podmínek a konkurenční délky života (Sevane et al. 2016).

Lewczuk et al. (2018) se ve své studii zaměřili na asociaci genetického pozadí a projevu OC a OCD ve spěnkovém kloubu. Bylo využito dvou systémů škálování OC, a to OC/zdravý jedinci a OCD/zdravý jedinci. Do studie bylo využito vzorků krve a rentgenových vyšetření od celkem 201 koní (87 hřebců a 114 klisen). Jednalo se o teplokrevníky trénované pro výkonnostní zkoušky. Tito koně byli vybráni k fenotypizaci a genotypizaci. Kolektiv došel k významnému výsledku, při vyhodnocení na škále OCD/zdravý jedinci bylo odhaleno šestnáct SNP na několika chromozomech, hlavně na ECA1 a ECA10. Vyhodnocení bylo výrazně nižší na škále OC/zdravý jedinci, odhaleny byly pouze dva SNP s lokalizací na ECA10 a ECA15. Z těchto výsledků se zdá, že OC a OCD má jiné genetické pozadí. Zmíněné SNP by tedy mohly působit jako kandidátní markery pro OC a OCD, ale nejprve by bylo nutné zkontrolovat je na větší populaci (Lewczuk et al. 2018).

### 3.2.5 Dwarfismus a lymfedémy u fríských koní

#### 3.2.5.1 Dwarfismus

Dwarfismus je dědičné onemocnění koní, projevující se trpasličím vzrůstem a abnormální stavbou těla. Končetiny takto postižených koní jsou krátké a žebra v kostochondrálním spojení (chrupavčité spojení nepravých žebry s žebry pravými) vyčnívají dovnitř hrudního koše, zatímco hlava a záda vypadají stejně jako u zdravých jedinců.

Toto onemocnění se zdaleka nevyskytuje pouze u fríských koní. Chondrodysplastický dwarfismus, který vykazuje fenotyp krátkých končetin v poměru s tělem (příkladem může sloužit jezevčík), se dříve jevil u miniaturních koní jako recesivní genetické onemocnění, jelikož se postižená mláďata rodila rodičům bez projevu dwarfismu. Fenotypy dwarfismu jsou různé, mohou se projevovat abnormálními potraty či životaschopnými potomky vykazujícími skeletální dysplazii, tedy poruchu růstu či vývoje. Ve studii zaměřené na miniaturní koně byl identifikován gen ACAN (Aggrecan) na ECA1 a v dané oblasti byly sekvenovány exony pro porovnání sekvencí DNA koní postižených dwarfismem a koní zdravých. To vedlo k identifikaci 4 variant v exonech. Výsledky studie vedou k závěru, že pravděpodobně existují další ACAN alely způsobující dwarfismus (Eberth et al. 2018).

K odlišení koní postižených dwarfismem od zdravých jedinců může sloužit i kohoutková výška, která je plemenným standardem pro fríské koně, a to 1,54 m. Koně s nižší kohoutkovou výškou již nesplňují plemenný standard a nemohou být zařazeni do chovu. Dalším typickým znakem dwarfismu je také oslabení šlach ohybačů, což vede k hyperextenzi spěnkových kloubů. Populace fríských koní je postižena dwarfismem v důsledku příbuzenské plemenitby (inbreedingu) a populačních překážek (prudký pokles jedinců v populaci) u předků. Byla identifikována substituční bodová mutace (C>T) na ECA14 v genu B4GALT7, při které dochází k záměně syntetizované aminokyseliny.

GWAS vedená Orr et al. (2010) využila pro účely studie celkem 20 koní, z nichž 10 bylo postiženo dwarfismem a 10 bylo zdravých. Jejím výsledkem bylo nalezení SNP BIEC2-239376 na ECA14 s nejvyšší významností.

Genotypy 84 koní, z nichž 19 bylo postiženo dwarfismem, byly analyzovány za účelem provedení asociační studie a vyvinutí testu DNA. Bylo odhaleno 30 SNP asociovaných s dwarfismem na ECA14. Zcela homozygotní oblast se v případech pohybovala od 3 515 623 do 6 066 781 bp a nesla jedinečný haplotyp, postižené případy (2 kopie), přenašeče (1 kopie) a koně bez přenašečů (žádné kopie). Test DNA je tvořen 3 SNP, jelikož jejich genotypy určují, zda a kolik kopií nepříznivého haplotypu je přítomno. Test DNA byl úspěšně validován na několika nových případech (Schurink et al. 2014).

Provedením alelické asociace skupinou vedenou Leegwaterem et al. (2016) celého genomu byla zjištěna významná spojitost SNP BIEC2-239391 lokalizovaný na ECA14 s dwarfismem.

#### 3.2.5.2 Lymfedémy

Chronický progresivní lymfedém (CPL) je onemocnění, které postihuje lymfatický systém s manifestací na distálních končetinách mnoha tažných plemen, jako je Shirský kůň, Belgický tažný, Clydesdale, Irský cob, některá plemena německých tažných koní a také

Fráský kuň. První příznaky onemocnění se mohou objevit již ve věku dvou let. Mírné měkké otoky končetin a šupinatění pokožky lze jednoduše přehlédnout vzhledem k silnému osrstění distálních končetin, tzv. rousy. Rousy stěžují vizualizaci a palpaci běžných mírných změn na distální končetině. Typicky se lymfedémy projeví jako sekundární infekce roztoči rodu *Chorioptes* (česky strupovka) a/nebo bakteriální infekce s dalším projevem svědění, mokvání a tvorbou krust, které upozorní majitele a veterináře na probíhající proces onemocnění. Nejčastěji je toto onemocnění diagnostikováno jako dermatitida spěnky, též známá jako podlomy, nebo bahenní horečka. Použitím vhodné a včasné léčby infekce roztočů a bakteriálních infekcí je pouze utlumen akutní projev lymfedému, ten však dále přetrvává a postupuje při každé další reinfekci. Při postupu onemocnění dochází k nahromadění lymfatické tekutiny, která indikuje progresivní tkáňovou fibrózu. Ta má za následek zatvrdnutí kožních záhybů a uzlin, nejvýrazněji postiženým místem je spěnka. Léze může postoupit na úroveň spěnkového kloubu a karpální (hlezenní) či tarzální kost (nártní), výjimečně dosáhne nad karpální či tarzální kloub (hleznový).

Trauma lymfatických uzlin a kožních záhybů má za následek eroze, ulcerace a krvácení. Ztráta bariérové funkce, zhoršená cirkulace, nedostatečná lymfodrenáž a izolace rousy komplexně přispívá k vysokému riziku recidivujících infekcí a následného růstu lymfedému. Bez potřebné péče se může infikovaná tkáň dostat do stavu zvaného bakteriémie a septikémie, pod oběma názvy se skrývá otrava krve bakterie. Dostatečnou péčí o koně postižené CPL se lze těmito sekundárním procesům vyhnout, ale ve většině případů progresujícího CPL bývají koně utraceni, jelikož onemocnění je velmi bolestivé, způsobuje kulhání a ztrátu využitelnosti koně (Affolter 2013).

Pro GWAS bylo vybráno celkem 29 fríských koní, z nichž 21 bylo postiženo CPL a 8 bylo zdravých. Do sledované skupiny bylo pro výzkum zařazeno dalších 18 koní z Kalifornie, z těchto koní bylo CPL postiženo 6 koní a 12 bylo zdravých. Populace, která byla vybrána pro studii, čítala 47 fríských koní, 27 s CPL a 20 zdravých. Výsledek studie však nepřinesl výsledek s významnou asociací projevu CPL s žádným z analýzovaných SNP. Studie tedy naznačuje že genetické pozadí CPL je u fríských koní komplexní a může zahrnovat další faktory spojené s SNP. Při měření koní byla zjištěna významně zvýšená délka holeně postižených koní, což naznačuje fenotyp náchylný k rozvoji CPL (Affolter et al. 2020).

### **3.2.6 Rekurentní Laryngeální neuropatie**

Rekurentní laryngeální neuropatie (RLN) též známá jako idiopatická laryngeální hemiplegie (ILH) je bilaterální mononeuropatie s neznámou etiologií, způsobuje tedy omezení pohyblivosti svalů hrtanu. Postižené zvíře tak má potíže při dýchání, což zhoršuje jeho sportovní výkony. Jedná se o závažné onemocnění horních dýchacích cest. Nejčastěji je RLN zjištěno u koní čerstvě zařazených do tréninku (ve věku 2-3 let věku) a onemocnění se může projevovat nezvyklými zvuky koně při zátěži, jako je pískání, chrochtání nebo bručení (Cahill & Goulden 1986).

Při endoskopickém vyšetření se onemocnění projevuje sníženou abdukci (odtažení) levé strany aryteniodní chrupavky (chrupavka hlasivek). To je s největší pravděpodobností způsobeno dysfunkcí způsobenou degenerací rekurentních laryngeálních nervů (nervus laryngeus recurrens). Aby nebyla úplně ztracena využitelnost postižených koní, mohou

podstoupit chirurgický zákrok. Z toho vyplývá, že má RLN důležité ekonomické důsledky a ovlivňuje i welfare koní (Dixon et al. 2009).

Byly provedeny tři asociační studie provedené zaměřené na RLN, a to v rozmezí let 2011-2018 na populacích různých plemen koní (Brooks et al. 2018).

První studie byla vedena Dupuis et al. (2011) a zahrnula do populace 234 koní různých plemen (196 teplokrevníků, 20 klusáků, 14 plnokrevníků a 4 tažní koně), kteří byli postiženi RLN. Jako kontrolní skupina sloužila skupina 228 koní stejných plemen jako jako předchozí skupina. Studie však nevyhodnotila nijak významnou asociaci při analýze tří z plemen. Při analýze provedené na populaci zúžené na skupinu teplokrevníků, byly výsledkem dvě sugestivní asociace na ECA21 a ECA31 (Dupuis et al. 2011).

Následující asociační studie vedená Boyko et al. (2014) se zaměřila na plnokrevníky. Pro analýzu bylo vybráno 282 RLN postižených koní a 268 zdravých jedinců. Analýza tohoto souboru 550 koní, po korekci pro pohlaví valacha, odhalila nejsilnější asociaci s RLN u SNP BIEC2\_808543 lokalizovaného na ECA3. Tento lokus byl asociován s výškou koní a sousedí s geny LCORL a NCAPG (Singer-Hasler et al. 2012). Zahnutím výšky do modelové populace jako další kovariance nepřineslo žádné významné asociace, avšak v oblasti ECA18 a ECA23 byly odhaleny silné asociace s RLN. GWAS bez kovariancí poskytla také další sugestivní asociaci na ECAX na pozici 57,8 Mb. Bylo zjištěno, že působení QTL LCORL/NCAPG a ECA18 bylo konzistentní mezi samci i samicemi, zatímco QTL ECA23 se zdál silnější u samic a QTL ECAX se zdál naopak silnější u samců. QWAS pro RNL včetně genotypu BIEC2\_808543 jako kovariance neodhalila žádné další asociované oblasti (Byoko et al. 2014).

Nejaktuálnější studie se orientovala na koně plemene Americký Belgický chladnokrevník. Celkem bylo využito dat a vzorků od 458 belgických chladnokrevníků, 341 z nich byli pracovní tažní koně ze států Indiana, Michigan, New York, Ohio, a Pennsylvánie. Zbýlé koně (117) bylo využíváno sportovně ve vozatajství a těžkém tahu. Při použití logistické regrese bylo zjištěno, že porovnáním vztahů mezi výškou, věkem nebo pohlavím a stavem RLN byla vyhodnocena významná korelace ( $0,75 \pm 0,27$ ) pouze u výšky se stavem RLN. Bylo zjištěno, že u tohoto plemene je riziko RLN spojeno s pohlavně dimorfními rozdíly ve výšce a byl identifikován nový lokus přispívající k výšce pohlavně specifickým způsobem. Tento lokus se nachází na ECA1 v blízkosti genu kódujícímu myopalladin (MYPN). Přestože lokus přispívá k riziku RLN jen málo, naznačuje nám to, že jiné růstové znaky korelující s výškou mohou být základem korelace s tímto onemocněním. Další lokus spojený s výškou, přispívající k projevu onemocnění, byl identifikován na ECA15 konkrétně u samců. Tyto výsledky naznačují, že lokusy s pohlavně specifickou genovou expresí hrají důležitou roli ve změně růstových znaků ovlivňujících etiologii RLN, avšak ne nezbytně výšky v dospělosti. Byly zaznamenány další tři sugestivní lokusy na ECA24, ECA26 a ECA28. Tyto výsledky jsou slibnými cíly pro nové preventivní a léčebné strategie (Brooks et al. 2018).

### **3.2.7 Myeloencefalopatie způsobená EHV-1**

Equinní herpesvirová myeloencefalopatie (EHM) je sice neobvyklým projevem infekce equinním herpesvirem 1 (EHV-1), avšak může způsobit zničující ztráty jednotlivým farmám, stájím, na veterinárních klinikách či výstavních a závodních místech. Propuknutí

EHM je u koní rozpoznáno již po staletí, přesto je mnoho aspektů tohoto onemocnění špatně charakterizováno. Epidemie EHM, které proběhly v posledních letech v areálech závodíšť, výstavišť, jezdeckých škol či veterinárních klinik, upozornili na nakažlivou povahu EHV-1 a podnítily přehodnocení diagnostických a léčebných postupů a protokolů biologické bezpečnosti tohoto onemocnění (Pesterla et al. 2022).

EHV-1 je DNA virus patřící do čeledi Herpesviridae, který kromě neurologického onemocnění EHM způsobuje také respirační onemocnění a u březích klisen aborty. Neurologická forma EHM způsobuje u koní, poškození endoteliálních buněk, které spustí vaskulitidu a následné ischemické poškození centrálního nervového systému. Tím způsobuje značné utrpení koním a ekonomické ztráty pro chovatele. GWAS vedená Brosnahan et al. (2019) vybrala populaci 129 koní infikovaných EHV-1, u 61 z nich se vyvinula EHM a u zbylých 68 (kontrolní skupina) onemocnění vymizelo bez rozvoje neurologických příznaků. Vzorky byly od koní odebrány během přirozených vzplanutí onemocnění nebo experimentálních infekcí. Koně z první skupiny vykazovali neurologické příznaky jako je ataxie (porucha koordinace), paralýza močového měchýře nebo ulehnutí a neschopnost se postavit. Druhá skupina, která nevykazovala neurologické příznaky, trpěla pouze horečkou nebo dýchacími potížemi. Studie přinesla výsledek v recesivní modelové analýze. Bonferroniho úroveň významnosti překonal SNP marker BIEC2\_946397 lokalizovaný na ECA6 (Brosnahan et al. 2019).

Výsledek Brosnahan et al. (2019) se snažili potvrdit Dunuwille et al. (2020). Studie byla provedena na 94 EHV-1 infikovaných koních, z nichž 27 mělo rozvinuté příznaky EHM a zbylých 67 koní bylo bez neurologických příznaků. Jak můžeme vidět na Obrázku VII., nelze považovat žádné SNP zde znázorněné za významně asociované s projevem EHM, po použití Bonferriho korekce. Bylo provedeno i samostatné testování SNP markeru BIEC2\_946397. Tento lokus byl polymorfni s dvěma alelami G a A. Úroveň polymorfismu však byla nízká. To bohužel výsledek Brosnahan et al. nepotvrzuje.

### **3.2.8 Equinní metabolický syndrom**

Equinní metabolický syndrom (EMS), běžný u dospělých obézních koní, je komplexní stav primárně charakterizovaný obezitou, hyperinzulinémií a laminitidou. Laminitida je běžně spojena s ponecháním koní se pást na pastvinách s vysokým obsahem škrobu, fruktanu a cukru, přičemž se ukázalo, že insulinová resistance hraje roli v této formě laminitidy spojené s pastvinami (Treiber et al. 2006). Je důležitou příčinou ztráty užitkovosti zaviněné bolestivým kulháním a mortality koní, avšak jen málo analytických epidemiologických studií zkoumalo roli predisponujících faktorů. Laminitida je často chronická a sekundární k EMS, má dlouhodobé následky, které mohou vyústit ve značné utrpení koní či jejich eutanázii (Frank et al., 2010).

Etiologie a faktory vedoucí k sekundární laminitidě po EMS nejsou známy. Včasná identifikace případů EMS a rizikových faktorů je zásadní pro prevenci sekundární laminitidy (Alford et al. 2001).

Koně s EMS jsou často považováni za „nenáročné koně“, tedy koně, kteří prospívají na pastvě a dostávají minimální doplňkové jaderné krmivo. Geny přispívající k tělesnému typu „nenáročných koní“ by pravděpodobně byly výhodné pro přežití ve volné přírodě během

období nedostatku potravy zvýšením účinnosti krmiva. U lidí jsou takové „šetné“ geny spojovány jak s metabolickým syndromem, tak s diabetem 2. typu. EMS však pravděpodobně není řízen jediným genem, je spíše očekáváno, že je to komplexní genetické onemocnění způsobené více rizikovými faktory. Identifikace genetických faktorů spojených s fenotypem EMS by mohla pomoci při včasné diagnostice a prevenci a mohla by zabránit projevu sekundární laminitidy u predisponovaných koní (Freestone et al. 1992).

Metabolické fenotypy rutinně měřené (např. inzulín, inzulinové reakce, adipokiny, adipozita a jiné) jsou vysoce ovlivněny prostředím a mění se v důsledku fyziologických faktorů, jako je věk, plemeno a pohlaví, a to i u zdravých jedinců. Navíc ne všechny složky syndromu (například obezita) mohou být přítomny u jedinců se základními metabolickými poruchami. Fenotyp EMS je tak velmi složitý, a navíc se málo rozumí jeho patofyziologii. Pro lepší pochopení EMS je vyžadována jasnější fenotypová definice EMS; lepší pochopení účinků vnitřních i vnějších faktorů, které ovlivňují metabolická opatření; a pochopení komplexních interakcí mezi fenotypovými složkami syndromu a navrhovanými rizikovými faktory (McCue et al. 2015).

Ve studii provedené na 56 jedincích s onemocněním EMS, byly pomocí Sangerova sekvenování genotypizovány vzorky těchto koní na polymorfismy v genu FAM174A a výsledky byly posouzeny na souvislost s indikátory stavu EMS. Navíc byl genotypizován nejvýznamnější intergenový marker SNP BIEC2-263524 pomocí High Resolution Melt (HRM). Alela v 3' netranslatované oblasti (UTR) FAM174A korelovala se zvýšenými hodnotami inzulinu a BCS > 6,5. Marker SNP BIEC2-263524 vykazoval podobné souvislosti se zvýšenými hodnotami inzulinu a BCS > 6,5. Riziková alela na BIEC-263524 a FAM174A 3'UTR korelovala s 95% frekvencí, což ukazuje na silnou LD napříč tímto haplotypem. Potvrzení spojení mezi těmito markery a stavem EMS umožní genetické testy pro koně jako užitečný nástroj při diagnostice a prevenci EMS. Kromě zlepšení chápání etiologie tohoto znepokojivého stavu u koní se lokus FAM174A může ukázat jako zajímavý kandidátní gen pro lidskou obezitu (Lewis et al. 2016).

GWAS provedená na arabských koních byla složena z populace celkem 64 koní, z nichž 25 (10 klisen, 13 valachů a 2 hřebci) trpělo laminitidou a 39 (19 klisen, 19 valachů a 1 hřebec) bylo zdravých. Tito koně tvořili populaci 1 (P1). Populace 2 (P2) byla tvořena také arabskými koni, kteří byli nezávisle seskupeni a sloužili k ověření výsledků GWAS. P2 čítala 50 koní, 25 nebřezích klisen a 25 valachů, ve věku od 8 do 34 let. Byla vytvořena ještě třetí populace (P3) z již dříve uložených vzorků srsti od 102 koní, kteří byli příslušní k 5 různým plemenům. P3 sloužila ke stanovení frekvence alel FAM174A u zvířat různého původu. Pro tento soubor byly k dispozici omezené údaje o fenotypu, které se skládaly především ze základních demografických informací (věk, plemeno a pohlaví) (Lewis et al. 2017).

Výsledkem studie bylo odhalení jediného kandidátního lokusu obsahujícího 3 SNP markery, a to BIEC2-263370, BIEC2-263373 a nejvýznamnějšího SNP BIEC2-263524, které byly umístěny na ECA14. Alternativní alela této substituce T za C byla v dominantním modelu spojena s diagnózou laminitidy a zvýšenými hladinami cirkulujícího inzulinu v P1. Přestože funkce FAM174A, jediného předpokládaného genu v kandidátní oblasti, zůstává neznámá, může mít roli v homeostáze cholesterolu. V P2 si marker BIEC2-263524 udržel asociaci s vyššími hodnotami modifikovaného poměru inzulinu ke glukóze (MIGR). Alela 11 guaninu (11-G) na FAM174A korelovala se zvýšenými hodnotami inzulinu v P1 a v P2 se



zvýšeným MIRG a zvýšeným BCS. Polymorfismy BIEC2-263524-C a FAM174A 3' UTR-11(G) byly korelovány s 98% frekvencí, což ukazuje na silnou vazebnou nerovnováhu napříč tímto 150 kb haplotypem. Testy na tyto markery by mohly diagnostikovat koně s genetickou predispozicí k rozvoji obezity. Kromě toho může objev funkce FAM174A zlepšit naše chápání etiologie tohoto znepokojivého onemocnění u koní a podporuje další výzkumy tohoto lokusu zapojeného do projevu metabolických poruch a poruch souvisejících s obezitou u jiných plemen (Lewis et al. 2017).

V následující studii, jejíž předmětem byla skupina pěti koní, bylo cílem ověřit přítomnost alely FAM174A 3' UTR -11(G) u zvířat trpících EMS a pouze jeden z těchto koní vykazoval heterozygotní genotyp včetně jedné kopie 11(G) EM asociované alely. Je možné, že metoda identifikace zvířat postižených EMS navržená autory GWAS Lewis et al. (2017) může vést k nesprávným diagnózám. Alela FAM174A 11(G) se zdá být špatným indikátorem EMS, protože u většiny jedinců postižených EMS chybí. Nejpravděpodobněji je to způsobeno nízkým vlivem genu FAM174A na etiologii tohoto onemocnění, složitostí výsledného fenotypu a skutečností, že genetické pozadí může řídit několik lokusů. Budoucí studie by měly vzít v úvahu všechny vnitřní a vnější faktory, aby se stanovil jasný fenotyp EMS (Rodríguez-Sanz et al. 2019).

Studie provedená Norton et al. (2019) si kladla za cíl provést v rámci celogenomových asociačních analýz plemen (GWA) identifikaci asociovaných lokusů u dvou vysoce rizikových plemen, ve spojení s metaanalýzou k identifikaci sdílených a jedinečných lokusů mezi plemeny. GWA pro 12 znaků EMS identifikovala 303 a 142 asociovaných genomických oblastí u 264 velšských poníků a 286 koní plemene morgan. Metaanalýza ukázala, že 65 oblastí GWA bylo sdíleno napříč plemeny. Hranice regionů byly definovány na základě pevné velikosti nebo rozpadu vazebné nerovnováhy a byly upřednostněny, pokud byly: sdílené mezi plemeny nebo napříč vlastnostmi (vysoká priorita), identifikované v jedné kohortě GWA (střední priorita) nebo sdílené napříč vlastnostmi s žádným SNP nedosahujícím celogenomové významnosti (nízká priorita), což má za následek 56 oblastí s vysokou, 26 se střední a sedm oblastí s nízkou prioritou včetně 1853 kandidátních genů u velšských poníků; a 39 oblastí s vysokou, osmi se střední a devíti s nízkou prioritou včetně 1167 kandidátních genů u koní plemene morgan. Prioritní oblasti obsahovaly proteiny kódující geny, které byly funkčně obohaceny o dráhy spojené se zánětem, metabolismem glukózy nebo metabolismem lipidů. Tyto údaje ukazují, že EMS je polygenní vlastnost s rizikovými alelami specifickými pro plemeno a také s alelami sdílenými napříč plemeny.

Cílem práce vedené Rosa et al. (2020) bylo prozkoumat nové strategie pro identifikaci biochemických markerů a korelovaných genů v EMS. Ke kvantifikaci rizika EMS bylo v populaci arabských koní použito složené skóre odvozené z devíti běžných diagnostických proměnných. Byl použit přístup globální kapalinové chromatografie/hmotnostní spektroskopie (HPLC/MS) na celou plazmu odebranou od 49 arabských koní, což vedlo k 3392 vysoce spolehlivým znakům a identifikaci domnělých metabolitů ve veřejných databázích. Byla provedena celogenomová asociační analýza s genotypy z 670k Affymetrix Equine SNP array s využitím EMS-korelovaných metabolitů jako fenotypů. Došlo k objevu čtyř vlastností metabolitů významně korelujících s EMS. Výsledky GWA pro tyto vlastnosti identifikovaly čtyři jedinečné kandidátní oblasti obsahující 63 genů. Významné genomové markery zachycují 43,52 % variací v původním fenotypu EMS. Identifikované genomové

lokusy poskytují pohled na cesty kontrolující variace v EMS a původ genetické predispozice k tomuto stavu. Rychlé, proveditelné a přesné diagnostické nástroje odvozené z metabogenomiky lze převést do měřitelných přínosů v časové ose a kvalitě preventivních postupů řízení pro zachování zdraví koní. Prostřednictvím metabogenomického přístupu tedy byly identifikovány metabolické a genetické složky korelující s EMS a poskytují vynikající cíle pro budoucí výzkum EMS. I když jsou tyto nově identifikované metabolity slibné pro arabské plemeno, jsou kandidáty pro další zkoumání s využitím většího souboru vzorků a zahrnujících další plemena koní nebo sledování jedinců prostřednictvím longitudinální studie.

## 4 Závěr

- Bakalářská práce informovala čtenáře o výsledcích vybraných asociačních studií zaměřených na časté onemocnění koní.
- Každý chovatel koní by měl být obeznámen s existencí polygenních onemocnění a jejich základní problematikou. V chovech zatím výsledky GWAS nelze přímo využít, jelikož je metoda na počátku svého působení, ale mohou napomoci k chápání projevu daných onemocnění a jejich genetického pozadí.
- Výzkum některých polygenních onemocnění je již v pokročilém stádiu, kdy je znám jeden či více kandidátních polymorfismů, avšak k důkaznému určení predispozice k onemocnění to stále není dostačující.

## 5 Literatura

- Ishigaki K (2022). Beyond GWAS: from simple associations to functional insights. *Semin Immunopathol* **44**:3–14.
- Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato Hiroshi, Sato Hideyuki, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. 2002. Functional SNPs in the lymphotoxin- $\alpha$  gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature* (e 1047) DOI: 10.1038/ng1047.
- Perrocheau M, Boutreux V, Chadi S, Mata X, Decaunes P, Raudsepp T, Durkin K, Incarnato D, Iannuzzi L, Lear T L, Hirota K, Hasegawa T, Zhu B, Jong P de, Cribru E P Chowdhary B P, Guerin G. (2006). Construction of a medium-density horse gene map. *Animal Genetics* **37**(2):145–155. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2005.01401.x
- Lee C, Griffin D K, O'Brien P C M, Yang F, Lin C C, Ferguson-Smith M A. 1998. Defining the anatomy of the Rangifer tarandus sex chromosomes. *Chromosoma* **107**:61-69. DOI: 10.1007/s004120050281
- Rossi M L, Bambara R A. 2006. Reconstituted Okazaki Fragment Processing Indicates Two Pathways of Primer Removal. *Journal of Biological Chemistry* DOI: 10.1074/jbc.M604805200
- Barton M, Crowe A. 2001. Chromatin alteration, transcription and replication: What's the opening line to the story?. *Oncogene* **20**:3094–3099. DOI: 10.1038/sj.onc.1204334
- Deng N, Zhou H, Fan H, Yuan Y. 2017. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*. **8**:110635-110649. DOI: 10.18632/oncotarget.22372
- Outram A K, Stear N A, Bendrey R, Olsen S, Kasparov A, Zaibert V, Thorpe N, Evershed R P. 2009. The Earliest Horse Harnessing and Milking. *Science*. **5919**:1332-1335. DOI: 10.1126/science.1168594
- Pulley L T and Stannard A A. 1990. Tumors of the skin and soft tissues. In: *Tumors in Domestic Animals*, 3rd edn., Ed: Moulton J E, University of California Press. pp75-82
- Zhang H, Wang Z, Wang S, Li H. 2012. Progress of genome wide association study in domestic animals. *Journal of animal science and biotechnology* **3**(1):1-10. DOI: 10.1186/2049-1891-3-26
- Orr N, Back W, Gu J, Leegwater P, Govindarajan P, Conroy J, Ducro B, Van Arendonk J A M, MacHugh D E, Ennis S, Hill E W and Brama P A J. 2010. Genome-wide SNP association-based localization of a dwarfism gene in Friesian dwarf horses. *Animal Genetics*. **41**:2-7. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2010.02091.x
- Haberland A M, König von Borstel U, Simianer H, König S. 2012. Integration of genomic information into sport horse breeding programs for optimization of accuracy of selection. *Animal*. **9**:1369-1376. DOI: 10.1017/S1751731112000626
- Groom L M and Sullins K E. 2018. Surgical excision of large melanocytic tumours in grey horses: 38cases (2001–2013). *Equine Veterinary Education*. **30**(8):438-443. DOI: 10.1111/eve.12767
- Sundström E, Imsland F, Mikko S, Wade C, Sigurdsson S, Pielberg G R, Andersson L. et al. 2012. Copy number expansion of the STX17 duplication in melanoma tissue from Grey horses. *BMC genomics*. **13**:1-14.

- Rieder S, Stricker C H, Joerg H, Dummer R, Stranzinger G. 2000. A comparative genetic approach for the investigation of ageing grey horse melanoma. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. **117**(2):73-82.
- Li B, He X, Zhao Y, Zhao Q, Unierhu, Bai D, Manglai D. 2014. Tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) gene polymorphism and skin differential expression related to coat color in Mongolian horse. *Livestock Science*. **167**:58-64. DOI: 10.1016/j.livsci.2014.06.003
- Brunberg E, Andersson L, Cothran G, Sandberg K, Mikko S, Lindgren G. 2006. A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse. *BMC Genet*. **7**:46. DOI: 10.1186/1471-2156-7-46
- Druml T, Brem G, Velie B, Lindgren G, Horna M, Ricard A, Grilz-Seger G. 2021. Equine vitiligo-like depigmentation in grey horses is related to genes involved in immune response and tumor metastasis. *BMC Veterinary Research* **17**:336 DOI: 10.1186/s12917-021-03046-x
- Druml T, Brem G, Horna M, Ricard A, Grilz-Seger G. 2022. DPF3, A Putative Candidate Gene For Melanoma Etiopathogenesis in Gray Horses. *J Equine Vet Sci*. **108**:103797. DOI: 10.1016/j.jevs.2021.103797
- Kwon B S, Halaban R, Ponnazhagan S, Kim K, Chintamaneni C, Bennett D, Pickard R T. 1995. Mouse silver mutation is caused by a single base insertion in the putative cytoplasmic domain of Pmel17. *Nucl. Acids Res*. **23**:154–158.
- Hoyal CR, Kammerer S, Roth RB, Reneland R, Marnellos G, Kiechle M, Schwarz-Boeger U, Griffiths LR, Ebner F, Rehbock J, Nelson MR, Braun A. 2005. Genetic polymorphisms in DPF3 associated with risk of breast cancer and lymph node metastases. *J Carcinog*. **4**:13. DOI: 10.1186/1477-3163-4-13.
- Ragland W L, Keown G H, Spencer G R. 1970. Equine Sarcoid. *Equine Veterinary Journal*. **2**:2-11
- McCoy A M, Beeson S K, Splan R K, Lykkjen S, Ralston S L, Mickelson J R, McCue M E. 2016. Identification and validation of risk loci for osteochondrosis in standardbreds. *BMC genomics*. **17**:1-11.
- Dierks C, Löhring K, Lampe V et al. 2007. Genome-wide search for markers associated with osteochondrosis in Hanoverian warmblood horses. *Mamm Genome* **18**:739–747. DOI: 10.1007/s00335-007-9058-9
- Teyssèdre S, Dupuis M C, Guérin G, Schibler L, Denoix J M, Elsen J M, Ricard A. 2012. Genome-wide association studies for osteochondrosis in French Trotter horses. *Journal of animal science*. **90**(1):45-53.
- Corbin L J, Blott S C, Swinburne J E, Sibbons C, Fox-Clipsham L Y, Helwegen M, Vaudin M et al. 2012. A genome-wide association study of osteochondritis dissecans in the Thoroughbred. *Mammalian Genome*. **23**:294-303.
- Sevane N, Dunner S, Boado A, Canon J. 2016. Candidate gene analysis of osteochondrosis in Spanish Purebred horses. *Animal Genetics* **47**(5):570-578.
- Lampe V, Dierks C, Distl O. 2009b. Refinement of a quantitative gene locus on equine chromosome 16 responsible for osteochondrosis in Hanoverian Warmblood horses. *Animal*, **3**:1224-1231
- Baker J R and Leyland A. 1975. Histological survey of tumours of the horse, with particular reference to those of the skin. *Vet. Rec*. **96**:419-422.
- Knottenbelt D C, Edwards S and Daniel E A. 1995. The diagnosis and treatment of the equine sarcoid. *In Practice* **17**:123-129.
- Sullins K E, Roberts S M, Lavach J D and Severin GA. 1986. Equine sarcoid. *Equine Practice* **8**:21-27.

- Chambers G, Ellsmore V A, O'Brien P M, Reid S W J, Love S, Campo M S, Nasir L. 2003. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *Journal of General Virology*. **84**:1055–62. DOI: 10.1099/vir.0.18947-0
- Angelos J, Oppenheim Y, Rebhun W, Mohammed H, Antczak D F. 1988. Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses. *Animal Genetics*. **19**:417–25. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1988.tb00833.x
- Lazary S, Gerber H, Glatt P A, Straub R. 1985. Equine leucocyte antigens in sarcoid-affected horses. *Equine Veterinary Journal*. **17**:283–6.
- Lazary S, Marti E, Szalai G, Gaillard C, Gerber H. 1994. Studies on the frequency and associations of equine leucocyte antigens in sarcoid and summer dermatitis. *Animal Genetics*. **25**:75–80. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1994.tb00406.x
- Staiger E A, Tseng C T, Miller D, Cassano J M, Nasir L, Garrick D, Brooks S A, Antczak D F. 2016. Host genetic influence on papillomavirus-induced tumors in the horse. *International Journal of Cancer*. **139**:84-792. DOI: 10.1002/ijc.30120
- Durham A. 2001. Update on therapeutics for obstructive pulmonary diseases in horses. *In Practice*. **23**:474-481. DOI: 10.1136/inpract.23.8.474
- Gerber V, Tessier C, Marti E. 2015. Genetics of upper and lower airway diseases in the horse. *Equine Veterinary Journal*. **47**:390–7. DOI: 10.1111/evj.12289
- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie J P. 2011. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*. **16**:1027–46. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2011.02033.x
- Lanz S, Gerber V, Marti E, Rettmer H, Klukowska-Rötzler J, Gottstein B, Matthews J B, Pirie S, Hamza E. 2013. Effect of hay dust extract and cyathostomin antigen stimulation on cytokine expression by PBMC in horses with recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **4**:229-237. DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.07.005
- Mason V C, Schaefer R J, McCue M E, Leeb T, Gerber V. 2018. eQTL discovery and their association with severe equine asthma in European Warmblood horses. *BMC Genomics*. **19**:581 DOI: 10.1186/s12864-018-4938-9
- Lewczuk D, Bereznowski A, Hecold M, Frąszczak M, Ruś A, Korwin-Kossakowska A, Szyda J, Kamiński S. 2018. Differences between horse selection based on two forms of osteochondrosis in fetlock. *Journal of Applied Genetics*. **59**:225–230.
- Van Weeren P R. 2006. Etiology, diagnosis and treatment of OC(D). *Clinal Techniques in Equine Practice*. **5**:248–258. DOI: 10.1053/j.ctep.2006.08.002
- Lykkjen S, Dolvik N I, McCue M E, Rendahl A K, Mickelson J R, Røed K H. 2010. Genome-wide association analysis of osteochondrosis of the tibiotarsal joint in Norwegian Standardbred trotters. *Animal Genetics*. **41**:111–120. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2010.02117.x
- Komm K. 2010. Fine mapping of quantitative trait loci (QTL) for osteochondrosis in Hanoverian warmblood horses. PhD Thesis. University of Veterinary Medicine Hannover
- Schurink A, Hellinga I, Leegwater P, Back W, Bastiaansen J, Ducro B. 2014. Genome-Wide Association Study Leads to a DNA Assay for dwarfism in the Friesian Horse Population. In 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: Asas
- Eberth J E, Graves K T, MacLeod J N, Bailey E. 2018. Multiple alleles of ACAN associated with chondrodysplastic dwarfism in Miniature horses. *Animal genetics*. **49**(5):413-420.

- Leegwater PA, Vos-Loohuis M, Ducro B J, Boegheim I J, van Steenbeek F G, Nijman I J, Monroe G R, Bastiaansen J W, Dibbits B W, van de Goor L H, Hellinga I, Back W, Schurink A. 2016. Dwarfism with joint laxity in Friesian horses is associated with a splice site mutation in B4GALT7. *BMC Genomics* **17**:839. DOI: 10.1186/s12864-016-3186-0
- Affolter V K. 2013. Chronic progressive lymphedema in draft horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. **29**:589–605. DOI: 10.1016/j.cveq.2013.08.007
- Affolter V K, Dalley B, Kass P H, Brown E A, Sonder C, Bannasch D L. 2020. Chronic progressive lymphoedema in Friesian horses: suggestive phenotype of affected horses and genome-wide association study. *Veterinary Dermatology*. **31**:234-e51. DOI: 10.1111/vde.12831
- Dupuis M C, Zhang Z, Druet T, Denoix J M, Charlier C, Lekeux P, Georges M. 2011. Results of a haplotype-based GWAS for recurrent laryngeal neuropathy in the horse. *Mammalian Genome*. **22**:613–620. DOI: 10.1007/s00335-011-9337-3
- Boyko A R, Brooks S A, Behan-Braman A, Castelhamo M, Corey E, Oliveira K C, Swinburne J E, Todhunter R J, Zhang Z, Ainsworth D M, Robinson N E. 2014. Genomic analysis establishes correlation between growth and laryngeal neuropathy in Thoroughbreds. *BMC Genomics*. **15**:259. DOI: 10.1186/1471-2164-15-259
- Brooks S A, Stick J, Braman A, Palermo K, Robinson N E, Ainsworth D M. 2018. Identification of loci affecting sexually dimorphic patterns for height and recurrent laryngeal neuropathy risk in American Belgian Draft Horses. *Physiological Genomics*. **12**:1051-1058. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00068.2018
- Cahill J I & Goulden B E. 1986a. Equine laryngeal hemiplegia. Part I. A light microscopic study of periperal nerves. *New Zealand Veterinary Journal*. **34**:161-169. DOI: 10.1080/00480169.1986.35334
- Dixon P M, Hahn C N, Barakzai S Z. 2009. Recurrent laryngeal neuropathy (RLN) research: where are we and to where are we heading? *Equine Veterinary Journal*. **41**:324–327. DOI: 10.2746/042516409X423082
- Signer-Hasler H, Flury C, Haase B, Burger D, Simianer H, Leeb T, Rieder S. 2012. A genome-wide association study reveals loci influencing height and other conformation traits in horses. *PloS One*. **7**:e37282. DOI: 10.1371/journal.pone.0037282.
- Brosnahan M M, Al Abri M A, Brooks S A, Antczak D F, Osterrieder N. 2019. Genome-wide association study of equine herpesvirus type 1-induced myeloencephalopathy identifies a significant single nucleotide polymorphism in a platelet-related gene. *The Veterinary Journal*. **245**:49-54. DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.12.013
- Pusterla N, Hussey G S, Goehring L S. 2022. Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. **38**(2):339-362. DOI: 10.1016/j.cveq.2022.05.006.
- Dunuwille W M B, Mashouf N Y, Balasuriya U B R, Pusterla N, Bailey E. 2020. Genome-wide association study for host genetic factors associated with equine herpesvirus type-1 induced myeloencephalopathy. *Equine Veterinary Journal*. **52**:794–798. DOI: 10.1111/evj.13261
- Otová B et al. 2008. *Lékařská biologie a genetika I. díl. 1. vydání.* Praha: Karolinum. 123 s. ISBN 978-80-246-1594-3

- Pollard T D & Earnshaw W C. 2007. Cell Biology. 2. vyd. [s.l.]: Saunders. ISBN 1416022554
- Bonferroni C E. 1936. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze. **8**:3-62
- Broad Institute. 2007. Horse Genome Project. Broad Institute. Available from <https://www.broadinstitute.org/horse/horse-genome-project> (accessed září 2007)
- Lewis S L, Holl H M, Streeter C, Posbergh C, Schanbacher B J, Place N J, Mallicote M F, Long M T, Brooks S A. 2017. Genomewide association study reveals a risk locus for equine metabolic syndrome in the Arabian horse. *Journal of Animal Science*. **95**:1071-1079. DOI: 10.2527/jas2016.1221
- Frank N, Geor R J, Bailey S R, Durham A E, Johnson, P J. 2010. Equine Metabolic Syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **24**:467-475. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2010.0503.x
- Freestone J F, Beadle R, Shoemaker K, Bessin R T, Wolfsheimer K J, Church C. 1992. Improved insulin sensitivity in hyperinsulinaemic ponies through physical conditioning and controlled feed intake. *Equine Veterinary Journal*. **24**:187-190. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1992.tb02812.x
- Alford P, Geller S, Richrdson B, Slater M, Honnas C, Foreman J, Robinson J, Messer M, Roberts M, Goble D, Hood D, Chaffin M. 2001. A multicenter, matched case-control study of risk factors for equine laminitis. *Preventive Veterinary Medicine*. **49**:209-222. DOI: 10.1016/S0167-5877(01)00188-X.
- Treiber H, Kronfeld D S, Hess T M et al. 2006. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *Journals American Veterinary Medical Association*. **228**:1538-1545
- Rodríguez-Sanz C E, Sevane N, Dunner S. 2019. Genetics of equine metabolic syndrome. *The Veterinary Record*. **185**(5):148.
- Norton E, Schultz N, Geor R, McFarlane D, Mickelson J, McCue M. 2019. Genome-wide association analyses of equine metabolic syndrome phenotypes in Welsh ponies and Morgan horses. *Genes*. **10**(11):893.
- Rosa L P, Mallicote M F, Long M T, Brooks S A. 2020. Metabogenomics reveals four candidate regions involved in the pathophysiology of Equine Metabolic Syndrome. *Molecular and cellular probes*. **53**:101620.



## 6 Seznam použitých zkratk a symbolů

GWAS	celogenomová asociační studie
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
A	adenin
G	guanin
T	thymin
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
ECA	označení chromozomu koně, Equus Caballus
bp	páry bází, komplementární báze
kb	1000 bp
Mb	1000 kb
$h^2$	heritabilita, dědivost
RAO	recurrent airway obstruction, rekurentní obstrukce dýchacích cest
COPD	chronické obstrukční plicní onemocnění
SPAOPD	obstrukční plicní onemocnění spojené s letní pastvou
QTL	lokus kvantitativního znaku (quantitative trait loci)
eQTL	exprese lokusu kvantitativního znaku (expression quantitative trait loci)
MCK	mock treatment, placebo
HDE	hay dust extract, extrakt senného prachu
LPS	lipopolysacharidy
PBMC	periferní krevní mononukleární buňky
AFE	extrakt houby <i>Aspergillus fumigatus</i> dalšími použitými antigeny byl na
CE	extrakt cyatostominu
RCA	rekombinovaný cyatostominový antigen
ConA	konkavalin A
TXNDC11	thioredoxinová doména obsahující protein 11
CIITA	trans aktivátor MHC třídy II
DEXI	proteinu dexametazonu
OC	osteocondróza
OCD	disekující osteocondróza
CPL	chronický progresivní lymfedém
RLN	rekurentní laryngeální neuropatie
ILH	idiopatická laryngeální hemiplegie
LCORL	ligand-dependní nukleární receptor podobný korepresoru; protein
NCAPG	non-SMC kondenzující I protein subjednotka G
MYPN	gen kódujícímu myopalladin
EHV-1	equinní herpesvirus 1
EHM	equinní herpesvirová myeloencefalopatie
EMS	equinní metabolický syndrom
MIGR	modifikovaný poměr inzulínu ke glukóze
BCS	body condition score, hodnota tělesné kondice
ACAN	gen Aggrecan



