

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ

Ústav genetiky

Klinická genetik

Ing. Leona Vychodilová, Ph.D.

MVDr. Karla Stejskalová, Ph.D.

MVDr. Jana Bubeníková

Mgr. Ján Futas, Ph.D.

Mgr. Martin Plášil, Ph.D.

Mgr. Eva Jánová, Ph.D.

Prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Základy genetiky.....	7
2.1 Základní pojmy genetiky	7
2.1.1 Gen, lokus, alela	8
2.1.2 Genotyp a fenotyp	8
2.1.3 Alelické interakce.....	8
2.1.4 Kvalitativní a kvantitativní znak	9
2.1.5 Mutace, polymorfismus	9
2.1.6 Expres genu	10
2.2 Genom, gen a jejich změny	11
2.2.1 Genom	11
2.2.1.1 Struktura NK.....	12
2.2.1.2 Struktura genomu.....	13
2.2.1.3 Chromozomy.....	14
2.2.2 Gen	17
2.2.2.1 Eukaryotické vs. prokaryotické geny.....	18
2.2.2.2 Metody identifikace genů	19
2.2.3 Mutace.....	20
2.2.3.1 Molekulární podstata mutací.....	21
2.2.3.2 Chromozomové aberace.....	21
2.2.3.3 Genomové mutace	22
3. Základy genetiky šlechtění domácích zvířat.....	23
3.1 Genetika kvantitativního znaku	23
3.1.1 Charakteristika kvantitativního znaku.....	23
3.1.2 Principy hodnocení kvantitativního znaku.....	23
3.1.3 Složky fenotypové variance	25
3.1.4 Koeficient heritability	26
3.2 Genetické principy selekce a plemenitby	27
3.2.1 Šlechtění	27
3.2.2 Selekcce	27
3.2.2.1 Typy umělé selekce.....	28
3.2.3 Plemenná hodnota a její odhad.....	29
3.2.3.1 Plemenná hodnota	29

3.2.3.2	Odhad plemenné hodnoty	29
3.2.4	Plemenitba	30
3.2.4.1	Metody plemenitby založené na podobnosti rodičů a potomků	31
3.2.4.2	Metody plemenitby založené na heteroze	32
3.3	Vliv šlechtění na kvalitu surovin a potravin živočišného původu	34
4.	Základy genomiky domácích zvířat	36
4.1	Úvod do genomiky a její vymezení	36
4.1.1	Výzkum genomu	36
4.1.1.1	Mapování genomu	36
4.1.1.2	Sekvenování genomu	37
4.2	Genomické přístupy k identifikaci ekonomicky významných genů zvířat	38
4.2.1	Analýza kandidátních genů	38
4.2.2	Molekulární disekce komplexního znaku	38
4.2.2.1	Princip a obecný postup disekce komplexního znaku	38
4.2.2.2	Celogenomový screening (genome-wide association study, GWAS)	39
4.2.2.3	Potvrzení biologické funkce kandidátních genů: analýza exprese kandidátních genů	40
4.3	Genomické přístupy k selekci zvířat	41
4.3.1	Genomická selekce: určení genomické plemenné hodnoty	41
5.	Mutace, mutageny a jejich význam	43
5.1	Mutagenita, genotoxicita, testování genotoxicity	44
5.1.1	Mutagenita a genotoxicita	44
5.1.2	Testování genotoxicity	44
5.1.2.1	In vitro testy genotoxicity	45
5.1.2.2	In vivo testy genotoxicity	47
5.2	Genetické riziko faktorů vnějšího prostředí, mutageny v potravním řetězci	49
5.2.1	Fyzikální faktory	49
5.2.2	Biologické faktory	50
5.2.3	Chemické faktory	50
5.3	Mutageny a genetika nádorových onemocnění	51
5.3.1	Genetická podstata vzniku nádorových onemocnění	51
5.3.1.1	Genetické faktory ovlivňující vznik a rozvoj nádorových onemocnění	52
6.	Dědičná onemocnění a vrozené vývojové vady domácích zvířat	54
6.1	Dědičná onemocnění	55
6.1.1	Mendelistický typ dědičnosti	55

6.1.2	Nemendelistická dědičnost.....	57
6.2	Vrozené vývojové vady (VVV).....	62
6.3	Diagnostika, eliminace a prevence DO a VVV	63
6.3.1	Diagnostika DO	63
6.3.2	Eliminace DO a VVV	65
6.4	Přehled prakticky významných DO a VVV u domácích zvířat.....	67
6.5	Dědičné poruchy zdraví ovlivňující kvalitu živočišných produktů.....	73
6.5.1	PSE maso.....	73
6.5.2	Mastitidy.....	74
7.	Populační genetika	75
7.1	Populace a genofond.....	75
7.2	Četnost alel v populaci a genetická diverzita	76
7.3	Mendelovská a modelová populace a její genetické charakteristiky.....	77
7.4	Hardyho-Weinbergův zákon.....	78
7.5	Populační genetika dědičných nemocí zvířat, řešené příklady	80
8.	Veterinární cytogenetika	85
8.1	Chromozomy domácích zvířat a metody jejich studia	85
8.2	Změny chromozomů a jejich klasifikace.....	87
8.3	Klinická cytogenetika domácích zvířat	87
8.3.1	Robertsonovská translokace 1/29 u skotu	88
8.3.2	Reciproké translokace	88
8.3.3	Aneuploidie pohlavních chromozomů	89
8.3.4	Mozaiky a chiméry.....	89
8.4	Využití cytogenetiky domácích zvířat.....	90
9.	Genetická odolnost a vnímavost k nemocem u zvířat.....	91
9.1	Odolnost a vnímavost k nemocem jako biologický jev.....	91
9.2	Interakce hostitel-patogen.....	91
9.2.1	Mechanismy přežití – patogen a hostitel.....	92
9.3	Podstata a typy odolnosti a vnímavosti k nemocem.....	93
9.3.1	Definice rezistence, relativní fenotypy.....	93
9.3.2	Typy variability v rezistenci k nemocem	94
9.4	Indikace k využití rezistence ve šlechtění domácích zvířat.....	97
9.5	Příklady využití rezistence ve šlechtění u domácích zvířat.....	98
9.5.1	Mastitidy u skotu.....	98
9.5.2	Scrapie.....	98

9.5.3	Stresový syndrom prasat	99
9.1.1.	Markova choroba.....	99
10.	Imunogenomika a imunogenetika	100
10.1	Historie: genetika krevních skupin	100
10.2	Genetické řízení imunitní odpovědi, imunogenom	102
10.2.1	IR geny typu I.....	103
10.2.2	IR geny typu II	103
10.3	Geny imunitní odpovědi a nemoci.....	104
10.4	Využití imunogenetiky ve veterinární medicíně	105
11.	Farmakogenomika a farmakogenetika	106
11.1	Úvod	106
11.2	Terminologie a definice	107
11.3	Genetická podstata individuální proměnlivosti v reakci na léčiva: farmakogenetika 107	
11.3.1	Veterinární farmakogenetika.....	108
11.3.1.1	Farmakogenetické rozdíly mezi plemeny domácích zvířat.....	109
11.3.1.2	Individuální farmakogenetické rozdíly u domácích zvířat	109
11.4	Využití genomických technik ve vývoji nových léčiv: farmakogenomika	111
11.4.1	Detekce farmakogenetické variability.....	111
11.4.2	Vývoj nových léčiv	111
11.4.3	Vakcinomika	112
12.	Genetika a reprodukce	113
12.1	Plodnost jako užitková vlastnost a jako zdravotní znak	113
12.2	Selekce na plodnost u domácích zvířat.....	113
12.3	Poruchy plodnosti	114
12.4	Biotechniky v reprodukci domácích zvířat. Genetické dopady ET a AI v chovu zvířat. 114	
12.4.1	Genetické dopady biotechnik	115
12.5	Principy klonování a jeho aplikace u domácích zvířat	116
12.5.1	Principy klonování	117
12.5.2	Epigenetické změny při používání biotechnik v reprodukci	117
13.	Molekulární diagnostika ve veterinární medicíně.....	120
13.1	Základní pojmy a principy molekulární genetiky.....	120
13.1.1	Obecné metody pro práci s nukleovými kyselinami	122
13.1.2	Metody molekulární genetiky založené na amplifikaci	122
13.1.2.1	Polymerázová řetězová reakce.....	122

13.1.2.2	Modifikace polymerázové řetězové reakce.....	123
13.1.2.3	Metody sekvenování	124
13.1.3	Metody molekulární genetiky založené na hybridizaci.....	125
13.2	Metody molekulární biologie využívané ve veterinární medicíně a v hygieně a technologii potravin.....	127
13.3	Molekulární testy parentity.....	129
14.	Genové manipulace.....	135
14.1	Principy a metody genových manipulací.....	135
14.1.1	Základní pojmy	135
14.1.2	Molekulární klonování	137
14.2	Přenos genů u rostlin a živočichů	139
14.2.1	Charakteristika transgenů	139
14.2.2	Techniky přenosu genového konstruktů	140
14.2.2.1	Metody náhodné integrace	140
14.2.2.2	Metody umožňující přesné zacílení genetické manipulace	141
14.3	Přehled některých produktů rekombinantních technologií.....	142
14.3.1	Transgenní rostliny.....	143
14.3.2	Transgenní živočichové.....	143
14.4	Hodnocení rizik, legislativa, GMO v EU a ČR	145
14.4.1	Typy nakládání s GMO	146
14.4.2	Legislativa a hodnocení rizik GMO	146
15.	Genetika laboratorních zvířat.....	148
15.1	Definice laboratorního zvířete, historie	148
15.2	Genetika laboratorních zvířat – linie, kmeny laboratorních zvířat.....	149
15.2.1	Outbrední laboratorní zvířata	149
15.2.2	Inbrední laboratorní zvířata	151
15.2.2.1	Inbrední deprese.....	153
15.3	Využití kmenů laboratorních zvířat	153
15.4	Bioetika výzkumu na zvířatech	156
15.4.1	Princip 3R.....	158
16.	Použitá literatura	160

1. Úvod

Učební text „Klinická genetiká“ má za cíl uvést studenty do problematiky aplikací různých oblastí genetiky ve veterinární medicíně. Text předpokládá znalosti biologie a genetiky na úrovni třetího ročníku studia a má sloužit jako základní materiál pro přípravu ke zkoušce.

Podobně, ne-li víc než v jiných oborech a vyučovaných předmětech, je vývoj genetiky a jejích klinických aplikací velmi rychlý. Jednotlivé kapitoly se proto nezaměřily na shromáždění nejnovějších poznatků z dané oblasti, ale spíše na shrnutí principů a jejich nejvýznamnějších aplikací do veterinární medicíny. Nedílnou součástí této přípravy jsou praktická cvičení a přednášky. Jejich cílem je umožnit studentům porozumět a interpretovat fakta prezentovaná v tomto textu a aktualizovat je tam, kde je to třeba.

Učební text je prvotně určen posluchačům fakulty veterinárního lékařství, je však v podstatné míře použitelný i pro přípravu ke zkoušce z předmětu „Speciální genetiká“ pro FVHE. Rozdíly v obsahu obou disciplín a v požadavcích na posluchače obou fakult budou vymezeny v rámci výuky obou předmětů do doby, než bude připraven podobný text pro FVHE.

V Brně v září 2019

Petr Hořín, garant disciplíny a přednosta Ústavu genetiky FVL VFU

Leona Vychodilová, vedoucí autorského kolektivu

2. Základy genetiky

2.1 Základní pojmy genetiky

Genetika je biologická věda zabývající se studiem genů, objasňuje zákonitosti přenosu znaků a vlastností z generace na generaci, tj. z rodičů na potomstvo (dědičnosti) a rozdílnosti jejich projevu mezi jedinci (proměnlivosti).

Genetika lze dále rozdělit do čtyř hlavních odvětví. Jsou jimi **transmisní, molekulární, populační a kvantitativní genetika**. Transmisní genetika popisuje přenos genů z generace na generaci, molekulární genetika se zabývá strukturou a funkcí genů na molekulární úrovni, populační genetika objasňuje dědičnost ve skupinách jedinců a náplní kvantitativní genetiky je studium dědičnosti u znaků podmíněných zároveň mnoha geny.

Genetickým materiálem prokaryot i eukaryot je DNA (deoxyribonukleová kyselina). DNA je také genetickým materiálem u řady virů, které infikují prokaryotické nebo eukaryotické organismy. Jedna skupina virů má genetickou informaci zapsanou do RNA (ribonukleové kyseliny).

Data uložená v nukleové kyselině (DNA nebo RNA) v podobě různé sekvence nukleotidových bází a která se přenášejí z generace na generaci, se nazývají **genetická informace**. Jejím obsahem jsou údaje o primární struktuře proteinů nebo nukleových kyselin (NK).

Veškerá genetická informace zapsaná v NK se nazývá **genom**. Jinými slovy se jedná o kompletní sekvenci NK zahrnující všechny geny (kódující sekvence) i nekódující sekvence. Studium genomů se zabývá obor **genomika**.

Genetický materiál je v buňce organizován do struktur označovaných jako **chromozomy**. Základ chromozomu tvoří nukleová kyselina s lineárně uspořádanými geny a dalšími negenovými úseky nukleotidů. Nukleová kyselina je napojena na proteiny s různou funkcí (histonové a nehistonové).

Chromozomy se ve všech somatických buňkách organismu vyskytují v párech (diploidní počet) a jejich počty se liší mezi druhy. Jeden z páru je vždy zděděn od matky a druhý od otce. V pohlavních buňkách je pak od každého chromozomu pouze jeden (haploidní počet), což zajišťuje při splynutí dvou pohlavních buněk vznik opět diploidního organismu.

Páry chromozomů jsou navzájem homologické - nesou stejné geny.

2.1.1 Gen, lokus, alela

Gen je základní fyzikální a funkční jednotkou dědičnosti nesoucí genetickou informaci. Jedná se o úsek nukleové kyseliny se specifickým pořadím (sekvencí) nukleotidů. Produktem genu může být polypeptidový řetězec nebo molekula RNA. Nukleotidy jsou složeny ze tří částí - cukru (deoxyribóza nebo ribóza), fosfátové skupiny a dusíkaté báze. V případě DNA jsou těmito bázemi adenin, thymin, guanin a cytosin. V RNA je thymin nahrazen uracilem.

Pozice, kterou na chromozomu zaujímá konkrétní gen, se označuje jako **lokus**.

Geny mohou existovat v několika alternativních verzích, které označujeme jako **alely**. Alelou se tedy rozumí konkrétní sekvence NK, která existuje na jednom lokusu a liší se v sekvenci nukleotidů od jiné alely téhož genu. Tyto odlišnosti mohou ovlivňovat funkčnost produktu, jenž je daným genem kódován (RNA nebo proteinu). Různé alely jednoho genu podmiňují rozdílný projev téhož znaku (např. výskyt dvou barev u květů - červené a bílé).

2.1.2 Genotyp a fenotyp

Genotyp je soubor všech alel (forem genů) organismu. **Fenotypem** se rozumí soubor všech pozorovatelných znaků (vlastností) organismu. Na fenotyp nemá vliv pouze genetické založení jedince, důležité jsou také faktory prostředí. Proto dva jedinci shodného genotypu (jednovaječná dvojčata) nemusí být nutně stejného fenotypu.

U homologických chromozomů se mohou v identických lokusech vyskytovat buď shodné, nebo rozdílné alely. Jedinec mající pár identických alel se označuje jako **homozygot**, zatímco pokud jsou tyto alely rozdílné, jedná se o **heterozygota**. Existují-li pro jeden gen 2 různé alely (A , a), pak má homozygot genotyp AA (dominantní homozygot) nebo aa (recesivní homozygot). Heterozygotní jedinec je nositelem obou alel, tedy genotypu Aa . Z toho vyplývá, že pro určitý gen jsou možné 3 různé genotypy (AA , aa , Aa).

2.1.3 Alelické interakce

Dominantní alela je taková, která má efekt na fenotyp nejen v homozygotním, ale také v heterozygotním stavu. Pokud je alela A dominantní nad alelou a , potom jedinci s genotypy AA i Aa budou mít stejný fenotyp.

Recesivní alela má efekt na fenotyp pouze v případě, je-li v homozygotním stavu (*aa*), v heterozygotním stavu se její účinek neprojeví.

Jiná situace nastává u **kodominance**, kdy se ve fenotypu heterozygotního jedince projeví stejnou měrou nezávisle obě přítomné alely (př. krevní skupina AB).

Další možností je **dominance neúplná**, při níž má dominantní alela rozdílné projevy u jedinců s genotypem *AA* a *Aa* (př. *AA* - červená, *aa* - bílá, *Aa* - růžová).

2.1.4 Kvalitativní a kvantitativní znak

Charakteristika organismu, která je podmíněná geneticky a v různé míře ovlivněna prostředím, se označuje jako **znak**. Znaky mohou být dvojího typu. **Kvalitativní znaky** jsou takové, které jsou buď přítomny, nebo nepřítomny. Jejich hodnota se nedá změřit, můžeme je pouze kategorizovat (např. krevní skupiny - A, B, AB, 0). Bývají kódovány jedním nebo několika málo geny s velkým účinkem, tzv. **majorgeny**.

Naopak pro **kvantitativní znaky** je typické, že jejich hodnota je měřitelná (např. tělesná výška) a jsou podmíněny velkým množstvím genů malých účinků, tzv. **minorgenů** (polygenů). Efekty jednotlivých minorgenů a jejich alel se často sčítají, v takovém případě hovoříme o **aditivním efektu**.

2.1.5 Mutace, polymorfismus

Polymorfizmem se rozumí existence dvou nebo více alel v jednom lokusu, přičemž se nejméně častá alela vyskytuje u více než 1% populace. Pokud je frekvence této alely nižší, jedná se o **mutaci**, která v této fázi není v populaci fixovaná a může tudíž vymizet. Podstatou mutací jsou změny v nukleotidové sekvenci genu. Tyto změny se většinou v dalších generacích ztrácí díky přírodní selekci, některé z nich se však mohou zafixovat a rozšířit v populaci v podobě polymorfizmu. Velký význam pro výzkum v genetice mají tzv. jednonukleotidové polymorfizmy (často označované jako SNP, z angl. single nucleotide polymorphism). Vyskytují se roztroušeně po celém genomu ve vysoké frekvenci a slouží jako molekulární markery při asociačních studiích, jejichž cílem je zjištění, zda je genetická variace spojena s onemocněním nebo s projevem určitého znaku. Hustota SNP se může lišit dle konkrétní části

genomu (častější jsou v nekódujících oblastech, než v oblastech kódujících) a dle druhu zvířete, v průměru se však vyskytuje přibližně 1 SNP na 1 000 nukleotidů.

Meióza je redukční (zrací) dělení jádra eukaryotické buňky. Dochází k ní při tvorbě gamet a jejím výsledkem je haploidní počet chromozomů v buňce. Po předcházejícím jediném zdvojení chromozomů mateřské buňky se uskuteční dvě dělení, čímž se původní diploidní počet chromozomů v jádře redukuje na polovinu. Z jedné buňky s diploidním jádrem (somatické) vzniknou meiózou čtyři buňky s jádrem haploidním (pohlavní).

Jako **mitóza** se označuje jaderné dělení eukaryotické buňky, které zabezpečuje kvalitativně rovnoměrné rozdělení genetického materiálu jádra dělící se buňky do jader dvou nově vzniklých buněk. K mitóze dochází po zdvojení počtu chromozomů v interfázi buněčného cyklu. Původní počet chromozomů se po mitóze nemění, z jedné mateřské buňky vznikají dvě totožné buňky dceřiné (pokud nedojde ke genové mutaci).

2.1.6 Exprese genu

Při **expresi genu** z genetické informace zakódované v DNA vzniká produkt, nejčastěji protein, případně funkční RNA (tRNA, snRNA - viz dále). Úseky DNA, ve kterých není zapsána informace pro vznik proteinu, jsou označovány jako nekódující a jejich funkcí je často regulace procesu exprese genů.

Centrální (ústřední) dogma molekulární biologie popisuje cestu genetické informace (exprese genu), tedy tok informace od sekvence DNA po vznik proteinu. Tento proces zahrnuje dva hlavní kroky: transkripci a translaci.

Při **transkripci** dochází k přepisu DNA sekvence do RNA pomocí enzymu RNA polymerázy. Tento proces probíhá v jádře buňky a je nesymetrický. Dochází k přepisu pouze jednoho - templátového vlákna, a to ve směru od 5' konce ke 3' konci. U eukaryot nejprve vzniká primární traskript (hnRNA, heterogenní nukleární RNA), který podléhá posttranskripčním úpravám. Tím se z něho stává zralá mRNA připravená vstoupit do dalšího kroku.

Během **translace** je sekvence mRNA (genetický kód) dekodovaná za pomoci transferové RNA (tRNA) a přeložena do "jiného jazyka", kterým je sekvence aminokyselinová. Dochází k ní na ribosomech, jejichž důležitou součástí je ribozomální RNA (rRNA). Po translaci dochází k řadě potranslačních modifikací, které jsou podmínkou funkčnosti vzniklého proteinu.

Exprese protein kódujícího genu tedy probíhá následovně:

DNA → RNA → protein.

Genů, které kódují proteiny je v typickém savčím genomu přibližně 22 tisíc, což je jen o málo víc než 1% z celkové velikosti genomu. Řada dalších sekvencí genomu se přepisuje do různých typů RNA, avšak nepřekládá se do proteinu. Kromě molekul RNA účastnících se procesů transkripce, sestřihu a translace tak vznikají i molekuly schopné regulovat expresi jiných částí genomu, včetně protein kódujících genů.

2.2 Genom, gen a jejich změny

2.2.1 Genom

Genom je kompletní genetická informace konkrétního organismu, uložená v sekvencích nukleových kyselin. Zahrnuje nejen všechny geny (tj. kódující sekvence), ale také sekvence nekódující.

Genetická informace může být v genomu zapsána v podobě dvou typů nukleových kyselin - RNA (pouze u některých virů) nebo DNA (u ostatních organismů). RNA se vyskytuje i v prokaryotických a eukaryotických buňkách, u nichž není nositelkou vlastní genetické informace, má zde však jiné důležité funkce, podle kterých rozlišujeme několik typů RNA. Mezi základní typy RNA patří mRNA, tRNA a rRNA.

- **mediátorová RNA (mRNA)** je jednořetězcová molekula vznikající během transkripce DNA. Slouží jako předpis pro tvorbu bílkoviny na základě genetické informace přepsané podle genetického kódu.
- **transferová RNA (tRNA)** je důležitým článkem v procesu translace, kdy se zásadním způsobem podílí na tvorbě proteinů. Rozpoznává sekvence tří po sobě jdoucích nukleotidů (tzv. kodonů) v řetězci mRNA, na základě kterých připojuje specifické aminokyseliny do prodlužujícího se polypeptidového řetězce. Tím tedy dochází k překladu sekvence nukleotidů v NK do sekvence AMK v proteinech.
- **ribozomální RNA (rRNA)** je součástí ribosomů, organel nezbytných pro proteosyntézu u všech živých organismů.

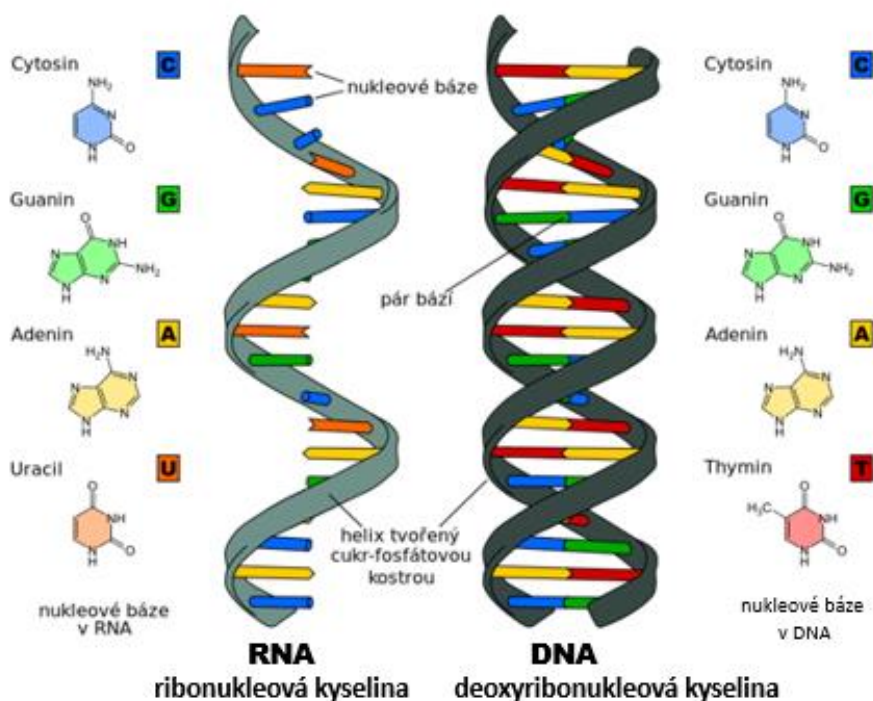
Další typy RNA mají regulační funkce v procesu genové exprese (např. miRNA, siRNA, lncRNA) nebo při posttranskripčních úpravách mRNA (snRNA).

2.2.1.1 *Struktura NK*

DNA i RNA jsou polymery - dlouhé molekuly sestávající z mnoha menších podjednotek, monomerů. V případě nukleových kyselin se tyto monomery nazývají nukleotidy. Každý nukleotid má 3 složky: pentózu (pětiuhlíkatý cukr), dusíkatou bázi a fosfátovou skupinu. Pentózou v DNA je vždy deoxyribóza, kdežto u RNA se jedná o ribózu. Dusíkaté báze existují dvojího typu. První skupinou jsou báze devítičlenné, odvozené od purinu, mezi které se řadí adenin a guanin. Ostatní báze, tedy thymin, cytosin a uracil, jsou šestičlenné a odvozené od pyrimidinu. Oba typy nukleových kyselin obsahují adenin, guanin a cytosin; avšak thymin nalezneme pouze v DNA a naopak uracil je charakteristický pro RNA. Cukr a báze společně tvoří nukleosid. Připojením fosfátové skupiny k nukleosidu vzniká nukleotid (nukleosidfosfát). Formování polynukleotidů je zajištěno pomocí fosfodiesterových vazeb vznikajících mezi fosfátovou skupinou jednoho nukleotidu a cukrem nukleotidu druhého. Tyto vazby jsou poměrně silné a díky nim je cukr-fosfátová kostra nukleových kyselin stabilní.

Prostorová konformace DNA byla objevena v roce 1953 Watsonem a Crickem. Jedná se o pravotočivou dvoušroubovici, v níž se na povrchu obtáčí pentózo-fosfátová kostra a báze směřují do jejího středu (viz obr. 1). Báze jednoho řetězce se na základě komplementarity párují vodíkovými vazbami se svými dvojicemi na řetězci protilehlém. Adenin se páruje s thyminem dvěma vazbami a cytosin s guaninem třemi vazbami (vždy se tedy páruje purin s pyrimidinem). Konce řetězce DNA nejsou na obou stranách stejné, ale mají tzv. 5' konec (s fosfátovou skupinou) a 3' konec (s hydroxylovou skupinou). Tato asymetrie se označuje jako polarita řetězce.

Struktura molekuly RNA je shodná, jako v případě DNA, většinou se však vyskytuje v jednořetězcové formě. U některých RNA virů se nachází i v dvouřetězcové konformaci podobné DNA - s antiparalelními (protisměrně orientovanými) vlákny, cukr-fosfátovou kostrou vně a komplementárními bázemi pojíci se vodíkovými vazbami uvnitř molekuly. Adenin se v případě RNA páruje s uracilem namísto thyminu.



Převzato a upraveno - © User:Sponk / Wikimedia Commons / CC-BY-SA-3.0

Obr. 1: Prostorová konformace řetězce RNA a DNA (Wikimedia Commons, převzato a upraveno)

2.2.1.2 Struktura genomu

Genom je tvořen různými oblastmi s rozdílným posláním. Ty sekvence, které nesou instrukce pro tvorbu proteinů, se nazývají kódující. Poměr mezi kódujícími a nekódujícími sekvencemi se značně liší u jednotlivých druhů. Větší genom nemusí nezbytně obsahovat větší počet genů, příčinou může být právě větší podíl nekódujících sekvencí. Mezi nekódující sekvence řadíme introny, sekvence pro nekódující RNA, regulační oblasti a repetitivní DNA (tandemové a rozptýlené repetitivní DNA).

Genom virů je tvořen buď RNA nebo DNA. V případě RNA virů dále rozlišujeme, zda je RNA jednovláknitá nebo dvouvláknitá. Stejně tak DNA viry mohou mít NK ve formě jednovláknité nebo dvouvláknité. Většina genomů DNA virů je tvořena jednou lineární molekulou, ale některé mohou mít podobu cirkulární.

U prokaryot je genom tvořen vždy DNA. Obvykle má chromozom podobu kružnicové molekuly DNA uložené volně v cytoplasmě v oblasti označované jako nukleoid (archea, většina

bakterií). Některé bakterie však mohou mít chromozom lineární, případně jich mohou mít i více. Část bakterií má přídatnou genetickou informaci uloženou v plazmidech (kružnicová molekula DNA).

Genom eukaryot má stejně jako u prokaryot vždy podobu DNA a je rozdělen do různého, druhově specifického, počtu lineárních chromozomů nacházejících se v jádře ohraničeném jadernou membránou. Kromě tohoto jaderného genomu u eukaryot rozlišujeme dále mitochondriální (u živočichů) a chloroplastový (u rostlin) genom. Některá eukaryota mohou mít také plazmidy (např. kvasinky).

2.2.1.3 Chromozomy

Chromozomy jsou specifické buněčné struktury nacházející se u eukaryot v jádře a nesoucí genetickou informaci. Studium chromozomů se zabývá obor cytogenetika.

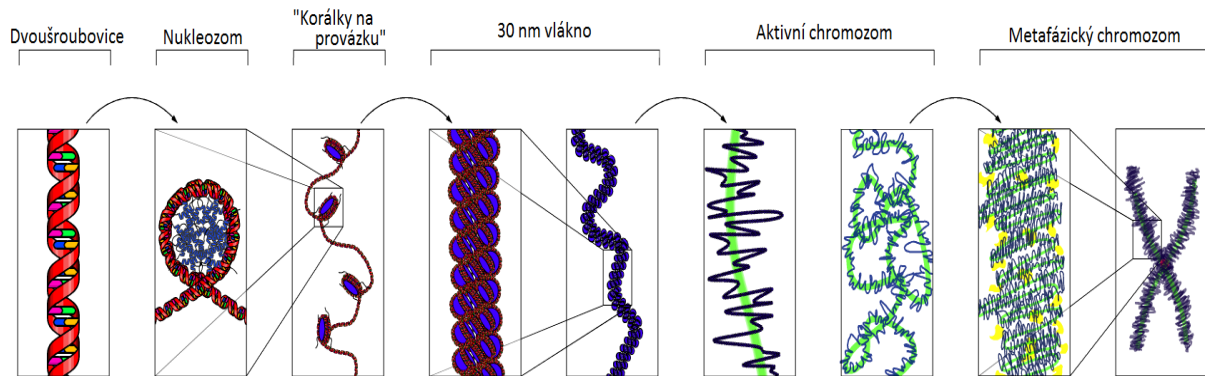
Chromozomy jsou tvořeny molekulou DNA, která vytváří komplex s dvěma typy proteinů - histony a nehistonovými chromozomovými proteiny. Jako chromatin se označuje barvitelný materiál v buněčném jádře, tedy DNA a proteiny.

Nejvyšší zastoupení mezi proteiny chromozomů mají histony. Rozlišujeme 5 typů histonů - H1, H2A, H2B, H3 a H4. Jejich aminokyselinové sekvence jsou vysoce evolučně konzervovány (jsou si velmi podobné napříč druhy), což je indikátorem jejich stejné základní úlohy při organizaci DNA v chromozomech u všech eukaryot. Mají zásadní vliv na sbalování chromatinu, bez kterého by DNA jedné diploidní buňky člověka byla dlouhá přibližně 2 m. Víceúrovňové sbalování umožňuje lokalizaci DNA do tak malého prostoru, jako je jádro buňky s pouhými několika mikrometry průměru.

Kromě histonů jsou s DNA asociovány také nehistonové proteiny. Tyto se na rozdíl od histonů velmi liší mezi organismy i mezi jednotlivými typy buněk v rámci jednoho organismu. Patří mezi ně například proteiny vázající se na DNA, které mají funkci při replikaci DNA, opravách DNA, transkripci nebo rekombinaci.

Základní jednotkou jsou nukleozomy, tvořené jádrem z 8 histonů ($2 \times$ každý z typů H2A, H2B, H3 a H4), kolem kterých se omotává DNA o délce 147 párů bází. Nukleozomy mají průměr kolem 11 nm a svým uspořádáním připomínají korálky na provázku (viz obr. 2). Jednotlivé nukleotidy odděluje spojovací DNA o různé délce - tzv. spojovníky (u člověka 38 - 53 párů bází). Tato první úroveň sbalování se také označuje jako 11 - nm chromatinové vlákno.

Další úroveň sbalování chromatinu je umožněna histonem H1, který se váže zároveň na spojovací DNA a DNA obtáčeující nukleozom, čímž jednotlivé nukleozomy přibližuje k sobě do struktury nazývané 30 - nm chromatinové vlákno.



Převzato a upraveno - © Richard Wheeler / Wikimedia Commons / CC-BY-SA-3.0

Obr. 2: Sbalování chromatinu (Wikimedia Commons, převzato a upraveno)

Následně z 30 - nm vlákna vznikají smyčky o délce 300 nm, které jsou stlačeny k sobě a vytváří kondenzované hrudkovité nebo diskovité útvary - chromomery. Na tvorbě smyček a uzlů se podílejí nehistonové proteiny tvořící tzv. lešení. Výsledkem všech stupňů svinování jsou chromatidy.

Stupeň sbalení DNA se mění v průběhu buněčného cyklu. Nejvíce rozvolněná je před začátkem duplikace (S fáze) a nejvíce kondenzovaná během mitózy a meiózy. Historicky se rozlišují dvě formy chromatinu na základě jejich barvitelnosti.

Euchromatin jsou části chromozomů vykazující normální průběh buněčného cyklu, tedy střídání kondenzace a dekonenzace. Většina genomu aktivních buněk je euchromatická a intenzita barvení se mění od nejtmaší během mitózy k nejsvětější v S fázi. Struktura euchromatinu umožňuje přístup jiných molekul a tudíž expresi dané části genomu a její regulaci. Geny lokalizované v euchromatinu jsou tedy aktivně transkribovány, tedy dochází k jejich expresi.

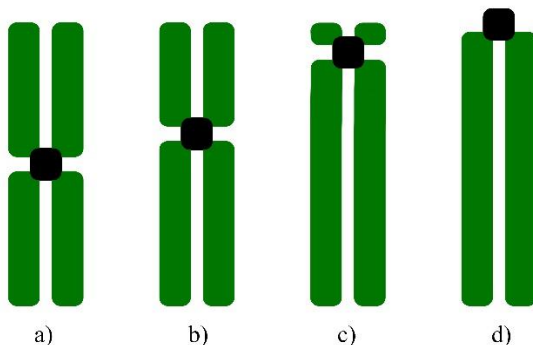
Heterochromatin naopak zůstává většinu času kondenzovaný a barví se velmi tmavě v průběhu celého buněčného cyklu. Struktura heterochromatinu neumožňuje expresi dané části genomu. Geny nacházející se v těchto částech genomu jsou tedy transkripčně inaktivní, nejsou exprimovány. Rozeznáváme dva typy heterochromatinu. Konstitutivní se pravidelně vyskytuje v oblastech telomer a centromer chromozomů a je trvale transkripčně inaktivní. Fakultativní

heterochromatin je kondenzován dočasně a v závislosti na typu buňky může přecházet na euchromatin. Vyskytuje se například v chromozomu X u savců.

Morfologie (tvar) chromozomu je nejlépe pozorovatelná ve stadiu metafáze, kdy je chromatin nejvíce nahuštěn. V metafázi je chromozom pentlicovitý útvar tvořený dvěma sesterskými chromatidami, což jsou dvě lineární molekuly DNA spojené centromerou. Místo polohy centromery bývá zúžené, tzv. primární konstriktce, kterou je chromozom rozdělen na 2 ramena - krátké (značí se p) a dlouhé (q). U některých druhů chromozomů se vyskytuje ještě tzv. sekundární konstriktce, která odděluje z ramen satelit. Koncové části chromozomů se označují jako telomery a mají důležitou úlohu v procesu stárnutí buněk. Centromera a telomery mají pouze strukturní funkci a neobsahují geny.

Umístění centromery se liší u jednotlivých chromozomů, je pro ně charakteristické. Na základě lokalizace centromery a délky ramen (obr. 3) chromozomy dělíme na:

- a) metacentrické - centromera se nachází uprostřed, obě ramena mají přibližně stejně dlouhá
- b) submetacentrické - centromera posunuta k jednomu konci, mají jedno rameno kratší (p), ale jeho délka je větší, než 1/2 ramene q
- c) akrocentrické - centromera se nachází za 3/4 délky, jedno rameno je výrazně kratší, než druhé
- d) telocentrické - centromera je lokalizována na konci chromozomu, který má pouze dlouhé rameno



Obr. 3: Chromozomy dle umístění centromery

Párové chromozomy přítomné v somatických buňkách nezávisle na pohlaví se nazývají **autozomy**. Jeden pár chromozomů pak u druhů s odděleným pohlavím sestává z tzv. **gonozomů** (heterochromozomů) a liší se dle pohlaví. U savců je gonozom charakteristický pro samčí pohlaví značen symbolem Y, u samic se tento nevyskytuje. Druhý z gonozomů se označuje symbolem X. Samičí pohlaví je tedy určeno párem gonozomů XX, samčí gonozomy XY. V porovnání s chromozomem X má chromozom Y výrazně odlišnou morfologii, například u

člověka je mnohem menší. U ptáků je determinace pohlaví jiná, samec vzniká, pokud se setkají dva shodné chromozomy, značené zde jako ZZ. Samice jsou pak nositelkami po jednom ze dvou typů pohlavních chromozomů - ZW. Gonozomy obsahují jen malé množství genetického materiálu, obecně se jedná jen o krátké segmenty v blízkosti jejich konců.

Počty chromozomů jsou stejně jako jejich tvar a velikost druhově specifické a nejsou závislé na velikosti organismu ani na jeho evoluční vyspělosti. Většina tělních buněk daného druhu obsahuje dvojnásobek základního chromozomového čísla ($2n$). Např. u člověka je základní chromozomové číslo 23 (n) a tento počet se nachází ve zralých pohlavních buňkách (gametách). V některých případech se můžeme setkat i se čtyřnásobným množstvím chromozomů, $4n$ (např. buňky jater).

Sadu chromozomů většiny somatických buněk označujeme tedy jako diploidní ($2n$), kdežto v pohlavních buňkách je jejich počet redukovaný na haploidní (n). Buňky se čtyřmi kopiemi identických chromozomů jsou tetraploidní ($4n$).

Dvojice chromozomů (jeden otcovského a druhý mateřského původu) nesoucí shodné geny, mající stejný tvar a velikost, se označují jako homologické. Soubor všech chromozomů v jádře tvoří **karyotyp**.

2.2.2 Gen

Lidský genom je tvořen třemi miliardami párů bází, z nichž pouze 1,5 % kóduje DNA potřebnou pro syntézu proteinů nebo různých typů RNA. Jako gen označujeme úsek DNA (sekvenci nukleotidů) na chromozomu, který je dále přepisován do RNA. Jedná se o základní jednotku genetické informace. Rozlišujeme následující typy genů podle jejich funkce:

- *strukturní geny* - obsahují jedinečné sekvence nukleotidů, které nesou informaci o primární struktuře polypeptidových řetězců;
- *geny pro RNA* - kódují ribonukleové kyseliny, které mají významnou roli v procesu translace (rRNA, tRNA), ale samy se do proteinů nepřekládají;
- *regulační geny* - jejich funkcí je regulace genové exprese, mohou kódovat transkripční faktory nebo působit na úrovni RNA (např. miRNA);
- *pseudogeny* - mají podobnou strukturu jako geny strukturní, avšak v průběhu vývoje ztratily svou funkci, nejsou tedy exprimované.

Pro transkripci je zásadní oblast genu označovaná jako promotor. Ten zajišťuje uchycení RNA polymerázy a značného množství transkripčních faktorů rozhodujících o tom, zda gen bude přepisován či nikoli. Regulační sekvence ovlivňující průběh transkripce mohou být v těsné blízkosti přepisovaného úseku, jako je tomu v případě promotoru nebo mohou být odděleny mnoha kilobázi (enhancery, silencers). Promotor je lokalizován na 5' konci a transkripce od něho probíhá ve směru od 5' konce ke 3' konci. V oblasti promotoru jsou u bakterií i eukaryot přítomny dvě evolučně konzervované sekvence regulující intenzitu transkripce - tzv. TATA box a CAT box. Za promotorem se nachází 5' UTR (nepřekládaná oblast, z angl. untranslated region), která může obsahovat další významné regulační oblasti. Bezprostředně za 5' UTR začíná vlastní transkripční jednotka start kodonem a dále se v ní nachází informace určená pro přepis do hnRNA (primárního transkriptu). Transkripční jednotka je tvořena střídavě introny a exony a po sestřihu se z ní stává mRNA. Na samotném konci překládaného úseku se nachází stop kodon následovaný 3' UTR - další nepřekládanou regulační oblastí obsahující terminační sekvenci, která značí konec transkripce a uvolňuje RNA polymerázu.

2.2.2.1 Eukaryotické vs. prokaryotické geny

Zásadně odlišným znakem je u eukaryot členění genu na exony a introny. Exony jsou ve stejné podobě jako v templátové DNA přítomny i ve zralé mRNA, zatímco introny jsou odstraněny (vystřiženy) během posttranskripčních úprav. Po vystřižení intronů se sousedící exony spojují a vytváří souvislou protein kódující sekvenci bez možnosti rozlišení hranic původních exonů. Další posttranskripční úpravou je přidání 5' čepičky na začátek mRNA a poly-A konce na její 3' konec. Tyto sekvence stabilizují mRNA a řídí její transport z jádra do cytoplazmy.

Uspořádání prokaryotických genů je odlišné. Nejmarkantnějším rozdílem je, že kódující sekvence pro jednotlivé geny jsou seskupeny do polycistronického operonu, jsou kontrolovány společnými regulačními sekvencemi a přepisují se do jediné mRNA. Operátor ležící vedle promotoru je u prokaryot hlavním regulačním elementem. Mohou se na něj vázat represorové proteiny znemožňující vazbu RNA polymerázy, čímž se blokuje transkripce. Introny jsou u prokaryot velmi vzácné.

2.2.2.2 *Metody identifikace genů*

a) **hybridologická analýza (*in vivo*)**

Jedná se o historicky nejstarší metodu identifikace genů využívající mendelistických principů. Až do 70. let 20. století byla hybridologická analýza jedinou metodou, jak dokázat existenci genu. Princip je založen na analýze výsledků křížení živých organismů. Dle výskytu znaku a poměru fenotypů v potomstvu můžeme vyvodit, zda je znak dědičný, kolika znaky je podmíněn a o jaký se jedná způsob dědičnosti. Například pokud pozorujeme u potomstva fenotypový projev znaku ve štěpném poměru 3:1, je pravděpodobné, že znak je založen jedním genem, má 2 alely, jedna z nich je dominantní a jedna recesivní, jsou možné 3 genotypy a 2 fenotypy, gen je lokalizován na autozomech. Tato metoda však platí pouze za velmi dobře definovaných podmínek a především pro znaky kvalitativní, které jsou založeny jedním nebo několika málo geny. Hybridologická analýza se přes velký pokrok v metodách identifikace genů používá dodnes jako doplňková metoda, kdy pouze po uskutečnění této analýzy je jisté, že gen segreguje a můžeme tak potvrdit jeho existenci. Při této metodě identifikace genu postupujeme ve směru od fenotypu ke genu.

b) **molekulární analýza (*in vitro*)**

Od doby zjištění, že nositelkou genetické informace nejsou proteiny, ale molekula DNA, začaly snahy o jinou identifikaci genů - průkazem jeho sekvence v genomu. Pomocí molekulárních metod je možné stanovit asociace mezi určitým znakem (fenotypem) a konkrétní sekvencí, třeba i dosud neznámou. Další možností je zkoumání efektů známé sekvence (genu) na fenotypový projev (např. cílenou mutagenezí, umlčováním genů RNA interferencí nebo knockaut genu). Tomuto přístupu se také říká reverzní genetika, tedy od sekvence DNA k fenotypu.

c) **počítačová analýza (*in silico*)**

Nejmodernější metodou jsou postupy identifikace genů pomocí bioinformatických technologií. Tyto přístupy využívají poznatky komparativní genomiky studující podobnost genů u různých více či méně evolučně příbuzných druhů. Je-li u určitého genu známa sekvence a umístění v

genomu například laboratorní myši, je možné na principu jejich podobnosti pomocí počítačových programů na prohledávání genomů tento stejný gen nalézt u jiného druhu. Podmínkou je dostupná kompletní genomová sekvence obou srovnávaných druhů. Geny identifikované *in silico* jsou vždy pouze předpověděné („predicted“); pro potvrzení jejich existence je nutné provedení analýz jinými metodami.

2.2.3 Mutace

Mutace je proces, kterým dochází ke změně určité sekvence DNA (genotypu) nebo karyotypu. Tato změna není způsobena segregací ani rekombinací. Buňka, případně jedinec, u kterého mutace nastala, se nazývá **mutant**. Pokud se jedná o somatickou buňku, pak se tato mutace označuje jako somatická. Ovlivňuje pouze daného jedince a není přenášena na potomky. Pokud však dojde k mutaci u buňky zárodečné linie, může být prostřednictvím gamety předána do další generace. Tyto změny nazýváme gametickými (zárodečnými) mutacemi.

Z hlediska kvantifikace mutačního procesu rozlišujeme dva různé termíny. Jako **mutační rychlost** se označuje pravděpodobnost výskytu určitého typu mutace za časovou jednotku, např. počet mutací na nukleotidový pár/gen za jednu generaci. **Frekvence mutací** je počet mutací vyjádřený proporčně ve vztahu k množství buněk/jedinců v populaci, např. počet mutací na 100 000 organismů nebo počet mutací na 1 milion gamet.

Příčin vzniku mutací je velké množství a prokázat původ konkrétní mutační události bývá velmi obtížné až nemožné.

Pokud vzniknou bez zjevné vnější příčiny, mluvíme o tzv. **spontánních mutacích**. Mohou být skutečně spontánní, tedy objevit se v důsledku poruch během replikace DNA nebo mohou být vyvolány neznámou látkou přítomnou v prostředí. Spontánní mutace se vyskytují sporadicky a jejich četnosti se liší gen od genu a mezi jednotlivými organismy.

Druhou kategorií jsou **mutace indukované**, které vznikají po vystavení organismu určitým fyzikálním, biologickým či chemickým faktorům vyvolávajícím změny v DNA. Mezi tyto tzv. mutageny se řadí například ionizující a ultrafialové záření, virové infekce, z chemikálií například tzv. analogy bází, kyselina dusitá, akridin nebo ethidium bromid. Působením mutagenů se četnosti výskytu mutací mnohonásobně zvyšují.

2.2.3.1 Molekulární podstata mutací

Změny DNA mohou postihnout různě velké části genomu. Pokud se vzniklé mutace v populaci udrží a postupně rozšíří ve frekvenci alespoň 1 %, hovoříme o **polymorfizmu**. Jako **substituce** se označuje záměna jediného nukleotidu a může být dvojího typu. Pokud se na místo původního purinového nukleotidu začlení jiný purinový, jedná se o **tranzici**. Je-li však purinový nukleotid zaměněn za pyrimidinový, označujeme takovouto mutaci jako **transverzi**. Substituce dávají vznik tzv. jednonukleotidovému polymorfizmu (single nucleotide polymorphism, SNP). Dalšími typy mutací jsou **inzerce** a **delece**. Polymorfizmy, které vznikají díky těmto mutacím, se souhrnně označují jako indely. V tomto případě nedochází u nukleotidu k jeho výměně, ale do původního řetězce se buď včlení nový nukleotid (jeden či více), případně se z něho naopak ztratí. Nejedná-li se o sekvenci délky 3 nukleotidů nebo násobku 3, dochází k posunu čtecího rámce. Proto se takové mutace označují jako posunové. Dle efektu, který jednonukleotidové mutace mají na AMK sekvence a výsledný protein, rozlišujeme mutace na **tiché** (beze změny smyslu), u kterých mutace nemá vliv na začleněnou aminokyselinu (vzniká jiný kodon, ale tento kóduje stejnou AMK), **missense** (se změnou smyslu), kdy je zařazena do řetězce AMK jiná, než původní a **nonsense** (nesmyslné). U nonsense mutací vzniká místo další AMK terminační kodon ukončující transkripci, tím se řetězec zkracuje a výsledný fragment polypeptidu je obvykle nefunkční.

Mutace mohou být také způsobeny zvláštními elementy DNA, které se dokáží přemísťovat v rámci genomu. Tyto tzv. **transpozony** při začlenění do genu často způsobí jeho nefunkčnost. Další možností změny v DNA jsou **expanze trinukleotidových repetit**. Jedná se o sekvence, které jsou normálně rozptýleny po celém genomu, avšak pokud dojde ke zvýšení jejich počtu (expanzi), mohou vyústit v závažné choroby.

2.2.3.2 Chromozomové aberace

Všechny dosud zmíněné typy mutací mají vliv na jediný gen, mluvíme o nich tedy jako o **genových mutacích**. Může však nastat situace, kdy je změna mnohem rozsáhlejší, a to na úrovni celého chromozomu. Chromozomovými aberacemi se rozumí změny ve struktuře nebo počtu jednotlivých chromozomů. Stejně jako v případě genových mutací k nim může docházet spontánně nebo indukci mutagenními faktory.

Strukturní aberace mohou mít různé podoby. K **delec** dochází v případě ztráty části chromozomu, **duplikace** je naopak dvojení určitého úseku. Termín **inverze** označuje stav, kdy

má část chromozomu opačnou orientaci, než je obvyklé a **translokace** je přemístění celého segmentu chromozomu na jiné místo. Při **reciproké translokaci** se jedná o vzájemnou výměnu mezi dvěma nehomologními chromozomy, počty chromozomů však zůstávají nezměněné. Zvláštním případem translokace je tzv. **Robertsonova translokace**, kdy dochází k fúzi dvou akrocentrických chromozomů v jeden. Postižený jedinec má potom o jeden chromozom méně, ale množství genetické informace je stále stejné. Dalším typ aberace se označuje jako **izochromozom**. Tato situace vzniká chybným rozestupem chromozomů při mitóze, kdy nedojde k rozdělení chromatid, ale do jedné dceřiné buňky se dostanou obě krátká raménka a do druhé buňky obě raménka dlouhá. Pokud dojde u chromozomu k delecí obou telomer, mohou se jeho koncové části spojit a vytvořit kruh, tzv. **ringchromozom**. Za krajní případ chromozomové aberace považujeme **fragmentaci**, při které vlivem velmi silných mutagenů nastane rozpad chromozomu na fragmenty.

Z numerických aberací jsou u zvířat nejvýznamnější situace, kdy chybí nebo naopak přebývá pouze jeden chromozom ze sady, tzv. **aneuploidie**. V diploidní buňce je normálním stavem dizomie, pokud jeden chromozom chybí, jedná se o monozomii a pokud je navíc, hovoříme o trizomii. Tyto abnormality vznikají díky chybě rozestupu chromozomů při buněčném dělení, tzv. nondisjunkci.

2.2.3.3 Genomové mutace

Chromozomy mohou kromě změněné struktury vykazovat také změny počtu celých sad chromozomů. Jsou to nejrozsáhlejší typy mutací zasahující celý genom, označují se proto jako **genomové mutace**. Je-li znásoben počet celé chromozomální sady, nazýváme tento stav **polyploidie**. Za normálních okolností jsou vyšší organismy diploidní ($2n$), polyploidní jedinec může být triploidní ($3n$), tetraploidní ($4n$) nebo mít i více sad. U většiny vyšších živočichů a člověka jsou tyto stavy neslučitelné se životem.

3. Základy genetiky šlechtění domácích zvířat

3.1 Genetika kvantitativního znaku

3.1.1 Charakteristika kvantitativního znaku

Většina vlastností, na které je zaměřena pozornost v chovech zvířat, jsou znaky kvantitativní (užitkovost, sportovní výkonnost, znaky chování atd.). Kvantitativní znak je geneticky determinován polygenně, tj. na jeho vzniku se podílí mnoho genů zejména malého účinku a je ovlivňován prostředím. Geny podílející se na tvorbě kvantitativního znaku mohou ležet na různých chromozomech a nazýváme je lokusy kvantitativních znaků (QTL). Charakteristickým znakem jejich působení je aditivita – sčítání účinků jednotlivých aktivních alel ve všech lokusech podílejících se na kvantitě daného znaku. Kvantitativní znak nemá obvykle diskrétní proměnlivost (jasně vymezené třídy fenotypů) s výjimkou prahových znaků (viz kap. Nemendelistická dědičnost). Díky mnoha genům a vlivu prostředí, vzniká i mnoho fenotypů a proměnlivost je kontinuální (nelze rozlišit třídy fenotypů). Jedná se většinou o měřitelné vlastnosti, které vykazují nejčastěji rozdělení četností podle **Gaussovy křivky** – nejvíce je průměrných hodnot, směrem k extrémům se jejich četnost snižuje.

3.1.2 Principy hodnocení kvantitativního znaku

Při hodnocení kvantitativních znaků a studiu jejich dědičnosti se prvotně zaměřujeme na jejich proměnlivost a používáme k tomu statistické metody. Výchozím bodem je vždy měření znaku a vyšetření souborů zvířat. Základními charakteristikami kvantitativního znaku jsou průměr, variance a směrodatná odchylka.

Aritmetický průměr (\bar{x}) souboru dává informaci o tom, kde se nachází střední hodnota souboru, ale nevyjadřuje proměnlivost souboru.

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum(x_i)}{n}$$

kde x_1 – první hodnota souboru, x_2 – druhá hodnota souboru, x_n – n-tá hodnota souboru, n – počet hodnot

Variance (V) vyjadřuje vnitřní proměnlivost souboru. Je významná pro rozlišení souborů, které mají stejný aritmetický průměr, ale různé rozdělení jednotlivých variant znaku mezi jedinci. Určuje se následujícím způsobem:

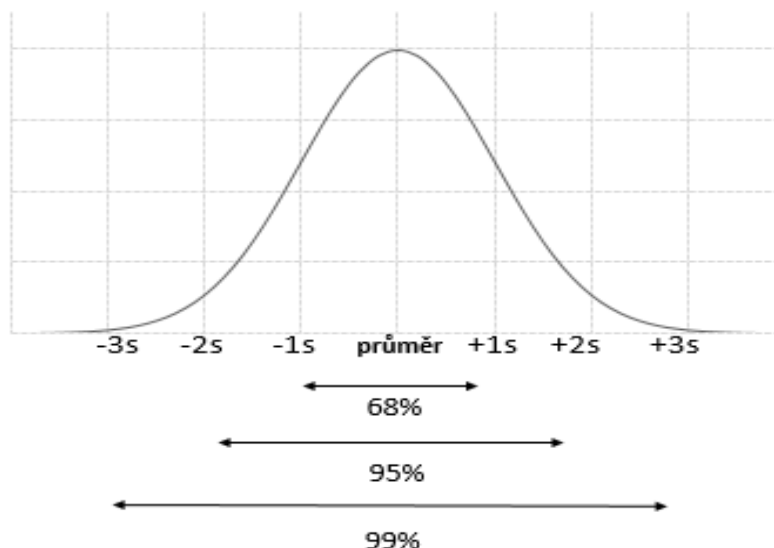
$$V(x) = \frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}$$

kde V = průměrná vzdálenost každé hodnoty sledovaného souboru od průměru tohoto souboru, x_1 – první hodnota souboru, x_2 – druhá hodnota souboru, x_n – n-tá hodnota souboru, \bar{x} – průměr souboru, n – počet hodnot

Pro snadnější orientaci v proměnlivosti souboru se používá **směrodatná odchylka (σ, s)**, která je odmocninou variance a na rozdíl od variance je vyjádřena v jednotkách, ve kterých je měřen kvantitativní znak:

$$s = \sqrt{V(x)}$$

Křivka normální distribuce fenotypů kvantitativního znaku je znázorněna na obrázku 4. Maximum křivky je rovno průměrné hodnotě, zároveň platí, že 68 % hodnot se nachází v intervalu ± 1 , 95 % v intervalu ± 2 a 99 % v rozmezí ± 3 směrodatné odchylky.



Obr. 4: Křivka normální distribuce fenotypů kvantitativního znaku

Příklad: Průměrná hodnota mléčné užitkovosti je 10 000 kg za laktaci. Směrodatná odchylka tohoto znaku u sledovaného souboru je 1 500 kg. 99 % všech hodnot ($\pm 3s$) produkce mléka bude tedy v intervalu 5 500 – 14 500 kg.

3.1.3 Složky fenotypové variance

Při sledování dědičnosti kvantitativní znaku tedy vždy vycházíme ze souboru hodnocených jedinců, na kterém lze popsat fenotypovou variabilitu. Pozorovaná proměnlivost kvantitativního znaku mezi těmito jedinci může mít různé příčiny, genetické i negenetické. Jejich vzájemné podíly vyjadřujeme jako složky fenotypové variance. Pro dědičnost kvantitativního znaku obecně platí, že fenotyp (P) je podmíněn genotypem (G) a vlivy prostředí (E).

$$P = G + E$$

U populace lze říci, že celková variance kvantitativního znaku (V_P) se skládá z variance podmíněné genetickým základem (V_G) a z variance dané prostředím (V_E).

$$V_P = V_G + V_E$$

Geneticky podmíněnou varianci můžeme dále rozdělit na složku vyvolanou aditivním působením genů V_A (variance daná různým počtem aktivních alel v polygenech), složku způsobenou dominancí V_D (geny velkého účinku) a složku vznikající na základě genových interakcí V_I :

$$V_G = V_A + V_D + V_I$$

Aditivní genetická variance je příčinou podobnosti mezi příbuznými jedinci a může být přímo odhadována z pozorovaných dat v populaci pomocí statistických metod, které umožňují odfiltrovat z celkové fenotypové variance část negenetickou (analýza variance, lineární modely s pevnými a náhodnými efekty – BLUP, Animal Model).

Variance daná prostředím zahrnuje trvale působící faktory V_{EP} (např. klima) a dočasně působící faktory V_{ET} (havárie, roční období)

$$V_E = V_{EP} + V_{ET}$$

Toto rozdělení umožňuje odhadnout relativní význam jednotlivých složek, které se podílejí na utváření fenotypu kvantitativního znaku. Prostředí nemusí mít na různé genotypy stejný účinek, a proto je nutno brát v úvahu i varianci způsobenou interakcí genotypu a prostředí V_{GE} .

$$V_P = V_G + V_E + V_{GE}$$

Rozdělení pozorované fenotypové variance na jednotlivé složky je prakticky významné, protože různé metody plemenitby využívají různé genetické typy variability (různé složky variance), což se pak odráží v existenci různých typů organizace chovu zvířat. Složky variance se také využívají k vyjádření podílu dědičné složky variability kvantitativního znaku.

3.1.4 Koeficient heritability

Část z celkové fenotypové proměnlivosti znaku, která je podmíněna proměnlivostí genetickou se nazývá **heritabilita (dědivost)** a vyjadřuje se koeficientem heritability

heritabilita v širším smyslu: $h^2 = V_G/V_P$

heritabilita v užším smyslu: $h^2 = V_A/V_P$

Koeficient heritability **neznamena** míru genetického založení vlastnosti u jednotlivce, ale podíl genetické variance souboru zvířat z variance celkové. Jinými slovy koeficient heritability vypovídá o míře genetické variability kvantitativního znaku v celé populaci. Koeficient heritability nabývá hodnot 0-1. Dědivost kvantitativního znaku se odhaduje analýzou podobnosti mezi příbuznými jedinci. Koeficient heritability v užším smyslu je používán v praxi ve šlechtění živočichů i rostlin, protože informuje o tom, jak se potomstvo bude podobat průměru rodičů a umožňuje odhadovat efekt selekce a stanovit způsob selekce. Při vysoké heritabilitě ($h^2 > 0,7$) je možná selekce podle fenotypu, při nízké heritabilitě ($h^2 < 0,3$) nebude fenotypová selekce účinná a je nutno odhadovat plemennou hodnotu (viz kapitola Plemenná hodnota a její odhad).

3.2 Genetické principy selekce a plemenitby

3.2.1 Šlechtění

Od doby, kdy lidé domestikovali první zvířata, se snaží měnit a přizpůsobovat jejich populace svým potřebám. Výsledkem tohoto snažení je dnešní obrovské množství plemen a variant domácích zvířat. V současnosti se tento proces nazývá šlechtění.

Šlechtění je cílevědomý výběr zvířat vedoucí ke genetické fixaci vlastností, které jsou součástí chovatelského cíle. Souhrn požadavků na užitkové, morfologické a další významné znaky u konkrétních druhů, respektive plemen se nazývá **chovný cíl**. Hospodářská zvířata se chovají zejména pro produkci potravin nebo dalších produktů živočišného původu. Jiné druhy zvířat jsou chovány pro účely pracovní, sportovní, vědecké, estetické nebo citové.

Vlastnosti, které jsou součástí chovného cíle, jsou primárně **vlastnosti užitkové**, ale také **znaky zdraví**. Dobrý zdravotní stav je předpokladem realizace chovného cíle, ale je také jeho neoddělitelnou součástí. Pro šlechtění na zdravotní stav platí stejné principy jako pro šlechtění vlastností produkčních. Pozornost je věnována rezistenci vůči onemocněním, výskytu a eliminaci dědičných onemocnění a vrozených vývojových vad či genetickým základům reakce na léčbu. Chovný cíl a všechna opatření k jeho dosažení jsou definována ve **šlechtitelském programu** (obvykle písemný dokument). Podmínky a pravidla pro šlechtění a plemenitbu stanovuje zákon č. 154/2000 Sb. o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat (např. šlechtitelské programy, organizace zahrnuté ve šlechtění, způsoby kontroly užitkovosti, způsoby odhadu PH atd.).

Základním předpokladem šlechtění je variabilita vlastností, na které šlechtíme a její dědičná složka. Šlechtění se skládá ze dvou částí – **selekce** a **plemenitby**.

3.2.2 Selekcce

Při selekci ovlivňujeme výběrem rodičů genetické složení populace v požadovaném směru. Cílem je zvýšení četnosti žádoucích (snížení četnosti nežádoucích) alel podle chovatelského cíle. Pokud dochází k selekci rodičů působením přírodních faktorů, jedná se o selekci přirozenou. Rozhoduje-li o výběru člověk – je to selekce umělá. Při šlechtění domácích zvířat probíhají obě selekce.

3.2.2.1 Typy umělé selekce

Při selekci dochází ke změnám v průměru selektovaného znaku a/nebo ve variabilitě souboru.

Umělou selekci rozlišujeme podle způsobu provádění na selekci:

- **pozitivní** - výběr zvířat k rozmnožování, posouvá se průměr znaku
- **negativní** - vyřazování zvířat z rozmnožování, ozdravení chovu

U každého znaku, který je předmětem selekce se definuje, co je jejím cílem pro tento znak. V rámci **jednoho znaku** můžeme provádět selekci stabilizační, direkcionální, disruptivní.

Selekce

- **direkcionální** - cílem je posun průměru daného znaku u potomků žadáním směrem (selekční efekt) a snížení variability. K dalšímu chovu jsou vybírána zvířata nadprůměrná.
- **stabilizační** – cílem je snížení variability znaku v populaci, při zachování stávajícího průměru. Pro chov jsou vybírána zvířata blízká existujícímu průměru v selektovaném znaku.
- **disruptivní (divergentní)** - znamená výběr zvířat z obou extrémů variability a rozmnožování uvnitř každého extrému odděleně. Cílem je vytvořit z původní jedné populace dvě populace nové. Používá se zejména pro experimentální účely nebo pro tvorbu hmotnostně či velikostně odlišných plemen z plemene původního.

Součástí šlechtitelského cíle je řada znaků, které spolu mohou, i když nemusejí vzájemně souviset (být v korelaci). Je proto možné, že selekce na jeden znak může ovlivnit variabilitu jiného znaku nebo jiných znaků, a to jak v žádoucím tak v nežádoucím smyslu. Proto byly vypracovány selekční postupy, které existující korelace respektují nebo přímo využívají.

Selekce na více znaků může být prováděna více různými postupy.

- **tandemová** - znamená postupnou selekci jednoho znaku za druhým. Problémem je časová náročnost a existence negativních korelací, kdy selekci na další znak se může již dříve zlepšená vlastnost opět zhoršit.
- **podle nezávislých výběrových úrovní** - u každého selektovaného znaku stanovujeme minimální výběrovou hranici. Selektuje se podle více znaků najednou, ale je nutno stanovenou minimální výběrovou hranici všech vlastností dodržet. Jedince s nižší hodnotou znaku z chovu vyřazujeme. V případě stanovení přísných výběrových kritérií se v tomto případě zužuje výběrová základna pro další chov.

- **simultánní (selekční indexy)** - redukuje nevýhody výše zmíněných typů selekcí. Hodnocené znaky jsou posuzovány komplexně, vlastnosti jsou bodově ohodnoceny podle významu a je vytvořen selekční index. U skotu obsahuje v současnosti komplexní selekční index kolem 30 produkčních a funkčních znaků. Tento index slučuje všechny hodnocené znaky v jediný ukazatel – jednu hodnotu. Tento postup je dnes v praxi nejvíce uplatňován, zejména u hospodářských zvířat je klíčovou součástí selekčního procesu a odhadu plemenné hodnoty.

3.2.3 Plemenná hodnota a její odhad

3.2.3.1 Plemenná hodnota

Fenotypová selekce probíhá na základě projevu znaku. Je efektivní pouze v případě, kdy přenos z generace na generaci je pravidelný a předvídatelný (kvalitativní znaky, znaky s vysokou heritabilitou). Většina znaků, na které je selekce zaměřena, jsou však znaky kvantitativní, s nízkou heritabilitou, které jsou ovlivňovány mnoha geny a prostředím a fenotypová selekce je v tomto případě málo účinná. Je nutno pracovat s genotypem a provádět selekci **genotypovou**. Není ovšem možné stanovit komplexní genetické založení kvantitativního znaku. Lze jej ale odhadnout na základě rozdílů v projevu znaků způsobených rozdílnými genotypy. Tento odhad **genetického založení ve znacích, na které se selektuje**, se nazývá odhad **plemenné hodnoty (PH)**.

3.2.3.2 Odhad plemenné hodnoty

Klasická plemenná hodnota

Odhad genetického založení selektovaných jedinců je možný dvěma způsoby. První z nich je založen na využití informací o užitkovosti (fenotypu) testovací skupiny potomků, příbuzných a vlastní užitkovosti (statistický přístup). Na základě informací z výše uvedených zdrojů se z celkové fenotypové variance selektovaného znaku odhaduje variance genetická odfiltrováním negenetických vlivů pokročilými statistickými metodami (analýza variance, metody BLUP – Best Linear Unbiased Prediction, Animal Model). PH se dá pro jednotlivé znaky vyjádřit odchylkou v užitkové (nebo jakékoliv sledované) vlastnosti v jednotkách dané vlastnosti (kg, l, cm atd.) od průměru vrstevníků.

Genomická plemenná hodnota

Tento tradiční odhad PH může být kombinován i s druhým přístupem – individuálním, založeným na přímém určení genotypu v genech, které daný znak ovlivňují, případně jsou s ním v těsné vazbě a genotyp v těchto genech nepřímo signalizují (markery – viz Kapitola Základy genomiky). Sekvenování genomů a metody vyvinuté během sekvenování odhalily, že v genomu je velké množství SNP, které mohou být využity jako markery pro odhad PH. Můžeme stanovit genotypy ve vybraných SNP pomocí SNP čipů (princip SNP čipů viz kap. Molekulární diagnostika) a pomocí těchto polymorfizmů vysvětlit velkou část variability významných užitkových vlastností. Tento způsob stanovení PH označujeme jako **genomická PH** (gPH). Takto je možno určit gPH u mladých zvířat např. už brzy po narození nebo dokonce i u embryí. V kombinaci s tradičním odhadem PH dochází ke zpřesňování odhadu PH. Podrobnější informace o genomické selekci viz kapitola Genomika ve šlechtění.

Plemenná hodnota jedince je jeho genetické založení ve znacích, které jsou předmětem selekce a slouží k výběru zvířat, u kterých je předpoklad, že budou mít nejlepší potomky. Její odhad se získává na základě informací o vlastním fenotypu, o fenotypu jeho příbuzných, zejména cíleně získaných potomcích, a na základě genotypu v markerech kandidátních genů nebo markerech získaných celogenomovými analýzami. Tento odhad je vyjádřen selekčním indexem daného jedince.

3.2.4 Plemenitba

Na selekci navazuje druhá část šlechtění a tou je řízené rozmnožování selektovaných zvířat neboli plemenitba. Cílevědomý výběr určitých rodičovských kombinací podstatně navyšuje efekt předchozí selekce jednotlivých zvířat.

Z genetického hlediska se metody plemenitby dělí na dvě skupiny podle toho, jakou část genetické variability využívají. Tyto metody představují odlišné strategie v dosahování chovných cílů, zcela se liší organizace chovu. Metody plemenitby založené na podobnosti rodičů a potomků využívají aditivní působení genů. Metody plemenitby založené na heteroze využívají neaditivní působení genů.

3.2.4.1 *Metody plemenitby založené na podobnosti rodičů a potomků*

K rozmnožování jsou vybíráni jedinci s vysokou užitkovostí, mající vysoké počty aktivních alel v polygenech, které předávají potomkům. Vysoce užitkové zvíře je tedy současně zvířetem plemenným. Jedná se o šlechtění vlastností podmíněných polygeny a prostředím, pro udržení úrovně selektované vlastnosti je nutno chovat potomky ve stejných podmínkách jako rodiče. Tento typ plemenitby je rozšířen zejména u skotu, koní, koček a psů. Zahrnuje čistokrevnou plemenitbu i některé typy křížení (pozměňovací křížení).

Čistokrevná plemenitba

- **čistokrevná plemenitba** - páření v rámci plemene, standardní metoda u všech prochovaných plemen, dochází ke kumulaci příznivých alel a zvyšování plemenného standardu.
- **osvěžení krve** - do populace určitého šlechtěného plemene přinášíme (většinou) samce z jiné populace (téhož plemene) - nositele vynikajících vloh, dochází ke zvyšování variability.
- **liniová plemenitba** - uvnitř plemene jsou tvořeny skupiny s typickými znaky (chovné linie). Cílem je podchyzení a fixace vlastností zakladatele linie. Zvířata jsou příbuzná po zakladateli linie.
- **příbuzenská plemenitba (inbreeding)** - zvláštní případ, kdy se ve šlechtění využívá páření příbuzných jedinců, tzn. zvířat se společným předkem (do páté generace). Využívá se k fixaci vlastností vynikajících jedinců, zvyšování uniformity potomstva a v kontrole dědičnosti zdraví. Při inbreedingu dochází ke zvyšování homozygotnosti. Intenzita příbuzenské plemenitby je vyjádřena koeficientem inbreedingu – pravděpodobnost, s jakou se v jedinci scházejí v jednom genu alely identické původem (od společného předka). Tento způsob plemenitby je vždy doprovázen ostrou selekcí, aby se zamezilo projevům inbrední deprese. Inbrední deprese vzniká jako následek kumulace nevýhodných alel v homozygotní sestavě a dochází ke snižování životaschopnosti, celkové zdatnosti, užitkovosti a zvyšuje se výskyt dědičných onemocnění. Nejcitlivější jsou na následky inbreedingu prasata, králíci, drůbež, následují přežvýkavci a koně.

Pozměňovací křížení

Tato křížení umožňují vznik nových žádoucích kombinací vloh, dosud existujících u různých plemen a tedy geneticky oddělených. Neslouží tedy ke vzniku užitkových kříženců, jejichž užitkovost je založena na neaditivních efektech, které se nedědí (viz dále), ale slouží k produkci kříženců, kteří se budou dále rozmnožovat a přispívat k akumulaci žádoucích aktivních alel v následných generacích.

- **zušlecht'ovací křížení** – zlepšení zušlecht'ovaného plemene plemenem zušlecht'ujícím (obvykle importované plemeno, které má žádané vlastnosti v optimální formě). Charakter původního zušlecht'ovaného plemene i jeho název zůstává zachován. Dvě varianty:
 - *přilítí krve* – jednorázové použití zušlecht'ujících plemenů, kříženci F1 se páří s původním zušlecht'ovaným plemenem
 - *meliorační křížení* – opakované použití zušlecht'ujících plemenů ve 2-3 generacích
- **převodní křížení (vyhlazovací)** - cílem je úplná změna původního plemene. Opakovaně se připaraují plemenici vybraného cizího plemene obvykle po 5-6 generací. Vzniklí jedinci se kříží mezi sebou. Adaptace na místní podmínky zůstává u převedeného plemene zachována.
- **kombinační křížení (novoplemenné)** - kombinují se různá plemena s cílem získat nové plemeno s vlastnostmi, které se u výchozích plemen neprojevovaly (český teriér, české výrazné masné prase).

3.2.4.2 Metody plemenitby založené na heteroze

Jedná se o metody plemenitby využívající část genetické variance způsobenou neaditivním působením genů (efekty majorgenů = oligogenů). Při tomto způsobu plemenitby při křížení určitých rodičovských kombinací se potomci F1 vyznačují lepšími vlastnostmi (životaschopnost, odolnost, plodnost) a také vyšší užitkovostí než rodičovská generace. Tento jev se nazývá heteroza. Mírou heteroze je heterozní efekt – rozdíl mezi průměrnou užitkovostí kříženců a jejich rodičů. Heterozní efekt je podmíněn specifickými kombinacemi alel majorgenů s neaditivním účinkem, které mohou u svých potomků vytvořit určité kombinace rodičů. Heteroza tedy nenastává vždy, ale je nutno aktivně kombinovat rodičovské genotypy (kombinační návaznost). Heterozu nelze geneticky fixovat, je typická pro F1 generaci

a v dalších generacích se ztrácí (segregace alel). Plemenná zvířata se v tomto případě liší od zvířat užitkových. Rodičovský pár má vhodné genotypy (homozygotní) v majorgenech pro produkci potomka heterozygota. Jedná se o způsob relativně nezávislý na prostředí, proto mohou být potomci chováni v jiných podmínkách (v nukleových i užitkových chovech). Metody plemenitby založené na heteroze jsou uplatňovány zejména u prasat a drůbeže, obecně u multiparních druhů a druhů zaměřených na produkci masa nebo vajec. Reciproká křížení zde nedávají shodné výsledky, protože mateřská a otcovská plemena a linie jsou šlechtěny na jiné vlastnosti a není možné je zaměňovat.

Rozlišujeme dvě skupiny metod využívající heterozního efektu podle toho, zda selektujeme na specifickou kombinační návaznost nebo používáme náhodné kombinace.

Metody se selekcí na specifickou kombinační návaznost

Principem je systematické vyhledávání rodičovských kombinací poskytujících nejvyšší heterozní efekt. Řadíme sem metody rekurentní selekce, reciproká rekurentní selekce a křížení linií.

- **rekurentní selekce** - křížení selektované populace A s testovací linií T (homogenní často inbrední linie). Dle užitkovosti (heterozní efekt) potomků kříženců AT vybíráme rodiče z populace A k čistokrevnému chovu.
- **reciproká rekurentní selekce** - princip jako rekurentní selekce, ale místo testovací linie jsou použity dvě selektované linie (A, B), které navzájem slouží jako tester.
- **křížení inbredních linií** - vznikají úzkou příbuzenskou plemenitbou (kur), následuje test vzájemné kombinovatelnosti. Vysoká genetická homogenita výchozích inbredních linií umožňuje dosáhnout vysokého heterozního efektu. K získání finálních hybridů se použijí kombinace dvou až čtyřliniových kříženců s nejvyšším heterozním efektem. Nutná je široká výchozí základna (inbrední deprese, vyřazování linií).

Metody bez selekce na specifickou kombinační návaznost

Metody jsou zaměřeny na získání heterozního efektu bez předchozího testování – čím větší genetické rozdíly mezi rodičovskými populacemi, tím větší heteroza je očekávána. Potomstvo tvoří užitkoví hybridy.

- **jednoduché užitkové křížení** - křížením dvou plemen jsou získáni užitkoví hybridy obvykle na výkrm.

- **střídavé křížení** - dochází ke křížení dvou plemen, samice křížky jsou určeny k reprodukci při pravidelném střídání čistokrevných plemenů.

$A \times B$

$AB \times A$

$ABA \times B$

$ABAB \times A$

- **rotační křížení** - pro křížení se používají tři plemena, princip stejný jako u střídavého, plemena rotují.
- **mezidruhové křížení** - je křížení mezi jedinci různých druhů (zoologicky blízkých). Nevýhodou je snížená plodnost nebo neplodnost, naopak výhodou je zvýšená životaschopnost, odolnost a nenáročnost potomstva (heteroza). Např. mezek, mul, zebroid, skot \times bizon, skot \times zebu, kur \times krůta.

Heteroza má praktické vyústění v hybridizačních programech. Hybridizační programy mají vždy pyramidální strukturu - nutný je hierarchický způsob chovu, kde probíhá chov a šlechtění rodičovských populací odděleně od chovu užitkových zvířat (potomků).

3.3 Vliv šlechtění na kvalitu surovin a potravin živočišného původu

V současné době jsou identifikovány u různých druhů zvířat tisíce QTL (např. v <http://www.animalgenome.org/QTLdb/>) ovlivňujících znaky, které jsou předmětem šlechtění. Patří sem lokusy, které ovlivňují jak kvantitu produktů živočišného původu, tak jejich kvalitu. Ačkoliv komplexní charakter většiny užitkových vlastností ztěžuje vývoj přímých genetických testů, genotypování řady markerů (výjimečně i kausálních genů) je již v různých zemích užíváno jako součást selekce zvířat. Příklady vybraných markerů souvisejících s kvalitou živočišných produktů uvádí tabulka 1.

Tab. 1: Vybrané markery a kauzální geny související s produkcí a kvalitou živočišných produktů

Gen	Název	Funkce a projevy
Prasata		
<i>RYRI</i>	ryanodinový receptor	vápníkový kanál sarkoplasmatického retikula, vysoká zmasilost, náchylnost k PSS, zhoršená kvalita masa

<i>IGF2</i>	Insulinu podobný růstový faktor	podílí se na růstu a vývoji buněk je asociován s růstovou schopností
<i>PRKAG3</i> (dříve <i>RN</i>)	protein kinasa, AMP_aktivovaná gamma 3 podjednotka	regulace energetického metabolismu kosterních svalů asociace s kvalitou masa (kyselé maso)
<i>CAPN, CAST</i>	calpain, calpastatin	proteiny kalcium sensitivního proteolytického systému asociovány s křehkostí masa
Skot		
<i>CSN3</i>	κ kasein	mléčná bílkovina, polymorfismus asociován s účinností zpracování mléka (výtěžnost sýru, kvalita jogurtu)
<i>DGAT1</i>	diacylglycerol O-acyltransferasa 1	syntéza triglyceridů, asociace s obsahem tuku v mléce a svalech
<i>CAPN, CAST</i>	calpain, calpastatin	proteiny kalcium sensitivního proteolytického systému asociovány s křehkostí masa
<i>MSTN</i>	myostatin	negativní regulátor růstu svalů – masná užitkovost u některých plemen
Drůbež		
<i>GH, GHR</i>	růstový hormon a jeho receptor	asociace s produkcí vajec i zmasilostí
<i>MTNR1</i>	receptor melatoninu	asociace s parametry produkce vajec
<i>VIPR1</i>	vasoaktivní střevní peptidový receptor	regulace sekrece prolaktinu, asociace s kvalitou vajec

Během šlechtění dochází k ovlivňování genetického složení populace jak v požadovaném směru, tak i k nenáhodným změnám vlastností dalších, které mohou nežádoucím způsobem ovlivnit kvalitu konečného produktu. Genetickou příčinou těchto korelací může být pleiotropie, vazba genů, interakce alel či jejich produktů. Příkladem nepříznivých důsledků šlechtění jsou např. u prasat poruchy pohybového aparátu, prasečí stresový syndrom a změny v kvalitě masa spojené se šlechtěním na vysokou produkci masa. Šlechtění na vysokou mléčnou užitkovost u skotu je spojeno s citlivostí k mastitidám a se změnami v obsahu jednotlivých složek mléka.

4. Základy genomiky domácích zvířat

4.1 Úvod do genomiky a její vymezení

Genom je veškerá genetická informace organismu. Genomika (relativně nová věda – poprvé 1986) je obor genetiky, který se zabývá systematickou a komplexní analýzou genomů – strukturou (strukturní genomika) i funkcí (funkční genomika). Genomika má řadu dalších podoborů např. komparativní, populační, epigenomika, osobní genomika. Analýza funkce genomu (funkční genomika) souvisí s genovými produkty (proteiny) a na genomiku přímo navazuje proteomika – analýza struktury a funkce všech proteinů daného organismu. Genomika domácích zvířat se soustřeďuje zejména na systematické hledání markerů a analýzu komplexních znaků užitkovosti a zdraví.

4.1.1 Výzkum genomu

Ve výzkumu genomu lze rozlišit tři etapy – vytváření genetických map, sekvenování genomu, anotace genomu. Raná fáze genomiky (strukturní) spočívala ve vytváření genetických a fyzických map, obsahujících informaci o prakticky významných genech užitkovosti a zdraví, konečným cílem bylo poznat celou sekvenci. Mapování genomu bylo důležitým krokem v jeho poznávání, mapy byly vytvářeny postupně a lokalizovaly fragmenty DNA na chromozomy. Základem mapování bylo získání souboru markerů (značek = polymorfních míst), který pomáhá získat informace o poloze a vzdálenosti jiných genů a usnadňuje orientaci v genomu. Mapování je možno provádět různými postupy a podle toho se mapy rozdělují na mapy genetické a fyzické a na ně navazuje vlastní sekvenování genomu.

4.1.1.1 Mapování genomu

Genetické mapy

U historicky prvních **genetických (vazbových) map** se využívaly genetické techniky (experimentální křížení) ke tvorbě map ukazujících polohu genu (markeru). Jsou založeny na

principu vazby genů, tj. situace, kdy mapované geny leží na stejném chromozomu a v potomstvu pak převládají sestavy alel rodičů. Vazbové mapy umožňují mimo jiné předpovídat společnou dědičnost znaků, jejichž geny leží na tomtéž chromozomu a vysvětlují některé z pozorovaných korelací mezi znaky.

Molekulární a cytogenetické mapy

Při fyzickém mapování (**molekulární mapy**) se jedná o umístování markerů/genů do celogenomových sekvencí. Jejich lokalizace je určena souřadnicemi párů bazí standardního referenčního genomu daného druhu. Protože referenční genom je rozdělen na jednotlivé chromozomy, lze z polohy v celogenomové sekvenci určit i chromozom, na kterém gen/marker leží a jeho místo (lokus) na daném chromozomu. Pomocí hybridizace *in situ* (FISH metoda) je možné na základě hybridizace sondy s fixovanými metafázními chromozomy polohu na chromozomu vizualizovat pro potřeby například cytogenetické diagnostiky.

4.1.1.2 Sekvenování genomu

Součástí genomového mapování je přímé určování **primární struktury DNA celogenomovým sekvenováním**. V současné době je osekvenováno přes 1300 eukaryotických, kolem 14000 prokaryotických genomů a cca 30 000 virových genomů (červen 2019, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Sekvenování dále pokračuje k exotickým druhům, mořským živočichům, ohroženým druhům apod.

Anotace genomu

Sekvence získané sekvenováním celých genomů jsou na první pohled nesrozumitelné kombinace nukleotidů tvořících strukturu DNA a je proto třeba je interpretovat, tj. identifikovat místa, kde jsou zakódovány různé typy informace, například pro syntézu molekul proteinů nebo RNA, regulační místa, nekódující sekvence apod. Cílem je najít v získaných genomových sekvencích sekvence genů, regulačních oblastí, míst interakcí s proteiny a dalších významných oblastí.

Tento proces se nazývá **strukturní anotace genomu**. **Funkční anotace genomu** pak dává informace o tom, zda je konkrétní genomová sekvence exprimována, v kterých tkáních a za jakých okolností. K získání těchto informací se používá celá řada metod, jejichž znalost není pro veterinárního lékaře nezbytná.

4.2 Genomické přístupy k identifikaci ekonomicky významných genů zvířat

Genomické přístupy k identifikaci ekonomicky významných genů mohou být cíleně zaměřené na vybrané (kandidátní geny) nebo vycházejí z analýzy celého genomu (molekulární disekce komplexního znaku).

4.2.1 Analýza kandidátních genů

Vychází se z hypotéz o mechanismech vzniku daného znaku (nemoci nebo užitkového znaku) a odhadu, které geny by mohly mít na vznik znaku vliv. Tyto geny jsou pak identifikovány v genomu daného druhu a podrobeny dalším analýzám, jako například hledání významných polymorfizmů, které mohou sloužit k identifikaci žádoucích nebo nežádoucích genotypů.

4.2.2 Molekulární disekce komplexního znaku

Genetické mapy a sekvenování genomu umožnily lokalizaci nejprve genů kódujících jednoduše mendelisticky dědičné znaky a choroby. V případě komplexních znaků (většina užitkových znaků), je však třeba určit počet, lokalizaci, velikost efektu a vzájemné interakce jednotlivých zúčastněných genů. Některé z těchto informací lze získat **molekulárním rozkladem (disekcí) komplexního znaku**. Možnosti detekce a identifikace genů podílejících se na komplexním znaku do značné míry závisí na jejich počtu, velikosti jejich efektu a frekvenci alel v populaci.

4.2.2.1 *Princip a obecný postup disekce komplexního znaku*

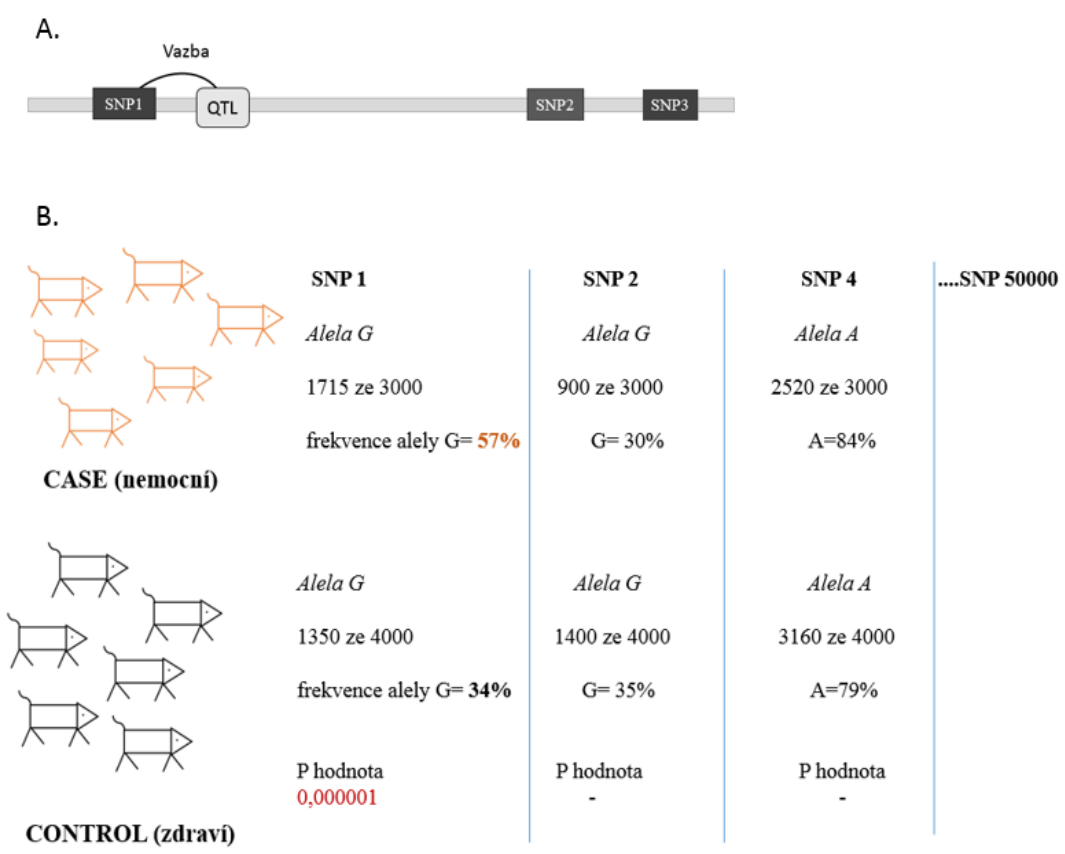
Při hledání těchto genů je nezbytné nejprve přesně definovat fenotyp studovaného komplexního znaku, jehož genetickou podstatu zkoumáme. Poté se vytvoří dvě skupiny extrémních fenotypů (zdravý/nemocný, maximálně/minimálně produktivní), u nichž je předpoklad rozdílného genetického založení ve zkoumaném znaku. Tyto skupiny jsou podrobeny celogenomovému screeningu, který umožňuje identifikovat markery související (asociované) s variabilitou studovaného fenotypu. V případě potřeby je možné identifikovat další markery a potvrdit předchozí výsledky funkční analýzou genové exprese vybraných genů. Je také možné usuzovat

na genové dráhy, které se podílejí na vzniku studovaného znaku. Tyto znalosti umožňují například hledat vhodná léčiva v případě, že studovaným znakem je nemoc nebo vhodné šlechtitelské postupy v případě užitkových znaků.

4.2.2.2 Celogenomový screening (*genome-wide association study, GWAS*)

Nevyžaduje předchozí znalosti biologie sledovaného znaku. Je založený na využití polymorfních markerů (SNP), které jsou ze všech známých SNP v genomu daného druhu (několik milionů) vybrány tak, aby byly rovnoměrně rozloženy po celém genomu na všech chromozomech. Obvykle se jejich počet blíží jednomu milionu SNP, což znamená, že je analyzován přibližně každý desátý SNP. Na tzv. HD-SNP čipu je pak možné určit genotypy (viz kapitola Molekulární diagnostika) pro každý z těchto vybraných markerů u obou extrémních fenotypových skupin. Následně se vyhodnotí poměrné (percentuální) zastoupení alel v jednotlivých markerech v obou skupinách. Pokud jsou alely markerů zastoupeny stejně u obou skupin, pak je rozdělení náhodné a nemá souvislost s fenotypem, podle kterého jsou vytvořeny skupiny. Pokud se zastoupení alel markerů mezi skupinami statisticky liší, znamená to asociaci mezi markerem a fenotypem, tedy vliv markeru na komplexní znak. Nejčastějším vysvětlením takové asociace je vazba mezi markerem a kausálním genem, který ovlivňuje sledovaný komplexní znak – obr. 5A,B.

Výsledkem analýzy je tedy identifikace markerů asociovaných se znakem a zároveň vymezujících širší kandidátní chromozomální oblasti ovlivňující studovaný komplexní znak. Kandidátní chromozomální oblast je obvykle větší úsek, zahrnující řadu genů i mezigenových oblastí. Pro vytipování a potvrzení konkrétních kandidátních genů se využívá řada metod, ale identifikace kauzálních mutací bývá obtížná zejména díky malému efektu individuálních genů. U vybraných markerů se pak testuje jejich vhodnost pro účely diagnostiky anebo selekce. Hlavním kritériem je velikost jejich účinku na sledovaný znak.



Obr. 5: Celogenomový screening. A Schéma vazby mezi markerem a lokusem kvantitativního znaku. B Princip GWAS.

4.2.2.3 *Potvrzení biologické funkce kandidátních genů: analýza exprese kandidátních genů*

K potvrzení funkce kandidátních genů slouží obvykle sledování jejich exprese některou z metod molekulární biologie (viz kapitola Molekulární diagnostika). Pokud jsou např. testované geny aktivní ve tkáni, která souvisí se studovaným znakem či onemocněním, poukazuje to na možnou spojitost genů a znaku/onemocnění. Sledování exprese je pouze vodítkem, ke konečnému potvrzení funkce genů v daném znaku jsou nutné další informace. Pomocí genových manipulací (principy viz kapitola Genové manipulace) je například možné vyblokovat vytipovaný gen genovým knockautem a dle změny fenotypu knockautovaných jedinců se odvozuje funkce genu. Obráceně lze také vložit normální sekvenci studovaného genu do postižených buněk (zvířecí modely). Pokud je onemocnění korigováno, je pravděpodobné, že sekvence představuje kauzální gen.

Potvrzený kandidátní gen obvykle bývá součástí mnoha signalizačních drah. Analýzou drah je pak možno vytipovávat další kandidátní molekuly, které se na sledovaném komplexním znaku mohou podílet.

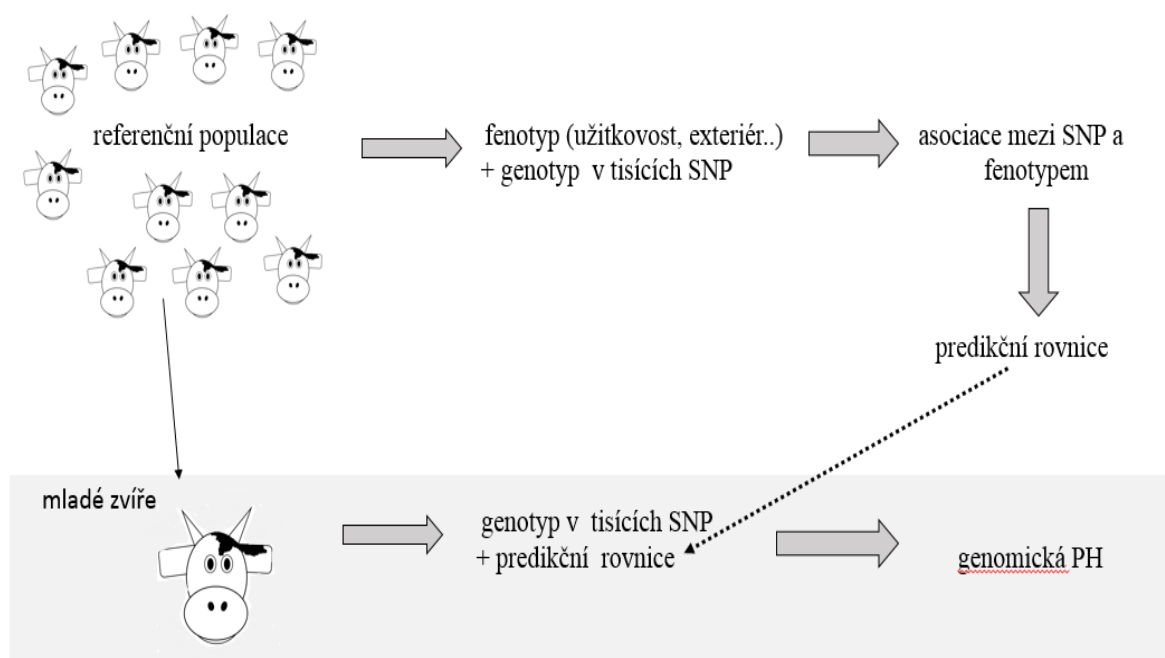
4.3 Genomické přístupy k selekci zvířat

Markery identifikované u kandidátních genů nebo při GWAS se dají využít k selekci buď přímo (například genetické testy na přítomnost nežádoucích, respektive žádoucích mutací – viz tabulka 1) nebo mohou být využity ke zpřesnění odhadu plemenné hodnoty při sestavování selekčních indexů. Pokud jde o celogenomové přístupy, příkladem snahy o maximální využití genomických informací pro účely selekce domácích zvířat je genomická selekce u holštýnského skotu.

4.3.1 Genomická selekce: určení genomické plemenné hodnoty

Markery SNP odhalené během sekvenování celých genomů mohou být využity pro zpřesnění odhadu klasické plemenné hodnoty v tzv. **genomické selekci**.

Pro účely genomické selekce se nejprve provede GWAS s čipem obsahujícím asi 900 tisíc SNP markerů u reprezentativního vzorku celého plemene/populace. Tento vzorek slouží jako tzv. referenční populace, protože kombinace alel genů, které ovlivňují užitkovost skotu jako druhu, jsou u různých plemen různé v důsledku jejich odlišné historie. U referenční populace jsou známy údaje o užitkovosti, exteriéru, potomstvu, příbuznosti apod. a je u ní prováděn odhad plemenné hodnoty tradičními postupy. Na základě výsledků GWAS je vybráno přibližně 50 tisíc SNP asociovaných s mléčnou užitkovostí u referenční populace. Ty vytvoří další, komerčně produkováný čip, umožňující určit genotypy a pomocí speciální rovnice pro výpočet odhadu plemenné hodnoty odhadnout genomickou plemennou hodnotu zvířat, která testujeme (obr. 6). Genomická selekce tento odhad umožňuje i u mladých zvířat bez vlastní užitkovosti a potomstva, a také u vlastností, které jsou obtížně či nákladně měřitelné jako např. plodnost, odolnost k chorobám nebo konverze krmiva.



Obr. 6: Princip genomické selekce

Genomická selekce se zatím uplatňuje zejména u holštýnského skotu, kde dochází k rychlejšímu rozhodování o zařazení do plemnitby a tím ke zkrácení generačního intervalu. Náklady na stanovení genotypů v SNP jsou zde relativně nízké ve srovnání s náklady na klasickou testaci (při klasickém odhadu PH mléčné užitkovosti je býk selektován na základě laktace svých dcer – vysoké náklady na chov, generační interval kolem pěti let; odhad genomické PH lze provést hned po narození). U prasat se genomická selekce uplatňuje u kanců v nukleových chovech ve zvýšení přesnosti odhadu plemenné hodnoty zejména u vlastností maternálních a ukazatelů jatečné hodnoty. U drůbeže již bylo dosaženo tradičním šlechtěním krátkého generačního intervalu i vysoké intenzity selekce. Genomická selekce se uplatní zejména při zvýšení přesnosti odhadu PH u znaků projevených pouze u jednoho pohlaví a znaků těžko měřitelných. U druhů s pyramidální strukturou chovu, jako jsou prasata či drůbež, může vést genomická selekce až k přebudování šlechtitelských programů (méně zvířat v nukleových chovech, selekce v nukleu založená na predikčních rovnicích určených u kříženců).

5. Mutace, mutageny a jejich význam

Mutace jsou významným zdrojem genetické proměnlivosti a základní hybnou silou evoluce, ale i předpokladem umělé selekce. Četnost spontánních mutací se značně liší mezi různými druhy organismů. Vyšší organismy mají obecně vyspělejší replikační aparát a reparační mechanismy a v důsledku toho také sníženou četnost nových spontánních mutací. Pro názornost můžete srovnat údaje v tabulce 2.

Tab. 2: Srovnání četnosti spontánních mutací u vybraných organismů (zdroj Drake et al. 1998)

Organismus	Mutační rychlost*
RNA viry	10^{-4}
DNA viry (bakteriofágy)	10^{-8}
Bakterie	10^{-10}
Háďátka obecná (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	10^{-10}
Octomilka obecná (<i>Drosophila melanogaster</i>)	10^{-10}
Myš domácí	10^{-10}
Člověk	10^{-11}

* Pravděpodobnost výskytu mutace v daném místě (specifické bázi) genomu.

Indukované mutace jsou vyvolávány faktory prostředí. Tyto faktory obecně nazýváme mutageny. Četnost indukovaných mutací je závislá jak na evoluční úrovni exponovaného organismu, tak na typu a dávce mutagenu, kterému je organismus vystaven. Navíc zde může hrát roli i individuální variabilita genomu daného organismu. Z toho plyne, že neurčujeme obecnou četnost indukovaných mutací pro daný druh, nebo skupinu druhů tak jako u spontánních mutací, ale četnost indukovaných mutací pro konkrétní druh daného organismu nebo jeho variantu (kmen, plemeno, linii) **v závislosti na dávce konkrétního mutagenního agens.**

5.1 Mutagenita, genotoxicita, testování genotoxicity

Riziko mutagenity je významným faktorem ovlivňujícím kvalitu prostředí, kvalitu produktů živočišného původu i možnosti využití nejrůznějších látek a postupů v medicíně i chovu zvířat.

5.1.1 Mutagenita a genotoxicita

Termíny mutagenita a genotoxicita jsou zejména v biomedicíně používány nejednotně a často se zaměňují. **Mutagenita** je schopnost vyvolávat dědičné mutace v molekulách nukleových kyselin. **Genotoxicita** v nejširším smyslu zahrnuje všechny typy poškození nebo změn DNA, bez ohledu na konečný důsledek pro zasaženou buňku. To znamená, že termín genotoxicita je širší a zahrnuje mutagenitu. Velmi často se však v souvislosti s praktickými aplikacemi tyto termíny používají jako synonyma, případně se termín genotoxicita používá jako synonymum pro mutagenitu chemických látek. Pro korektní interpretaci konkrétně používaného termínu je tedy třeba posoudit, jakým způsobem byla genotoxicita, respektive mutagenita určitého faktoru testována.

Mutageny, respektive genotoxiny mohou působit jak přímo, tak nepřímo. Přímým působením se rozumí změny nebo poškození genetické informace přítomností právě daného mutagenu/genotoxinu. Nepřímé působení zahrnuje vždy další komponenty, kdy působením mutagenu/genotoxinu dochází k modifikaci dalších molekul v buňce, které pak mají za následek změny DNA bez toho, aby mutagen/genotoxin přišel do přímého kontaktu se zasaženou DNA. Promutageny jsou látky, které svůj mutagenní účinek získají teprve po metabolické aktivaci v buňkách, respektive organismu.

5.1.2 Testování genotoxicity

Testování genotoxicity je komplexní úkol, kterým se zabývá obor genetické toxikologie. Při testování faktorů vnějšího prostředí se uplatňuje celá řada metod z oborů mikrobiologie, molekulární biologie a cytogenetiky. Při testování genotoxicity je třeba mít na paměti, že většina genotoxických faktorů má jeden, nebo několik málo způsobů účinku na DNA. Stejně tak testy genotoxicity jsou obvykle nevrženy na detekci pouze jednoho konkrétního poškození

DNA. Z toho plyne, že pro rozhodnutí o genotoxicitě nestačí pouze jeden test, ale testy se skládají do panelů za účelem postižení co nejširší škály různých způsobů působení genotoxinů. Pro sestavování panelu testů genotoxicity existují pravidla, která jsou v rámci EU určována agenturami ECHA (European Chemicals Agency) pro chemické látky, EMA (European Medicines Agency) pro léčiva a EFSA (European Food Safety Authority) pro potraviny a krmiva. Tato pravidla jsou periodicky revidována tak, aby odpovídala současnému poznání. Samotné testování obvykle probíhá v několika fázích v závislosti na charakteristice testované látky a výsledcích testů v předchozích krocích, nebo formou panelu vybraných testů. Bližší popis vybraných testů lze obvykle najít v databázi OECD (<https://www.oecd.org>).

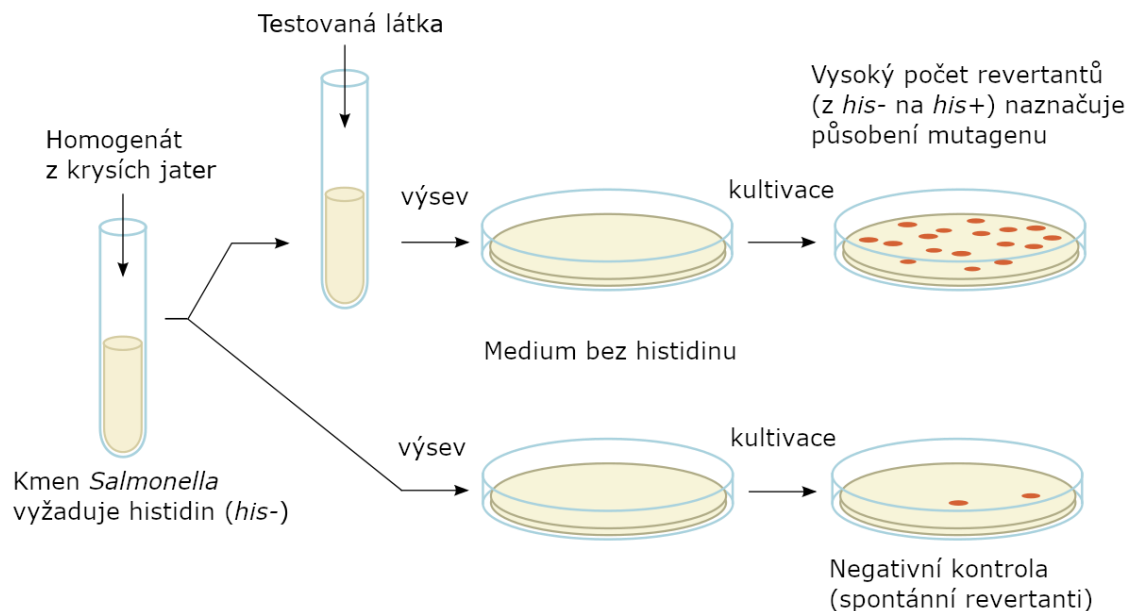
5.1.2.1 *In vitro* testy genotoxicity

V první fázi testování genotoxicity zkoumané látky se využívá *in vitro* testů, konkrétně jsou nejčastěji doporučovány Amesův test na bakteriích a set testů na savčích buňkách.

Amesův test (OECD TG 471, obr. 7) je nejznámějším testem na mutagenitu. Tento test na bodové mutace je prováděn na bakteriích (obvykle kmeny *Salmonella typhimurium*, ale existují i varianty využívající kmeny *Escherichia coli*). Pro test zásadní charakteristika těchto kmenů je bodová mutace v genu pro syntézu histidinu. V důsledku této mutace nejsou testované kmeny schopné růst na médiích bez obsahu této esenciální aminokyseliny, čehož se využívá při hodnocení testované látky. Test lze provádět buď bez metabolické aktivace, nebo s ní. Metabolická aktivace promutagenu spočívá v přidání homogenátu z krysích jater do média spolu s testovanou látkou. Tento krok má co nejlépe simulovat prostředí těla vyšších živočichů s celým jejich enzymatickým aparátem, který může s testovanou látkou interagovat a původně neškodnou látku přeměnit na mutagen.

V prvním kroku se ověřuje, že bakterie určené pro testování skutečně vykazují mutaci *his⁻* tím, že jsou ze zásobního média vysety do Petriho misky s médiem, které neobsahuje histidin. V této situaci bakterie nerostou, neboť nemají možnost histidin syntetizovat (jsou *his⁻*) a nemají přístup k histidinu z prostředí. Po ověření počátečního stavu se do média s testovacím kmenem přidává testovaná látka (obvykle existuje několik paralelních alikvót s různou koncentrací testované látky). Po definované době jsou pak takto ošetřené bakterie vysety na médium bez histidinu a je odečítán počet narostlých kolonií. Každá narostlá kolonie signalizuje jednu mutační událost, kdy došlo k zasažení defektního místa v genu pro syntézu histidinu (*his⁻*) a tím pádem k obnovení jeho původní funkce (*his⁺*). Sledujeme tedy výskyt reverzních mutací. Protože

neexistuje způsob, jak mutagenezi zacílit pouze do tohoto místa bakteriálního genomu, je tento přístup detekce genotoxicity založen čistě na pravděpodobnosti. Pokud je testovaná látka genotoxická, dochází k výskytu mutací po celém genomu s přibližně stejnou četností. Využívá se zde faktu, že bakterie mají obecně vyšší mutační rychlost a kratší generační dobu spolu s tím, že na jedné Petriho misce je vyseto přibližně 10^8 živých bakterií. Zároveň s experimentem je prováděna negativní kontrola, kdy do média s testovacím kmenem není přidána žádná testovaná látka, a pozitivní kontrola, kdy je do média přidán prokázaný mutagen detekovatelný Amesovým testem. Negativní kontrola slouží ke stanovení frekvence výskytu spontánních revertantů, tedy bakteriálních buněk, v jejichž genomu došlo k reverzní mutaci v genu pro histidin bez vnějšího zásahu. Pokud je tedy frekvence kolonií v negativní kontrole a testovací misce přibližně stejná, např. 10 kolonií v negativní kontrole a 11 kolonií v testovací misce, je pravděpodobné, že kolonie v testovací misce jsou také důsledkem spontánních mutací a ne genotoxicity testované látky. Pozitivní kontrola slouží jednak k ověření správného provedení testu a zároveň umožňuje hrubé srovnání síly testovaného mutagenu porovnáním počtu narostlých kolonií v testovací misce a v misce s pozitivní kontrolou (prokázaným mutagenem).



Převzato a upraveno - © User:Histidine / Wikimedia Commons / CC-BY-SA-3.0

Obr. 7: Schéma průběhu Amesova testu (Wikimedia Commons, převzato a upraveno)

Z testů na savčích buňkách stojí za bližší popis zejména test na chromozomální aberace (OECD TG 473) a test na přítomnost mikrojadern (OECD TG 487), ale existuje i celá řada dalších.

Test na chromozomální aberace spočívá v *in vitro* kultivaci buněk v přítomnosti testované látky. Po předepsané době je kultivace přerušena a buněčný cyklus testovaných buněk je zastaven v metafázi (kondenzované chromozomy) působením kolchicinu (mitotický jed). Následně jsou pod mikroskopem pozorovány obarvené chromozomy z jednotlivých buněk a jsou vyhledávány jak numerické, tak strukturní aberace. Tento test může být dále modifikován použitím metody FISH (fluorescence *in-situ* hybridization), která umožňuje zvýraznění konkrétní oblasti chromozomu.

Test na přítomnost mikrojadern využívá také mikroskopie, ale nejsou při něm pozorovány jednotlivé chromozomy. Po *in vitro* kultivaci stejně jako v předešlém případě jsou buňky vystaveny působení cytochalasinu B, který způsobí zástavu dělení buněčné membrány, ale ne jader. Pod mikroskopem tedy pozorujeme velké dvoujaderné buňky. Pokud dochází ve sledovaných buňkách působením testované látky k chromozomálním zlomům nebo aneuploidiím projeví se to výskytem mikrojadern. Mikrojádra jsou struktury viditelné v buněčné cytoplazmě obsahující buď celý chromozom nebo chromozomální fragment. Mikrojádro je tedy přímým důsledkem poškození chromozomů.

5.1.2.2 *In vivo* testy genotoxicity

Ve druhé fázi se přechází k testování *in vivo*. Nejčastěji používané jsou test na transgenních hlodavcích (OECD TG 488), *in vivo* variace testů na přítomnost chromozomálních aberací (OECD TG 475) a přítomnost mikrojadern (OECD TG 474) a Comet test (OECD TG 489).

Test na transgenních hlodavcích využívá jako pokusné subjekty jedince ze speciálně vyšlechtěných laboratorních linií, kteří mají ve svém genomu začleněny kopie cizorodé DNA, která nese jeden nebo více reportérových genů. Transgenní DNA je nejčastěji bakteriálního původu. Důležitým předpokladem je, že reportérové geny mají neutrální charakter, tedy žádným způsobem neovlivňují svého hostitele. Po působení testované látky na transgenního hlodavce jsou odebrány vzorky tkání, ze kterých je izolována cizorodá DNA. Tato DNA je následně zabalena do virového vektoru a přenesena do bakteriálního hostitele, který je schopen danou DNA exprimovat. Pokud jsou reportérové geny poškozeny působením testované látky, nedochází k jejich expresi v bakteriálním systému. Tato změna se projeví jeho chováním na

vhodně zvoleném selekčním médiu. Jako reportérové geny jsou často používány bakteriální geny pro rezistenci k antibiotikům. Pokud dojde k jejich poškození, nemůže bakterie, která je nese, růst na médiu s obsahem tohoto konkrétního antibiotika. Protože existují genotoxické látky, u kterých bylo pozorováno selektivní působení jen v určitých tkáních (obvykle takových, kde se buňky častěji dělí), je velkou výhodou testu na transgenních hlodavcích možnost analyzovat jakoukoliv somatickou nebo gametickou tkáň exponovaného jedince. Test je zaměřen zejména na bodové mutace a kratší přestavby v rámci jednoho nebo několika málo lokusů (inzerce, delece, substituce, transverze).

In vivo verze testu na chromozomální aberace a testu na přítomnost mikrojadern probíhá stejně, jako bylo popsáno výše s tím rozdílem, že analyzovaný materiál pochází od exponovaného zvířete a ne z buněčné kultury.

Comet test je založený na izolaci jednotlivých buněk nebo buněčných jader z vybrané tkáně exponovaného jedince. DNA z těchto buněk/jader je následně imobilizována v agarovém gelu a je vystavena elektrickému poli (gelová elektroforéza). Pokud je DNA nepoškozená, zůstává na svém původním místě v relativně kompaktním útvaru. Pokud ale došlo působením testované látky k fragmentaci této DNA, pohybují se odštěpené fragmenty v gelu směrem k anodě. Tento test se nazývá Comet testem proto, že odštěpené fragmenty pohybující se směrem od nepoškozené DNA vypadají na gelu jako ocas komety. Vyhodnocení testu probíhá obvykle pod mikroskopem. Test je zaměřen na detekci dvouvláknových zlomů DNA.

Mimo výše zmíněné testy samozřejmě existuje ještě mnoho dalších, které mohou být zahrnuty do testovacího panelu, pokud k tomu existují vhodné předpoklady. Například na bakteriích je možné provádět **SOS chromotest**, který pomocí fúzního genu zahrnujícího promotor pro SOS odpověď a kódující oblast pro beta-galaktosidázu umožňuje detekci širokého spektra poškození bakteriálního genomu. Pokud je testovaná látka určena pro použití v rostlinné výrobě, je k dispozici řada testů prováděných na rostlinách. Tradescantia test je testem na somatické mutace. Müllerův embryonálně letální test na *Arabidopsis thaliana* pozoruje gametické recesivní embryonálně letální a chlorofylově defektní mutace.

Všechny výše zmíněné testy se obvykle provádějí u látek, které byly nově syntetizovány, a uvažuje se o jejich širším využití. Takovýto přístup je označován jako **prospektivní**. Naproti tomu se můžeme setkat také s přístupem **retrospektivním**, kde v minulosti došlo k uvolnění genotoxických látek do prostředí a nyní se pozoruje jejich vliv a koncentrace v daném prostředí. Toto monitorování může spočívat v odběrech nejružnějších vzorků (půda, voda, biologický materiál) a testování genotoxicity takto získaného materiálu, nebo odchyt živočichů

dlouhodobě žijících v kontaminovaném prostředí a sledování dopadů expozice na jejich genetickou informaci.

5.2 Genetické riziko faktorů vnějšího prostředí, mutageny v potravním řetězci

Genotoxické faktory vnějšího prostředí dělíme standardně do tří kategorií:

- Fyzikální faktory
- Biologické faktory
- Chemické faktory

5.2.1 Fyzikální faktory

Fyzikální faktory zahrnují různé druhy záření. Za zmínky stojí zejména UV záření, které je součástí slunečního záření a má schopnost vyvolávat poškození DNA exponovaných buněk tvorbou cyklobutanových pyrimidinových dimerů. Tento typ může být mít nežádoucí účinky zejména v oblastech s chronickou expozicí vysokým dávkám UV záření a je dáván do souvislosti například se vznikem okulárního skvamózního karcinomu u ovcí a skotu. Druhý typ záření s negativními důsledky je záření ionizující. Ionizující záření může pocházet z různých zdrojů a má mnohem širší škálu účinků. Nejčastěji pozorujeme buď poškození DNA, kdy záření přímo zasáhne danou DNA a vede k tvorbě jednořetězcových nebo dvouřetězcových zlomů. Druhým nejčastějším typem poškození jsou změny DNA působením volných radikálů. Záření vytváří uvnitř buněk vysoce reaktivní molekuly (volné radikály), které mohou reagovat s DNA a způsobovat modifikace nebo zlomy v zasaženém místě. Fyzikální faktory nejsou z hlediska celkového rizika prostředí příliš významné. Expozice není obvykle příliš vysoká a jejich účinky jsou známy a pod kontrolou (radiodiagnostika).

5.2.2 Biologické faktory

Pod pojmem biologické faktory se obvykle rozumí viry (s lyzogenním cyklem) a transpozony. Transpozony jsou mobilní elementy přítomné v genomu vyšších organismů. Lyzogenní viry mají schopnost začleňovat svůj genom do genomu hostitele. U obou skupin je princip působení velmi podobný. Pokud se transpozon nebo virový genom začlení do kódující sekvence (genu) hostitelského genomu, dojde k přerušení této kódující sekvence a gen ztratí svoji funkci. Formálně jsou příčinou mutací typu inserce.

5.2.3 Chemické faktory

Nejrozšířenější skupinou genotoxinů jsou jednoznačně chemické faktory (látky). Chemické látky jsou jednak přirozenou součástí prostředí, ale také jsou do prostředí uváděny činností člověka. Přirozené genotoxiny jsou nejčastěji produktem plísní (např. aflatoxiny) nebo vyšších rostlin (např. alkaloidy). Uměle vytvořených genotoxinů je násobně vyšší množství. Do prostředí a následně do potravního řetězce se dostávají celou řadou cest. Mohou být zcela záměrně do prostředí uvolňovány, kdy některé látky používané v zemědělství mají prokázaný genotoxický potenciál (např. herbicid Roundup). I v dalších skupinách látek používaných v zemědělství byly objeveny genotoxiny. Jedná se zejména o hnojiva, pesticidy, fungicidy, aj. Další možnou cestou zanesení chemických genotoxinů do prostředí je nedostatečnou úpravou odpadních látek vypouštěných výrobními provozy, nevhodným skladováním a používáním. Mimo tyto výše zmíněné cesty se chemické genotoxiny do prostředí také mohou dostávat v důsledku havárií a přírodních katastrof. Významnou skupinou chemických látek s potenciálním rizikem genotoxicity jsou léčiva. Testy na genotoxicitu jsou u léčiv jedním z kritických předpokladů jejich uvedení na trh.

Chemické látky uměle vyráběné člověkem podléhají přísnému testování a kontrole, kde se naplno využívá genotoxických testů popsanych dříve v této kapitole. Protože je ale koncept genotoxicity relativně nový, nebylo toto testování používáno vždy, a tak docházelo v minulosti k neuvědomělému zamoření prostředí těmito látkami. Tak byl do prostředí uveden například insekticid DDT, který je sice velmi efektivním nervovým jedem pro hmyz, zároveň je ale také genotoxický pro celou řadu dalších organismů včetně člověka. Dalšími příklady chemických genotoxinů dříve hojně využívaných jsou azbest, formaldehyd a dioxiny. Azbest se používal jako protipožární izolace ve stavebnictví a expozice je spojována se zvýšeným výskytem nádorů

zejména dýchacích cest. Formaldehyd se i dnes dostává do prostředí jako složka výfukových plynů. Dříve byl navíc přítomen v kosmetice a různých nátěrových a čisticích prostředcích. Formaldehyd byl také hojně využíván při konzervaci nejrůznějších preparátů. Formaldehyd se vyznačuje zvýšenou karcinogenní aktivitou, která má molekulární podstatu v zesíťování DNA. Dioxiny se nejčastěji využívaly jako herbicidy. Ve světě je nejznámější využívání dioxinů v průběhu války ve Vietnamu, kde byly používány pod označením Agent Orange. U nás se dioxiny vyráběly v chemičce Spolana Neratovice.

Velká část uměle vytvořených genotoxinů je velmi obtížně biologicky degradovatelná a tím pádem v prostředí přetrvávají ve vysokých koncentracích ještě dlouho po původním zanesení. Takové látky se označují jako **perzistentní organické látky**. Jako příklad můžeme uvést dříve zmíněné dioxiny. Výroba dioxinů ve Spolaně skončila koncem 60. let, ale ještě dnes, téměř 50 let poté, je část areálu zamořena nebezpečně vysokými koncentracemi těchto látek. Některé perzistentní organické látky jsou rozpustné v tucích a ukládají se pak ve zvýšených koncentracích v tukových tkáních exponovaných živočichů. Tímto způsobem pak mohou postupovat potravním řetězcem a zasáhnout i živočichy, kteří jim nejsou přímo vystaveni.

5.3 Mutageny a genetika nádorových onemocnění

Velmi častým důsledkem působení mutagenů na genetickou informaci somatických buněk je zvýšený výskyt nádorových onemocnění. Nádorové bujení se se zvýšenou pravděpodobností vyskytuje ve tkáních, které byly mutagenu přímo vystaveny. Klasickým příkladem jsou karcinomy kůže v důsledku nadměrného opalování.

5.3.1 Genetická podstata vzniku nádorových onemocnění

Vznik nádorových onemocnění je z hlediska genetiky vysoce komplexní mechanismus, který spočívá v postupné akumulaci mutací. Ke vzniku nádorového onemocnění nestačí tedy jedna mutace, ale je potřeba souhra několika různých mutací, které umožní běžné somatické buňce transformaci na buňku nádorovou. Geny, které jsou spojeny s nádorovým bujením, jsou souhrnně označovány buď jako **onkogeny** nebo **antionkogeny (tumor-supresorové geny)**. Protoonkogeny jsou geny, které řídí buněčné dělení a diferenciaci, onkogeny jsou verze těchto

genů, které byly aktivovány v důsledku mutace. Onkogeny pak následně deregulují buněčné dělení a dochází k nekontrolovanému množení takto postižené buňky. Naproti tomu jsou antionkogeny (tumor-supresorové geny), které fungují jako supresory buněčného dělení. Zatímco u protoonkogenů většinou stačí, aby zmutovala pouze jedna kopie a došlo ke zvýšenému dělení buněk, u antionkogenů je potřeba vyřadit obě kopie, aby došlo ke ztrátě jejich funkce. Proces onkogeneze však může souviset i s epigenetickými faktory, například s umlčením funkce určitých genů bez jejich změny (mutace).

5.3.1.1 Genetické faktory ovlivňující vznik a rozvoj nádorových onemocnění

Tradiční koncept chápe proces karcinogeneze jako vícestupňový, zahrnující stádium iniciace, promoce a progresu. V prvním stádiu dochází k ireversibilním genetickým změnám v buňkách, v promočním stádiu dochází k postupné transformaci normální buňky v buňku nádorovou za účasti řady faktorů – promotorů nádorového procesu, a stádium progresu začíná se vznikem první transformované buňky. V této fázi se nádorové buňky dostávají do interakce s obrannými mechanizmy organismu. Uplatňují se zde genetické vlastnosti, zejména nestabilita a heterogenita genomu nádorových buněk na jedné straně a genetický potenciál obranných mechanismů organismu a jejich nastavení v konkrétním čase na straně druhé.

Pro rozvoj nádorového onemocnění je potřeba, aby transformovaná buňka nashromáždila dostatek mutací, které ovlivňují některé klíčové vlastnosti. Jak bylo uvedeno výše, pro transformaci buňky na buňku nádorovou je nezbytně nutná **deregulace buněčného cyklu**. Většina somatických buněk má omezený počet dělení, který může během svého života podstoupit. Toto omezení je primárně dáno délkou telomer, které se po každém buněčném dělení zkrátí. Nádorové buňky toto omezení v důsledku akumulovaných mutací ignorují, což jim dává prakticky **neomezený replikační potenciál**. Velmi důležitou vlastností nádorových buněk je **autostimulace**, kdy si nádorové buňky syntetizují svoje vlastní prorůstové signály. S tím je spjata další vlastnost, a to je **necitlivost k supresivním signálům** přicházejícím z vnějšího prostředí. Protože transformace buňky probíhá v tkáni, kde je zasažená buňka obklopena dalšími podobnými buňkami a mají k ní přístup i další specializované buňky (např. imunitního systému), podléhá zasažená buňka signálům těchto buněk, které ji mohou směřovat např. k apoptóze nebo zastavení buněčného cyklu. Z tohoto důvodu je pro úspěšnou transformaci nezbytné, aby se nádorové buňky staly necitlivé k těmto signálům. Apoptóza (řízená buněčná smrt) je vedle reparačních systémů eukaryotické buňky běžný mechanismus,

jak se vypořádat s poškozením DNA. Pokud nelze poškození opravit např. nukleotidovou excizní reparací, podstupuje buňka sama za běžných okolností apoptózu. Není tedy překvapením, že **narušení apoptózy** (jak vnějších, tak vnitřních apoptotických drah) je u nádorových buněk běžný jev. U lidí jsou mutace v genech kontrolujících apoptotické anebo reparační procesy spojeny s dědičnými nádorovými syndromy.

I když jsou nádorové buňky velmi odolné proti vlivům svého prostředí, stále potřebují pro svůj život přísun živin a kyslíku. Z toho důvodu se u nádorových buněk často setkáváme se **zvýšenou angiogenezí** (tvorbou nových krevních kapilár), která umožní nádorovým buňkám tvořit větší uskupení (nádory). Poslední a zpravidla nejnebezpečnější vlastností nádorových buněk je **tvorba metastáz**. Metastázy jsou sekundární ložiska nádorového bujení, která vznikají v důsledku vycestování nádorových buněk mimo primární nádor. Tato schopnost je obvykle spojena s narušením funkce genů zajišťujících buněčnou adhezi. Buňky s narušenou adhezí mohou být následně roznášeny krevními cestami do dalších orgánů a stávají se základem metastáz. Ne všechna nádorová onemocnění získají tuto schopnost.

Mechanismy vzniku nádorových onemocnění u domácích zvířat jsou principiálně stejné jako u lidí a modelových savčích druhů. Některá nádorová onemocnění domácích zvířat mohou sloužit jako modely ke studiu těchto onemocnění, například melanom u prasat nebo viry indukované nádory u kura.

6. Dědičná onemocnění a vrozené vývojové vady domácích zvířat

Dobrý zdravotní stav je jedním z ekonomicky významných znaků a je základním předpokladem užitkovosti. Zdraví je nejenom podmínkou pro dosažení šlechtitelského cíle, ale může samo o sobě být předmětem šlechtění. Mezi geny, které ovlivňují zdravotní stav, patří:

- geny, jejichž mutace způsobují dědičná onemocnění (DO) a vrozené vývojové vady (VVV)
- geny, které ovlivňují vnímavost a rezistenci k onemocněním (viz kap. Genetická odolnost a vnímavost k nemocem u zvířat, Imunogenomika a imunogenetika)

Onemocnění a VVV, jejichž příčinou je poškozená genetická informace buňky, tedy mutace, označujeme jako **onemocnění genetické**. Z hlediska dědičnosti je důležité, kdy k mutaci došlo. Je-li mutace přítomna v buňkách zárodečné linie, tedy rodičovských gametách nebo budoucích gametách jedince, jde o tzv. **gametickou (zárodečnou)** mutaci. Onemocnění a VVV vzniklé gametickou mutací jsou přenosné na potomstvo - jsou tedy **dědičné**. Gametické mutace se mohou projevat různě – mohou být neslučitelné se životem (pak dochází k embryonální mortalitě nebo abortům v různých fázích gravidity, tyto mutace se označují jako letální faktory) nebo dávají vznik dědičným VVV a onemocněním.

Mutace, ke kterým dojde v jiných než zárodečných buňkách, označujeme jako mutace **somatické**, protože jsou přítomny pouze v somatických a nikoli pohlavních buňkách. Tyto mutace se nepřenáší do dalších generací a vyskytují se pouze u dceřiných buněk - klonů, které vznikly dalším dělením buňky postižené somatickou mutací. K somatickým mutacím může docházet v průběhu různých fází ontogeneze, tedy i prenatalně, a dá se říci, že čím dříve k mutaci dojde, tím větší rozsah poškození lze očekávat. Nejvíce devastující jsou mutace, ke kterým dojde v období kritické periody vývoje daného morfogenetického (orgánového) systému. Prenatální somatické mutace se nejčastěji manifestují jako VVV. Stejný dopad jako prenatalní somatické mutace mohou mít poškození plodu vyvolaná environmentálními faktory, které působí prostřednictvím interference s expresí atd. Somatické mutace ale mohou vznikat i po narození a v průběhu dalšího života jedince. Typickým příkladem jsou nádorová onemocnění, která jsou následkem mutací tumor-supresorových genů (mechanismem ztráty heterozygotnosti) nebo následkem mutací indukovaných přeměn protoonkogenů na onkogeny.

V souvislosti s genetickými onemocněními je třeba ještě definovat termíny vrozené (kongenitální) a familiální onemocnění. **Vrozené** onemocnění je takové, které je manifestováno a dá se rozpoznat při narození jedince. Příkladem takového onemocnění je třeba cyklická neutropenie kolíí, dědičná autosomálně recesivně, nebo polydaktylie, dědičná autosomálně dominantně. Je třeba si ale uvědomit, že ne všechna vrozená onemocnění jsou dědičná (mohou být způsobena i somatickými mutacemi nebo působením environmentálních faktorů, např. rozštěpové vady) a naopak, že ne všechna dědičná onemocnění jsou vrozená (např. progresivní retinální atrofie nebo kardiomyopatie se manifestují často až v dospělosti). **Familiální** onemocnění je takové, které se v určitých rodinách vyskytuje častěji než v okolní populaci. Příčinou může být dědičná vada, která v rodině segreguje, ale také jiné faktory, které v rámci rodiny postižené jedince spojují (např. obydlí u zdroje radonu nebo potravní preference). Tedy i pro familiální onemocnění platí, že mohou, ale nemusí být dědičná.

6.1 Dědičná onemocnění

Dědičná onemocnění jsou způsobena mutacemi v zárodečné linii a přenosná pohlavními buňkami na další generace. V závislosti na charakteru a lokalizaci kauzální mutace/mutací rozeznáváme dva hlavní typy dědičnosti – mendelistický a nemendelistický.

6.1.1 Mendelistický typ dědičnosti

Mendelistická dědičnost je pravidelná dědičnost jednoduchých, nejčastěji monogenně založených znaků.

Autosomálně dominantní (AD) dědičnost. U tohoto typu dědičnosti nastala kauzální mutace v genu lokalizovaném na autosomu a mutantní alela se chová dominantně. Dominantní účinek alely A znamená, že překryje projev recesivní alely a . Heterozygoti (Aa) a dominantní homozygoti (AA) jsou nemocní a recesivní homozygoti (aa) jsou zdraví. Variantou AD dědičnosti je neúplná dominance, kdy síla projevu závisí na počtu přítomných dominantních alel, tedy je rozdíl mezi heterozygoty a dominantními homozygoty (např. svalová hyperplazie u psů). Některé mutace mají tak zásadní účinek, že v homozygotním stavu působí jako letální

faktory (např. polycystická choroba ledvin u koček, PKD) a přežívají pouze heterozygoti. Tento jev se někdy označuje poněkud matoucím termínem dominantní dědičnost s recesivním letálním účinkem.

Autosomálně recesivní (AR) dědičnost. U tohoto typu dědičnosti je gen s kauzální mutací rovněž lokalizován na autosomu, ale mutantní alela se chová recesivně. To znamená, že její účinek je překryt účinkem dominantní alely, je-li přítomna, a aby došlo k projevu onemocnění, je třeba dvou recesivních alel. Nositelé genotypu *aa* jsou nemocní, heterozygoti *Aa* jsou zdraví přenašeči vady a homozygoti *AA* jsou zdraví. Recesivní mutace jsou většinou ztrátové, tj. takové, které způsobí ztrátu funkce kódovaného proteinu (předčasný stop kodon vedoucí zkrácení proteinu, SNP vedoucí k záměně AK ve funkční doméně proteinu aj.). Ztráta funkce poloviny produktů genu je u heterozygotů kompenzována funkčními produkty dominantní alely (např. u enzymatických poruch vystačí aktivita enzymu produkovaného dominantní alelou k pokrytí potřeb organismu) a nedochází tak k projevům onemocnění. Právě heterozygotnost u AR onemocnění bývá problémem při jejich eliminaci. Na rozdíl od AD vad, kde se i jen jedna mutantní alela manifestuje ve fenotypu, u AR onemocnění je třeba vyhledávat heterozygoty – skryté nositele vady pomocí testů heterozygotnosti (viz kap. Eliminace DO a VVV). AR dědičnost je u monogenních DO a VVV domácích zvířat nejčastějším typem dědičnosti.

Dědičnost vázaná na pohlaví. U tohoto typu dědičnosti se kauzální gen nachází na pohlavních chromozomech - **gonozomech**. Z genetického hlediska rozlišujeme na gonozomech tři oblasti:

- pseudoautosomální oblast chromozomů X a Y – homologní segmenty těchto chromozomů. Tato oblast je důležitá pro párování chromozomů v průběhu meiózy. U domácích zvířat je tato oblast krátká a nenachází se zde žádné významné geny. U bezobratlých a ryb je tento segment delší a geny zde umístěné vykazují v podstatě autosomální dědičnost.
- diferenciální segment chromozomu Y – v heterologních segmentech gonozomů leží geny kódující pohlavní znaky. Na chromozomu Y leží lokus SRY (sex determining region), který rozhoduje o přítomnosti varlat. U domácích zvířat v tomto úseku dosud nebyly popsány žádné geny zodpovědné za DO, VVV nebo užitkové znaky. Geny ležící v tomto úseku nepodléhají rekombinaci při meióze a předávají se pouze z otce na syna – tzv. **holandrický** typ dědičnosti.
- diferenciální segment chromozomu X – v heterologním segmentu chromozomu X se nachází celá řada genů a mutace v nich jsou zodpovědné za vznik některých DO i u

domácích zvířat. Dědičnost těchto znaků se označuje jako **X-vázaná** nebo zjednodušeně **gonozomální** (i když je tento výraz nepřesný, používá se většinou právě pro popis X-vázané dědičnosti, protože prakticky všechny geny pro významné znaky a DO uložené u domácích zvířat na gonozomech jsou právě v heterologním segmentu chromozomu X). Také u X-vázané dědičnosti rozlišujeme dominantní a recesivní typ:

X-vázaná dominantní (XD) dědičnost. U domácích zvířat se tímto způsobem nedědí žádné známé DO, avšak některé znaky exteriéru ano (např. lokus O u koček, kde dominantní alela zodpovídá za produkci oranžového typu pheomelaninu namísto černého eumelaninu). U lidí tuto dědičnost vykazuje např. vit. D rezistentní rachitis (hypofosfatémie). V případě XD dědičnosti pozorujeme v potomstvu více postižených dcer (protože od postiženého otce $X^A Y$ budou všechny dcery rovněž nemocné – dostanou X^A , zatímco synové dostanou Y ; matka $X^A X^a$ předá svůj X^A chromozom potomkům obou pohlaví se stejnou pravděpodobností 50%).

X-vázaná recesivní (XR) dědičnost. Tento typ dědičnosti je u gonozomálních monogenních vad nejčastější. Dědí se tak např. hemofilie u řady druhů, syndrom SCID u basetů nebo daltonismus u lidí. V případě XR dědičnosti je nutné si uvědomit, že samci jsou pro chromozom X hemizygotní (tj. mají pouze jeden) a nemohou být heterozygotními skrytými nositeli vady. Tedy účinek X-vázané recesivní alely u nich nemůže být překryt účinkem dominantní alely, jako je tomu u heterozygotních samic. Na základě fenotypu u nich proto můžeme přesně určit genotyp: nemocný samec musí být $X^a Y$, zdravý samec musí být $X^A Y$. U XR dědičnosti nacházíme v potomstvu více nemocných samců než samic (synové matky přenašečky $X^A X^a$ mají šanci 50%, že od ní dostanou X^a a budou nemocní; její dcery mají rovněž šanci 50% na získání X^a , avšak aby byly nemocné, musely by zároveň získat X^a také od nemocného otce). Nejčastěji proto pozorujeme situaci matka přenašečka a postižený syn. Při sledování rodokmenu zjistíme, že onemocnění má tendenci přeskakovat generaci (nemocný dědeček má dceru přenašečku a nemocného vnuka).

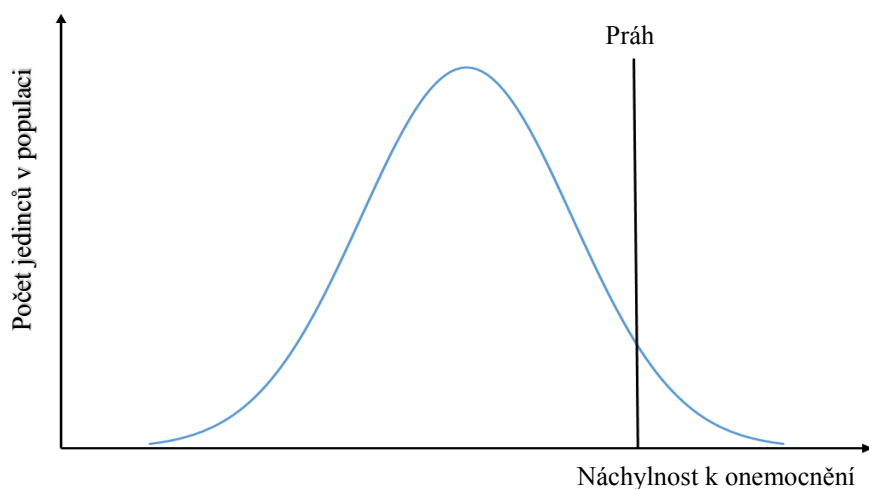
6.1.2 Nemendelistická dědičnost

Nemendelistická dědičnost je souhrnné označení pro více typů dědičnosti s odlišným genetickým principem, jejichž společným znakem je omezená schopnost predikce výsledků křížení, tedy určitá nepravidelnost. Realizace genotypu do fenotypu je u nich ovlivněna různými

modifikujícími faktory. Pro domácí zvířata má největší význam multifaktoriální typ dědičnosti; zbývající typy – mitochondriální dědičnost, imprinting a dynamické mutace – jsou zatím významné spíše v humánní medicíně.

Multifaktoriální dědičnost. Pro tento typ dědičnosti je charakteristické, že na výsledném fenotypu se podílí více různých genů (ne vždy se stejnou intenzitou účinku) a zároveň faktory prostředí. Obě složky – genetická a environmentální – představují dvě skupiny proměnných a jejich výsledná kombinace určuje fenotypový projev (viz také rozklad fenotypové variance kap. Genetika kvantitativního znaku). Multifaktoriální dědičnost tak vysvětluje vztah mezi genotypovou a fenotypovou variabilitou a týká se komplexních znaků.

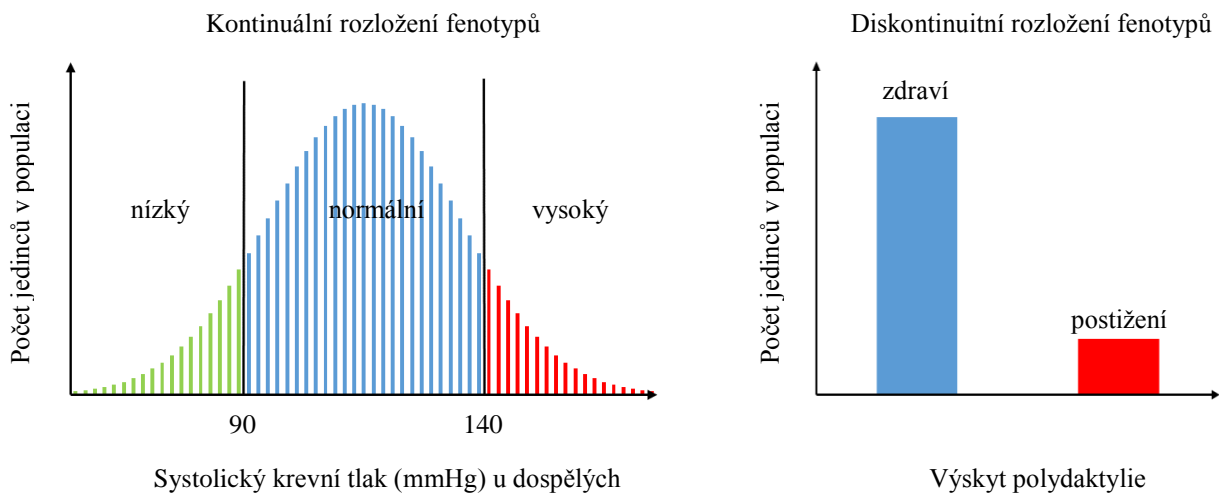
Genetická složka se u multifaktoriální dědičnosti označuje jako **genetická predispozice**. Na sledovaném znaku se svým účinkem podílí větší množství genů, jejichž alely dané kombinací průběžně nahromaděných SNP mohou mít účinek pozitivní, neutrální nebo negativní, a souhrnný genotyp jedince ve všech těchto genech určuje jeho genetickou predispozici. Mnoho alel mnoha genů vytváří velké množství možných kombinací. Na úrovni populace nalezneme **kontinuální variabilitu genotypů**, která sleduje gaussovské rozdělení četností. V populaci se tedy bude vyskytovat menší množství jedinců s velmi rizikovým genotypem, menší množství jedinců s velmi odolným genotypem a většina populace bude mít genotyp v okolí průměru. Také environmentální faktory, které na jedince této populace působí, vykazují značnou variabilitu. Někteří jedinci budou vystaveni převážně pozitivním faktorům, někteří převážně negativním, a většina populace bude vystavena různým kombinacím jak pozitivních, tak negativních faktorů. Kombinace genetické predispozice (genotypu) a působících faktorů prostředí se označuje **náchylnost k onemocnění** (liability) a je u každého jedince definována unikátní kombinací jeho genotypu a na něj působících faktorů prostředí. Pokud bychom sledovali náchylnost ke sledovanému onemocnění v rámci celé populace, zjistíme opět, že rozložení náchylnosti v této populaci vykazuje kontinuální variabilitu a sleduje Gaussovu křivku (obr. 8).



Obr. 8: Distribuce náchylnosti (liability) k onemocnění u multifaktoriálních znaků

Pro multifaktoriální DO je charakteristické, že dosažením určité kombinace genotypu a prostředí překročí náchylnost k onemocnění tzv. práh, a onemocnění se projeví. Toto se označuje jako **prahový model** dědičnosti multifaktoriálních onemocnění. Pozorovaná distribuce fenotypů v populaci – fenotypová variabilita – pak může mít dvě různé formy (viz ilustrativní příklady na obr. 9):

- **diskontinuitní fenotypová variabilita** – pozorujeme pouze dva fenotypy, podprahové (normální, zdravé jedince) a nadprahové (nemocné jedince). Znak zůstává latentní a projeví se pouze po překročení prahu. Znak má tedy kvalitativní projev typu ano/ne a nelze jej řádně kvantifikovat. Většina VVV a některá onemocnění v dospělosti s dědičnou predispozicí mají tento charakter (např. cukrovka, morfologické vady).
- **kontinuální fenotypová variabilita** – pozorujeme souvislou škálu jednotlivých fenotypů, které plynule přechází jeden v druhý. Fenotypy lze kvantitativně hodnotit a jejich distribuce v populaci je vyjádřena Gaussovou křivkou. Rozlišujeme zde fenotypy normální, podprahové a fenotypy patologické, nadprahové, přičemž patologický stav vzniká plynule překročením určité empirické hodnoty. Jako příklad lze uvést např. výšku krevního tlaku, kdy normální hodnoty pozvolna přechází v hodnoty patologické (v tomto případě na obou stranách křivky; někteří jedinci budou mít příliš nízký tlak, většina populace má tlak v normálním rozmezí, a někteří jedinci budou mít tlak příliš vysoký).



Obr. 9: Rozdílné typy fenotypové distribuce v populaci u prahových multifaktoriálních znaků

Je důležité si uvědomit, že k překročení prahové hodnoty náchylnosti může dojít mnoha různými způsoby, tedy různými kombinacemi genotypů a faktorů prostředí. Například dysplazie kyčelního kloubu (DKK) u psů je ovlivňována jednak genetickou predispozicí a jednak faktory jako je výživa a fyzická zátěž organismu. Přesto se u jedinců s vyšší genetickou predispozicí chovaných v ideálních podmínkách DKK nemusí projevit, zatímco u jedinců s nízkou predispozicí, avšak špatně krmených a pod vysokou fyzickou zátěží může být DKK diagnostikována.

U multifaktoriálních onemocnění vyvstává problém ve vztahu ke šlechtění. Řada těchto onemocnění se objevuje zcela nenáhodně jako tzv. **konstituční vady**, které jsou důsledkem jednostranného šlechtění na některé znaky užitkovosti při zanedbání fyziologických požadavků organismu. Například u prasat vedlo šlechtění na délku hřbetu ke změnám zaúhlení a podsouvání pánevních končetin a zvýšenému výskytu hřbetní kyfózy a onemocnění šlach. Dřívější exteriérový standard u německých ovčáků vyžadující určitý tvar těla a postavení končetin zase vedl k vysokému výskytu DKK u tohoto plemene. U perských a exotických koček se vyskytuje brachycefalický syndrom jako důsledek šlechtění na plochou obličejovou část lebky. Šlechtění na některé znaky (užitkovost, exteriér) tedy specificky přibližuje **genotypovou náchylnost k prahové hodnotě fenotypového projevu** a u extrémních fenotypů je korelace mezi genotypem a fenotypem vysoká.

Mitochondriální dědičnost. Tento typ dědičnosti vykazují onemocnění způsobená mutacemi v mitochondriální DNA (mtDNA). V mtDNA savců se nalézá 37 genů. Část z nich kóduje enzymy důležité pro procesy oxidativní fosforylace, a protože mtDNA má svůj vlastní genetický kód, zbytek genů kóduje t-RNA a r-RNA, které umožňují expresi genů pro tyto enzymy. Mutace v mtDNA se tedy projevují především poruchami energetického metabolismu buňky. Tyto mutace se dědí po **maternální linii**, protože mitochondrie spermií zanikají brzy po oplodnění a veškeré mitochondrie pro další vývoj zygoty poskytuje vajíčko. Proces rozdělování mitochondrií v průběhu buněčného dělení je náhodný, stochastický, což znemožňuje přesný odhad podílu mutantní mtDNA v dceřiných buňkách a tedy i odhad stupně postižení potomka. Buňky, které obdrží příliš velký podíl mutantní mtDNA, podléhají většinou apoptóze (programované buněčné smrti). Apoptóza je tak jedním z procesů, který zabraňuje hromadění mitochondriálních mutací. U domácích zvířat zatím neznáme onemocnění, které se dědí tímto způsobem. U lidí způsobují mitochondriální mutace závažná až fatální onemocnění.

Dynamické mutace: expanze trinukleotidových repeticí. Některé oblasti lidského genomu, které obsahují repetitivní úseky trinukleotidů, jsou v průběhu meiózy nebo mitózy chybně replikovány a dochází ke zvýšení počtu kopií těchto trinukleotidů v dceřiných řetězcích (např. v oocytu bude místo 25 opakování sekvence CAG, které bychom našli v primordiální zárodečné buňce, přítomno v příslušném místě 30 opakování CAG). Od určitého počtu kopií vznikají v organismu patologické změny, jejichž manifestace závisí na amplifikovaném lokusu. Počet nadbytečných kopií, které při replikaci přibudou, nelze předvídat, neboť zatím neznáme přesně mechanismy jejich vzniku, a může docházet i k reverzním mutacím, tedy snížení počtu kopií. Počet nadbytečných kopií může být ovlivněn i epigenetickými mechanismy – u některých onemocnění jich vzniká více v průběhu oogeneze, u dalších naopak při spermiogenezi. Dynamické mutace vykazují prahový charakter – oblast repeticí se stává nestabilní po překročení určitého počtu opakování, většinou 30 - 40. Typickým rysem je pak průběžné zvyšování počtu kopií u každé z dalších generací. Z těchto důvodů se expanze trinukleotidových repeticí označují také jako **dynamické mutace**. Okamžikem, kdy je dosaženo daného prahu, se onemocnění dědí v rodinách mendelisticky jako autosomálně dominantní. Například Huntingtonova choroba (neurodegenerativní onemocnění, AD) vzniká v důsledku tvorby příliš dlouhého polyglutaminového řetězce v proteinu zvaném huntingtin. Počet glutaminů je dán počtem repetitivních trinukleotidů CAG v příslušném genu – jedinci, kteří mají 28-35 repetitivních CAG, většinou nevykazují příznaky, avšak tento počet již je nestabilní při replikaci a je pravděpodobné, že jejich potomci získají kopie genu s počtem repetitivních CAG

vyšším než 36. Toto riziko je vyšší, předává-li mutantní alelu otec. Čas nástupu onemocnění a jeho závažnost závisí významně na počtu kopií CAG, čím více jich jedinec má, tím dříve a intenzivněji se onemocnění projeví - tzv. genetická anticipace. Tento charakter vykazují i další onemocnění způsobená dynamickými mutacemi, např. syndrom fragilního X-chromozomu nebo myotonická dystrofie. U domácích zvířat byly tento typ onemocnění popsán jen vzácně, například u psů (spinocerebelární ataxie u plemene Italský Spinone způsobená repeticí GAA v genu *ITPRI*).

Genomový imprinting. Genomový imprinting je epigenetický mechanismus, při kterém jsou některé oblasti genomu biochemicky modifikovány (metylace cytosinu, modifikace histonů) a jejich aktivita je tím potlačena. K imprintingu dochází především v průběhu meiózy, přičemž charakteristickým znakem je, že při oogenezi jsou imprintovány jiné oblasti genomu než při spermiogenezi. Výsledkem pak je stav, kdy matka předává potomkovi sadu aktivních (nebo potenciálně aktivních) genů, která je mírně odlišná od sady otcovské – rozdíly jsou právě v odlišně imprintovaných oblastech. Důkazem tohoto jevu je například křížení osel × kůň. Potomkem klisny a osla je mula, potomkem oslice a hřebce je mezek. Muly a mezci se od sebe fenotypově liší právě proto, že od rodičů dostali mírně odlišnou kombinaci aktivních genů obou živočišných druhů. Alely genů v imprintovaných oblastech segregují stejně jako u normální mendelistické dědičnosti, avšak jejich fenotypový projev v těchto případech závisí i na tom, od kterého z rodičů přišla daná alela. Tento jev se nazývá **polární superdominance**. U domácích zvířat pozorujeme polární superdominanci u tzv. kalipygie ovcí, která se vyznačuje hypertrofií svaloviny hýždí. Maso těchto ovcí je suché a tuhé. Tento znak je u ovcí nežádoucí a projevuje se pouze u heterozygotů, kteří získali mutovanou alelu od otce. Mutace zvyšuje expresi sousední oblasti chromozomu, která je imprintována – otcovské aktivní geny zahrnují jeden z růstových faktorů pro svalovinu, zatímco mateřské aktivní geny jsou geny pro miRNA, která mRNA pro tento růstový faktor rozkládá. Odchylka od mendelistické dědičnosti je tedy dána úlohou pohlaví rodiče, který předává kauzální mutaci.

6.2 Vrozené vývojové vady (VVV)

Vrozené vývojové vady (VVV) jsou poruchy vývoje plodu patrné při narození. Věda zabývající se problematikou VVV se nazývá **teratologie**, faktory schopné navodit vznik VVV jsou **teratogeny**. Mohou vzniknout různými etiopatogenetickými mechanismy:

- poškozením genetické informace buňky – mutací. Mutace mohou být na úrovni DNA nebo na úrovni chromozomů. Mutace mohou již být přítomny v rodičovských gametách, mohou vznikat *de novo* v somatických buňkách v průběhu vývoje plodu působením různých faktorů (viz dále), ale mohou vznikat spontánně (bez zjevné příčiny).
- interferencí patogenní noxy s genovou expresí v buňce – zásahem do regulace transkripce a translace
- interferencí s fyziologickými procesy na úrovni organismu i jednotlivých buněk
- přímým poškozením tkání organismu

Prostřednictvím těchto mechanismů působí celá řada environmentálních faktorů - **teratogenů**, které lze shrnout do třech kategorií – **fyzikální, chemické a biologické**. Z hlediska vzniku VVV jsou z fyzikálních faktorů důležité především ionizující záření a působení mechanických inzultů. UV záření, ačkoliv silný mutagen a karcinogen neproniká do plodu a tudíž pro něj nemá teratogenní účinky. Faktory chemické zahrnují zejména pesticidy, těžké kovy, PCB a různá farmaka. Mezi faktory biologické patří některé viry (např. BVD), bakterie (*Brucella spp.*, *Listeria monocytogenes*) nebo paraziti (*Toxoplasma gondii*). Řadíme sem i toxiny produkované některými jedovatými rostlinami (starček, proso) nebo plísněmi (aflatoxiny). Mutace, ať již zděděné, spontánní či indukované právě působením jmenovaných environmentálních faktorů samostatně označujeme jako **genetické faktory** či příčiny vzniku onemocnění a VVV.

6.3 Diagnostika, eliminace a prevence DO a VVV

6.3.1 Diagnostika DO

Vyskytne-li se v chovu podezření na výskyt DO nebo dědičné VVV a je indikováno genetické vyšetření, je prvořadým úkolem řádná diagnostika onemocnění, z genetického pohledu správná fenotypizace. Klinické vyšetření by mělo kromě základního vyšetření zahrnovat dle potřeby i speciální vyšetření krve, moči, USG, RTG nebo cytogenetické vyšetření dle indikace. V případě úhynu je nutná důkladná pitva. Po určení nosologické jednotky (alespoň rámcově, např. hemolytická anémie) můžeme přikročit k rozhodování o dědičnosti vady.

Diagnostiku dědičnosti nově se objevujících onemocnění provádějí specializovaná, často univerzitní pracoviště. Vychází se z důkladné rodinné anamnézy předků, sourozenců nebo potomků. U zvířat lze v některých případech provést hybridizační pokus, kdy se využívá příbuzenské plemenitby nebo známých heterozygotů. Na základě analýzy segregace znaku v rodokmenu pak můžeme stanovit možný typ dědičnosti. Podezření na konkrétní dědičné onemocnění můžeme také vyslovit na základě znalosti plemenné příslušnosti jedince, za předpokladu správně definovaného fenotypu. V současné době se však s rozvojem genomiky diagnostika soustřeďuje na co nejrychlejší identifikaci kauzálních mutací a vypracování genetického diagnostického testu. Existuje několik veřejně dostupných databází, které shromažďují získané informace o dědičných onemocněních u zvířat, a ve kterých lze dle vybraných kritérií vyhledávat (viz kap. Přehled prakticky významných DO a VVV u domácích zvířat).

Praktický veterinární lékař může pro chovatele vyslovit podezření na dědičnost určité choroby na základě literárních údajů a znalosti jejího výskytu a dědičnosti u daného plemene, na základě posouzení familálního výskytu, případně, zejména u VVV na základě vyloučení vlivu potenciálních faktorů vnějšího prostředí.

Diagnostika a pravidelná dědičnost onemocnění mohou být komplikované v důsledku výskytu některých dalších faktorů:

- **fenokopie** – onemocnění, které je fenotypově shodné s některým dědičným onemocněním, avšak samo o sobě je vyvoláno nedědičnými faktory (somatickými mutacemi, environmentálními nebo iatrogenními faktory)
- **genetická heterogenita** onemocnění (genokopie) – tedy situace, kdy jedno onemocnění může být způsobeno různými mutacemi v různých genech, případně různými mutacemi v tom stejném genu (tzv. mikroheterogenita). Tento jev je typický např. pro progresivní retinální atrofie nebo syndrom SCID u psů. Pro různá plemena bývají specifické různé mutace, vedoucí však ke stejnému fenotypu.
- **neúplná penetrance** – jev, kdy ne u všech jedinců se stejným genotypem se tento genotyp projeví i ve fenotypu (ne vždy genotyp pronikne do fenotypu). Tento jev má charakter spíše statistický a lze jej kvantifikovat. Penetrance znaku v populaci se udává v procentech – např. 90% penetrance značí, že u 10 % jedinců se znak neprojeví, ačkoliv mají příslušný genotyp. Neúplná penetrance může být způsobena genovými interakcemi, vnějšími faktory prostředí nebo prostě chybou ve fenotypizaci.

- **různá expresivita** – různá míra exprese (síla vyjádření) znaku mezi jedinci stejného genotypu. Příčiny mohou být opět interakce různých genů, vnější faktory prostředí nebo epigenetické změny. V obou předchozích případech se pod pojmem interakce genů skrývá upozornění, že jedna a tatáž mutace může mít v různých genomech různé projevy.

6.3.2 Eliminace DO a VVV

Předpokladem efektivních snah o eliminaci dědičných mutací v chovech zvířat je jejich ekonomická významnost a znalost způsobu dědičnosti, optimálně pak znalost kauzální mutace. U autosomálně recesivních mutací bývá často nutná individuální identifikace skrytých nositelů mutantních alel – heterozygoty. V populacích v Hardyho-Weinbergově rovnováze bývá počet heterozygotů řádově vyšší, než počet postižených jedinců (např. ve stádě, kde je 1000 zvířat a z nich 4 postižení jedinci, lze očekávat 118 heterozygotů). V chovech, kde se využívá umělá inseminace a embryotransfer může dojít k masivnímu rozšíření genotypu plemeníka, který byl nerozpoznaným heterozygotem (viz kap. Genetika a reprodukce).

Testy heterozygotnosti u domácích zvířat mohou být dvojího typu:

V případě, že není k dispozici test DNA na přítomnost kauzální mutace, je v urgentních případech možné využít **testy podle potomstva** pomocí testovacích křížení. Tento postup je založen na hybridologické analýze, kdy testovaného jedince zkřížíme s recesivním homozygotem, známým heterozygotem nebo alespoň možným jiným heterozygotem (dcery testovaného jedince nebo dcery známého heterozygota). Výpočtem se pak stanoví, kolik potomků musí být zdravých (za předpokladu, že se nevyskytne žádný nemocný), aby se stanovenou pravděpodobností (většinou > 99%) šlo říci, že testovaný jedinec není heterozygot. U skotu nebo prasat se vyhodnocuje výskyt postižených potomků v potomstvu testovaných plemeníků (tzv. automatický test). V minulosti se tyto postupy skutečně využívaly v praxi, v dnešní době je vytlačila existence testů DNA daná i jejich většinou velmi rychlou identifikací.

Testy DNA, jsou založeny na různých variantách PCR a sekvenování. Kromě testování heterozygotnosti je lze využít i pro potvrzení diagnózy. DNA testy pro různé druhy a plemena jsou v nabídce řady komerčních i výzkumných genetických laboratoří. Rozlišujeme dva typy testů:

- a) **přímé DNA testy** – detekují přímo kauzální mutaci a mají vysokou přesnost (více než 99 %). Je jich naprostá většina aktuální nabídky.
- b) **nepřímé DNA testy** – jsou založeny na detekci a genotypizaci polymorfního markeru (většinou SNP nebo mikrosatelit), který leží v blízkosti kauzální mutace a je s ní ve vazbě. Tyto testy mají nižší přesnost (95%), protože nelze vyloučit možnost rekombinace při crossing-overu. Toto riziko se vzdáleností markeru od kauzální mutace narůstá. Nepřímé DNA testy se využívají v případech, kdy neznáme přesně kauzální mutaci nebo ji z technických důvodů nelze typizovat přímo.

Rozhodnutí o způsobu vlastní eliminace DO je na chovatelích, veterinární lékař může vystupovat v roli odborného poradce. V některých případech je selekce na základě DNA testu nebo výskytu postižených jedinců ustavena jako povinnost, v jiných je na osobním rozhodnutí každého chovatele. Tato praxe se může podstatně lišit u hospodářských a společenských zvířat. U hospodářských zvířat, kde se běžně využívá umělé inseminace, případně embryotransferu a tudíž hrozí rychlé rozšíření vady původem od jednoho plemeníka v populaci, se provádí povinné testování na nositelství vybraných vad (BLAD, PSS) a komplexní kontrola dědičnosti zdraví (KDZ). U testovaných plemeníků se sleduje zdravotní stav potomstva včetně sledování výskytu VVV. Výskyt chorob a VVV u potomků se zaznamenává a porovnává s výskytem u potomků jiných zvířat. Pokud se potomstvo testovaného plemeníka statisticky významně odchyluje, je tento plemeník vyřazen, aniž by byl zjišťován dědičný původ zaznamenaných vad. Individuální diagnostika dědičnosti se provádí ve výše zmíněných indikovaných případech. Jde tedy o statistický přístup ke kontrole DO a VVV a uplatňuje se u skotu, prasat a drůbeže. Značným problémem obecně jsou některé multifaktoriální nemoci nebo vady, jako je například DDK u psů nebo některé konstituční vady u prasat. I zde se hledají cesty k molekulární diagnostice, zejména s využitím markerů identifikovaných cestou GWAS.

6.4 Přehled prakticky významných DO a VVV u domácích zvířat

Výskyt VVV u domácích zvířat je prakticky stejný u všech druhů. Většina vad je způsobena faktory prostředí a výskyt těchto faktorů v běžných chovech domácích zvířat je srovnatelný. Snad jedinou výjimkou je chov drůbeže, kde se s dědičnými VVV setkáváme minimálně a zjišťované vady lze připisovat téměř vždy technologickým vadám v procesu kontroly líhnutí. Výskyt dědičných VVV a onemocnění obecně souvisí především se **způsobem plemenitby**, který se v daném chovu praktikuje. Tam, kde je plemenitba založená na podobnosti rodičů a potomků, tedy u skotu, koní, psů, koček a případně ve šlechtitelských chovech prasat, se vyskytují především monogenní vady vázané na určité plemeno. Nebezpečí rozšíření monogenních chorob je umocněno využíváním biotechnologií jako umělá inseminace a embryotransfer. V chovech, kde je plemenitba založená na efektu heterozy, tedy zejména v rozmnožovacích chovech prasat, pozorujeme spíše konstituční vady a multifaktoriální onemocnění související s intenzivním šlechtěním na užitkovost.

V současné době existuje řada databází dostupných online, které shromažďují údaje o dědičných onemocněních u člověka i zvířat, přičemž v souladu s pokrokem genomiky se jejich seznamy neustále rozšiřují. Databáze OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals, <https://omia.org>) například poskytuje seznam všech mendelisticky dědičných znaků a onemocnění u zvířat, zatímco databáze OMIM je zaměřená na DO člověka. Databáze CIDD (cidd.discoveryspace.ca) je zaměřená na DO a VVV u psů, databáze MyBreedData (www.mybreeddata.com) přináší aktualizovaný přehled frekvencí mendelistických DO a VVV u psů různých plemen.

Dle databáze OMIA bylo v době přípravy tohoto textu (2019) známo 2847 dědičných onemocnění a znaků u domácích zvířat, z toho u 976 vad byla známa kauzální mutace. U skotu bylo zatím identifikováno 530 dědičných onemocnění a znaků, u prasat 267, u koní 235 a u psů 737. Vysoké počty DO u psů a skotu, které jsou v této databázi uvedené, lze vysvětlit vyšší mírou pozornosti, které se těmto druhům dostává. Stručný přehled DO a VVV u domácích zvířat přináší tabulka 3. Jejím cílem není detailní výčet známých DO a VVV (to vzhledem k výše uvedeným počtům ani není možné), ale spíše poskytnutí náhledu na danou problematiku s ohledem na aktuální situaci v chovech domácích zvířat.

Tab. 3: Přehled DO a VVV u jednotlivých druhů domácích zvířat

Zkratky: AR – autosomálně recesivní, AD – autosomálně dominantní, XR – X-vázaná recesivní, MF – multifaktoriální, LF – letální faktor, EM – embryonální mortalita, x – porucha, np – neúplná penetrance, nd – neúplná dominance, gh – genetická heterogenita. Zkratky plemen (není-li plemeno uvedeno, jde o výskyt u většího počtu různých plemen) : WSS – velšspringršpaněl, D – deerhound, BEA – bígl, GR – zlatý retrívr, DB – dobrman, STA – fríský ohař, NDO – něm. drátosrstý ohař, KO – něm. krátkosrstý ohař; PER – perská, EXO – exotická, BRI – britská krátkosrstá, ABY – habešská, SOM – somálská, NF – norská lesní, MCO – mainská mývalí, BUR – barmská, DRX – devonrex, SIA – siamská, KOR – korat.

Druh, plemeno	Onemocnění	Dědičnost, gen	Patogeneze, příznaky	DNA test
<i>Bos taurus</i> holštýnsko-fríské	Brachyspina	AR – LF <i>FANCI</i>	x oprav DNA; EM, zkrácení a fúze obratlů, malformace orgánů	ano
<i>Bos taurus</i> holštýnsko-fríské	CVM	AR – LF <i>SLC35A3</i>	x glykosylace proteinů; EM, komplexní vertebrální malformace - deformace C a Th obratlů, malformace končetin a srdce	ano
<i>Bos taurus</i> holštýnsko-fríské	BLAD	AR <i>CD18</i>	x adherence periferních neutrofilů ke stěnám cévy; opakované těžké infekce a úhyn	ano
<i>Bos taurus</i> holštýnsko-fríské	DUMPS	AR – LF <i>UMPS</i>	x syntézy pyrimidinů; EM do 40. dne gestace, snížená plodnost htz matek	ano
<i>Bos taurus</i> holštýnsko-fríské	citruinémie	AR <i>ASS</i>	x syntézy argininsukcinátu v cyklu ury; hromadění amoniaku, úhyn do týdne věku	ano
<i>Bos taurus</i> holštýnsko-fríské	hypcholesterolémie HCD	AR <i>APOB</i>	x transportu lipidů; chronický průjem, malnutrice a úhyn	ano
<i>Bos taurus</i> švýcarské hnědé, simental	arachnomélie	AR – LF <i>SUOX</i> <i>MOCS1</i>	x metabolismu kostní tkáně; dlouhé fragilní kosti končetin, výrazná deformace lebky	ano
<i>Bos taurus</i> švýcarské hnědé, holštýnsko-fríské	spinální atrofie SMA	AR <i>KDSR</i>	progresivní atrofie svaloviny, neuronální degenerace, úhyn do 1 měsíce	ano

<i>Bos taurus</i> švýcarské hnědé	spinální dysmyelinizace SDM	AR <i>SPAST</i>	x myelinizace; hyperextenze končetin, opistotonus, eutanazie	ano
<i>Bos taurus</i> belgické modré	crooked tail CTS	AD – nd <i>MRC2</i>	svalová hypertrofie, spasmy svaloviny pánevních končetin a ocasu	ano
<i>Více druhů</i>	svalová hyperplazie a hypertrofie	různá <i>MSTN</i>	nárůst svalové hmoty, změna kvality masa, ovlivnění výkonnosti, spasmy	ano
<i>Bos taurus</i>		AR		
<i>Sus scrofa</i>		AD – nd		
<i>Ovis aries</i>		AR		
<i>Canis famil.</i>		AD – nd		
<i>Equus caball.</i>		kodomin.		
<i>Bos taurus,</i> <i>Sus scrofa dom.</i>	translokace 1;29 translokace 1;14		chromozomální aberace; plodnost nositelů	snížená cytoge- netické vyšetření
<i>Bos taurus,</i> <i>Ovis aries,</i> <i>Capra hirca</i>	freemartinismus		mikrochimérismus; pohlavních orgánů a neplodnost jalovic	x vývoje ano
<i>Ovis aries</i> suffolk	hereditární chondrodysplazie	AR <i>FGFR3</i>	prodloužené končetiny, kostí, nedostatečné osvalení	deformace ano
<i>Ovis aries</i> karakulská	letální šed'	AR – LF	EM nebo časný úhyn, šedé zbarvení a vývoje GIT	x ne
<i>Capra hirca</i> núbijská	mukopolysacharidóza typu IIID	AR <i>G6-S</i>	lysozomální střádací neurologické příznaky	choroba, ano
<i>Sus scrofa dom.</i>	Stresový syndrom prasat PSS	AR <i>RYR1</i>	maligní hypertermie, svaloviny; viz kap. – Dědičné poruchy zdraví ovlivňující kvalitu živočišných produktů	nekróza ano
<i>Sus scrofa dom.</i> finský yorkshire	abnormality bičíku ISTS	AR <i>SPEF2</i>	snížená plodnost u kanců	ano
<i>Sus scrofa dom.</i>	Hernia scrotalis, inguinalis, umbilicalis	polygenní	kýly různého typu u selat	ne
<i>Sus scrofa dom.</i>	Atresia ani	polygenní	nevyvinutý řitní otvor, postížení	různá míra ne

<i>Sus scrofa dom.</i>	Roznožka selat (Splay leg syndrome)	MF	x adduktorů končetin, svalová slabost novorozených selat	ne
<i>Sus scrofa dom.</i> landrace	Pityriasis rosea	AD np?	dermatologické léze (prstencovitý erytém, papuly) ve věku 8-14t	ne
<i>Sus scrofa dom.</i>	Epitheliogenesis imperfecta	AR?	aplazie kůže nebo sliznic v ohraničených okrcích, souvisí s pohlavím (více u samců)	ne
<i>Sus scrofa dom.</i> duroc	maligní melanom	polygenní	predispozice ke vzniku melanomu v juvenilním věku	ne
<i>Equus caballus</i> arabský kůň	SCID	AR <i>DNA-PK</i>	x tvorby Ig, těžká kombinovaná imunodeficiencie	ano
<i>Equus caballus</i> arabský kůň	Lavender syndrome LFS	foal AR <i>MYO5A</i>	neurologické příznaky, spasmy, hyperextenze, typické „levandulové“ zbarvení, eutanazie nutná	ano
<i>Equus caballus</i> arabský kůň	cerebelární abiotrofie CA	AR <i>MUTYH</i>	x oprav DNA, neurologické příznaky, různá expresivita	ano
<i>Equus caballus</i>	PSSM1	AD <i>GYS1</i>	abnormální syntéza glykogenu, svalová ztuhlost, slabost a bolestivost (tying-up)	ano
<i>Equus caballus</i> quarter horse	hyperkalemická periodická paralýza HYPP	AD nd <i>SCN4A</i>	x transportu iontů, hyperkalémie, svalová slabost, třes, parézy	ano
<i>Equus caballus</i> quarter horse	hyperelastosis cutis HERDA	AR <i>PPIB</i>	ohraničené léze - kožní astenie a x elasticity, seromy	ano
<i>Equus caballus</i> quarter horse	maligní hypertermie MH	AD <i>RYR1</i>	x transportu Ca iontů, svalový třes, parézy, hypertermie a mtb acidóza	ano
<i>Equus caballus</i> quarter horse	letální Overo OLWS	AD nd LF <i>ENDRB</i>	x distribuce a diferenciacie kmenových buněk neurální lišty; htz – Frame Overo typ zbarvení; hmz – letální intestinální aganglióza	ano
<i>Equus caballus</i> quarter horse	GBED	AR <i>GBE1</i>	x tvorby glykogenu; svalová slabost, křeče, srdeční selhání	ano
<i>Equus caballus</i> německý teplokrevník aj.	laryngeální neuropatie RLN	?	jednostranná x inervace hrtanových chrupavek	ne

<i>Equus caballus</i> teplokrevníci	syndrom hříbat WFBS	fragilních	AR <i>PLOD1</i>	x tvorby kolagenu; varianta Ehler-Danlosova syndromu	ano
<i>Equus caballus</i> belgický, bretaňský tažný kůň, Percheron	junkční epidermolysis bulosa JEB		AR <i>LAMA3,</i> <i>LAMC2</i>	x tvorby lamininů; těžké laminitidy, rozsáhlé ulcerace, nutná eutanazie	ano
<i>Equus caballus</i> fríský kůň	dwarfismus		AR <i>B4GALT7</i>	x tvorby kolagenu, extracelulární matrix a uspořádání chondrocytů; různá expresivita	ano
<i>Equus caballus</i>	63 X0			chromozomální aberace; neplodnost klisen	cytogenetické vyš.
<i>Canis familiaris</i>	Degenerativní myelopatie DM		AR <i>SOD1</i>	Postupná paréza až paralýza pánevních končetin, x koordinace; pozdní nástup	ano
<i>Canis familiaris</i>	Progresivní atrofie PRA	retinální	převážně AR gh	Různé formy atrofie sítnice specifické pro plemeno	ano
<i>Canis familiaris</i>	Hyperurikosurie HUU		AR <i>SLC2A9</i>	Zvýšená hladina kys. močové v moči, tvorba urátů	ano
<i>Canis familiaris</i> kolie, ovčáci	Anomálie oka kolíí CEA		AR <i>NHEJ1</i>	Choroidální hypoplazie, kolobomy	ano
<i>Canis familiaris</i> retrívři, španělé aj.	Zátěži kolaps EIC	indukovaný	AR <i>DNM1</i>	x neurotransmise; svalová slabost, kolaps, hypertermie po zátěži	ano
<i>Canis familiaris</i> kolie, ovčáci aj.	MDR		AD nd	x transportu některých léčiv přes hematoencefalickou bariéru, jejich kumulace v nervové tkáni a neurotoxicita	ano
<i>Canis familiaris</i> DB, STA aj. NDO, KO	Von Willebrandova choroba typ 1 typ 2		AR <i>vWF</i>	snížená tvorba nebo defektní von Willebrandův faktor; krvácivost ze sliznic a kůže	ano
<i>Canis familiaris</i> DB aj.	dilatační kardiomyopatie DCM		AD nd, gh <i>PDK4</i>	x energetického mtb v mitochondriích kardiomyocytů; dilatace srdeční svaloviny, pozdní nástup účinku	ano
<i>Canis familiaris</i> GR	Ichtyóza		AR <i>PNPLA1</i>	x tvorby lipidové bariéry epidermis; nadměrné šupinatění kůže	ano
<i>Canis familiaris</i>	Primární luxace čočky		AR	x vláken závěsného aparátu oční čočky	ano

teriéri	PLL		<i>ADAMTS1</i> 7		
<i>Canis familiaris</i> WSS, D, BEA aj.	Deficit faktoru VII		AR	dysfunkce faktoru VII, nadměrná krvácivost po poranění	ano
<i>Canis familiaris</i>	Dysplazie kyčelního kloubu DKK		MF	Vrozená laxita kyčelního kloubu vedoucí k subluxacím a artritidě; vliv prostředí	ne
<i>Canis familiaris</i>	Dysplazie loketního kloubu		MF	Inkongruence kloubních ploch vedoucí k artritidě; různé typy a vliv prostředí	ne
<i>Canis familiaris</i>	Atopická dermatitida		MF	Hypersensitivita s manifestací v kůži – pruritus, kopřivka a sekundární změny	ne
<i>Felis catus</i> PER aj.	syndrom dolních cest močových FLUTD		MF	epizodické obtížné a bolestivé močení, cystitis a obstrukce uretry	ne
<i>Felis catus</i> BUR, SIA, NF, ABY	diabetes mellitus typ II		MF	PU/PD, ztráta hmotnosti	ne
<i>Felis catus</i> PER, EXO, BRI, DRX aj.	polycystické onemocnění ledvin PKD		AD nd LF <i>PKDI</i>	tvorba cyst v parenchymu ledvin, chronické renální selhání, pozdní nástup účinku	ano
<i>Felis catus</i> RAG, MCO aj.	hypertrofická kardiomyopatie HCM		AD nd, np, gh <i>MYBPC3</i>	zesílení stěny septa a komor, snížený srdeční výkon a selhání; pozdní nástup účinku	ano
<i>Felis catus</i> ABY, SOM	progresivní retinální atrofie PRA - rdAC		AR <i>CEP290</i>	pozdní forma, degenerace fotoreceptorů a atrofie sítnice, slepota	ano
<i>Felis catus</i> ABY, SOM	progresivní retinální atrofie PRA - rdy		AD <i>CRX</i>	časná forma, dysplazie tyčinek, slepota	ano
<i>Felis catus</i>	hluchota vázaná na bílou barvu		<i>KIT</i> (W lokus)	asociováno s dominantní W alelou pro bílou barvu, dáno absencí melanocytů ve vnitřním uchu	
<i>Felis catus</i> SIA aj.	lymfocytárně-plasmacytární enteritida LPE		MF	chronické zánětlivé onemocnění střeva (forma IBD) nebo někdy dásní (gingivostomatitis)	ano
<i>Felis catus</i>	deficit pyruvátkinázy		AR <i>PKGL</i>	hemolytická anémie	ano

<i>Felis catus</i>	gangliosidóza	AR	hromadění gangliosidu v buňkách nervové tkáně; progresivní neuropatie	ano
KOR	GM1	<i>GLB1</i>		
KOR, BUR	GM2	<i>HEXB</i>		
<i>Felis catus</i> PER, EXO	brachycefalický syndrom	polygenní	selekcí podporovaný znak s vedlejším patologickým účinkem; deformace, záněty, stenóza HCD, dermatitidy	ne

6.5 Dědičné poruchy zdraví ovlivňující kvalitu živočišných produktů

Součástí chovného cíle hospodářských zvířat může být zlepšení nejen kvantity, ale také kvality živočišných produktů. Správně vedeným šlechtěním lze například dosáhnout optimálního složení produktů (poměr bílkovina/tuk v mléce, obsah intramuskulárního tuku v mase) nebo zvyšovat bezpečnost potravin snižováním jejich kontaminace. Naopak při neuváženém šlechtění na zvyšování produkce může dojít až k neakceptovatelným změnám kvality živočišných produktů. Příkladem je nepříznivý dopad intenzivního šlechtění cíleného na zvýšení podílu libových součástí masa, snížení výšky hřbetního tuku a zvětšení plochy kotlety, které v minulosti vedlo k nadměrnému výskytu stresového syndromu a PSE vady masa u prasat. U mléčné produkce byla prokázána nežádoucí pozitivní korelace mezi vysokou užitkovostí a výskytem mastitid.

6.5.1 PSE maso

Tato jakostní a senzorická odchylka masa je nejčastěji popisována v souvislosti s vepřovým masem, ale může se objevit např. i u masa drůbežního. Vzhled takto postiženého masa je shrnut ve zkratce PSE – světlé (Pale), měkké (Soft) a vodnaté (Exudative). Příčinou vzniku PSE masa jsou změny v organismech prasat šlechtěných na výše zmíněné parametry masné užitkovosti. Všechny tyto vlastnosti jsou podmíněny jediným genem – RYR1, který má pleiotropní efekt (tj. jeho efekt se projevuje ve více než jednom znaku). Nositelé recesivní alely „n“ v genu RYR1 mají žádoucí fenotyp se zvýšenou masnou užitkovostí, avšak dalším velmi nežádoucím efektem je zvýšení citlivosti ke stresu (prasečí stresový syndrom, PSS) a projevu vady PSE.

Mechanismus vzniku PSE spočívá ve změněné citlivosti Ca kanálů sarkoplasmatického retikula. Vápník je u jedinců s mutací v RYR1 genu v nadměrném množství vyplavován do

cytoplazmy, a to za spotřeby ATP a vzniku tepla. Dochází k částečné denaturaci svalových vláken způsobené zvýšením teploty uvnitř svalu až na 42°C. Po vyčerpání ATP je navozena anaerobní glykolýza, jejímž konečným produktem je laktát. Hromadění kyseliny mléčné se projeví nadměrným poklesem pH svaloviny. Všechny tyto faktory mají ve výsledku efekt na poruchy zrání masa - snížení vaznosti, uvolňování masné šťávy, změnu barvy a konzistence svaloviny.

6.5.2 Mastitidy

Záněty mléčné žlázy jsou v současnosti jedním z největších problémů v chovech mléčného skotu. Mají zásadní dopady na ekonomiku, užitkovost, kvalitu mléka, reprodukční výkonnost a brakaci dojnic. Kvalita mléka a navazující výkupní cena jsou posuzovány mimo jiné na základě počtu somatických buněk signalizujícím subklinické formy mastitidy, které zároveň zkracují dobu údržnosti a zhoršují parametry zpracovatelnosti mléka (např. rychlost srážení, tuhost sýřeniny). Hrozbou je také riziko reziduí antibiotik a vzniku antibiotické rezistence.

Schopnost odolávat mastitidám je individuálně variabilní vlastnost a ovlivňuje ji velké množství faktorů včetně genetického založení. Vyšší výskyt mastitid je nežádoucím způsobem korelován se zvyšováním množství nadojeného mléka, mléčného tuku a proteinů. Korelační koeficient pohybující se mezi hodnotami 0,25 – 0,5 naznačuje, že dlouhodobá selekce pouze na navyšování mléčné produkce má negativní dopad na frekvenci klinických i subklinických mastitid. Počet buněčných elementů v mléce (somatic cell score, SCS) je parametr o střední dědivosti, což znamená, že se na něj dá úspěšně šlechtit a je proto kritériem ovlivňujícím plemennou hodnotu zvířat. V současné době se v praxi využívá metoda nepřímé selekce podle SCS, neboť to je silně korelováno s výskytem mastitid. Spolu s lineárním popisem vlastností vemene jsou součástí komplexního přístupu k problému mastitid u dojeného skotu. Morfologie vemene (tvar vemene, upnutí závěsných vazů, délka a tvar struků, průměr a uzavíratelnost strukového kanálku, výskyt pastruků) je dalším faktorem, který v podmínkách strojního dojení ovlivňuje vnímavost/rezistenci k mastitidám. Tyto znaky mají střední až vysokou heritabilitu a jsou v praxi využívány při šlechtění na zvyšování odolnosti vůči zánětům mléčné žlázy.

Bylo již identifikováno množství kandidátních genů GWAS SNP markerů vnímavosti k mastitidám s potenciálem využití při selekci zvířat k plemenitbě, avšak multifaktoriální charakter jejího genetického založení vývoj přímých genetických testů komplikuje.

7. Populační genetik

Populační genetik se zabývá genetickou variabilitou a dědičností kvalitativních a kvantitativních znaků v rámci velkého souboru jedinců (populace). Z hlediska chovu domácích zvířat jde o velmi důležitou část genetiky, protože proces šlechtění zvířat, včetně ovlivňování jejich zdravotního stavu se primárně uskutečňuje a manifestuje na úrovni populací, například plemen.

7.1 Populace a genofond

Populace je reprodukční společenství jedinců stejného druhu, kteří se nacházejí ve stejném čase na daném místě. Jsou to jedinci, kteří se spolu mohou reálně pářit, může tedy mezi nimi docházet ke sdílení vloh. Zejména v přírodě mohou být populace izolované geograficky (tedy jedinci se nemohou potkat a tedy vlohy sdílet). V chovatelské praxi je často populace vytvářena a izolována uměle, neboť se cíleně páří pouze vybraní jedinci, a to buď stejného plemene (skot, psi, kočky), případně vznikají kříženci předem definovaných plemen nebo variant (prasata, drůbež). Jistá míra izolování populace (křížení pouze jedinců stejného plemene) je prakticky běžná při čistokrevné plemenitbě, která je nezbytná pro uznání čistokrevnosti mláďat (např. u psů nebo koček).

Jednotlivé populace se mezi sebou liší svými vlastnostmi, které jsou dány jejich rozdílnou historií – mají na to vliv jedinci, kteří populaci založili, tak i životní podmínky, které na populaci působí. U některých populací dochází k značnému přizpůsobení místním životním podmínkám (např. ostrovní populace původního islandského poníka přivyklá na drsné ostrovní klima).

Některé z rozdílů mezi populacemi jsou dědičné a jsou tedy dány rozdílnými variantami genů. Každá populace (plemeno) má svůj **genofond** (soubor alel) a tento genofond se může lišit mezi populacemi. Takto se liší např. genofond islandského poníka a arabského koně – pokud páříme v rámci jednoho plemene, získáme mláďata podobná rodičům, a to i tehdy, když arabské koně chováme v severských podmínkách nebo naopak islandského poníka v subtropích. Dlouhodobá selekce ovšem způsobila to, že geny islandských poníků způsobují lepší přizpůsobení severským podmínkám a geny arabských koní polopouštním podmínkám. Nicméně islandský poník je schopen se křížit s arabským koněm, pokud je mu dána příležitost – není zde tedy žádná reprodukční bariéra, vzniklý jedinec má prvky genofondu jak arabského koně, tak islandského poníka.

Rozdílnost genofondů různých populací nebo plemen (tedy rozdíly v přítomnosti a početnosti alel) umožňují chovatelům šlechtit nové genetické varianty s požadovanými vlastnostmi (např. vznik novodobého Červenostakatého skotu, kdy byl tradiční český skot podroben intenzivnímu křížení s vysoce užitkovým bernsko-simentálským a holštýnským skotem a výsledkem byl vysoce užitkový skot vhodný pro naše podmínky).

7.2 Četnost alel v populaci a genetická diverzita

Z hlediska populační biologie mají význam zejména informace o přítomnosti a početnosti různých alel v populaci a rozdíly v jejich četnostech alel mezi různými populacemi. Řízenou plemenitbou dochází ke změně početnosti alel a tím k cílené změně vlastností plemen. Při řízené plemenitbě se velmi často na reprodukci podílí velké množství samic a menší množství samců, takže samice může mít za svůj život jen omezené množství vrhů nebo potomků, zatímco samec může oplodnit velké množství samic. Extrémním příkladem je plemenitba skotu, kdy malé množství špičkových býků předá své geny do značné části následující generace. Toto je sice výhodné pro rychlé vylepšení užitkových parametrů, nicméně dochází tak ke značné redukci genetické diverzity a ke ztrátě alel nesených jedinci, kteří se nerozmnožují. Selektce při plemenitbě je téměř vždy příčinou ztráty genetické diverzity. Naopak, pro udržení co největší genetické diverzity (tedy pro zachování co největšího množství alel, které mohou být hypoteticky někdy výhodné, případně se mohou v budoucnu šlechtitelsky využít) je vhodné, aby se reprodukovalo co největší množství jedinců. Pokud některá alela z populace zmizí, je ztracena nenávratně. Jedinými možnostmi, jak tuto alelu získat do populace zpět, je křížení s nějakou jinou populací, pokud tuto alelu má, případně hypoteticky může dojít opět ke stejné náhodné mutaci, což málo pravděpodobné). Je proto vhodné udržovat některé plemena nebo populace jako takzvané genetické rezervy. Vzácné alely nesené těmito rezervami mohou být využity při budoucím šlechtění jiného plemene případně se mohou ukázat jako výhodné při šlechtění stávajících plemen v měnících se podmínkách jejich chovu.

Četnost alel v populaci je ovlivněna typem rozmnožování, typem dědičnosti (autozomální nebo gonozomální), velikostí populace a evolučními silami (mutacemi, migrací, selekcí). Pro obratlovce je nejobvyklejší pohlavní rozmnožování a diploidie (ačkoliv některé druhy ryb, např. karas stříbřitý, mohou být i triploidní a rozmnožovat se partenogeneticky). Nicméně vzhledem

k tomu, že savci a ptáci, tedy hlavní objekty zájmu chovatelů a veterinárních lékařů, jsou zpravidla diploidní a rozmnožují se pohlavně, budou následující fakta vztažena k nim.

7.3 Mendelovská a modelová populace a její genetické charakteristiky

Množství jedinců, kteří jsou schopni přispět svými geny do další generace (tedy účastníci se reprodukce) se nazývá **mendelistická populace**. Jejich počet je vyjádřen tzv. **efektivní velikostí populace**. V reálné populaci obvykle nejsou všichni jedinci schopni reprodukce, a to většinou z věkových (příliš staří nebo příliš mladí), nebo zdravotních důvodů. V chovatelské praxi většinou funguje selekce – reprodukcující se jedinci jsou vybíráni na základě konkrétních kritérií.

Populačně genetické analýzy se provádějí pro “**modelovou**” populaci, tedy pro populaci s ideálními vlastnostmi. Modelová populace je mendelistická, dostatečně velká, nepůsobí na ní evoluční síly a zároveň je to populace panmiktická. **Panmiktická populace** je taková, kdy všichni jedinci mají stejnou pravděpodobnost páření se s kterýmkoliv jiným jedincem. V přírodě je panmixie obvykle nereálná, jelikož atraktivnější a zdravější jedinci mají větší šanci na páření a vznik mláďate než méně zdatní jedinci. Navíc není možné páření a zplození mláďat mezi každými dvěma jedinci, neboť je nutné, aby rodiče měli různá pohlaví (není možné úspěšné páření dvou samic nebo dvou samců mezi sebou). Panmixie v chovatelské praxi je značně omezena tím, že jedinci jsou do reprodukce vybíráni a sestavení rodičovských párů není náhodné. Nicméně pro konkrétní lokusy může platit panmixie i v populaci, která jako celek panmiktická není.

Aby bylo možno kvantifikovat četnost alel v modelové populaci, neměly by na modelovou populaci na rozdíl od reálné populace působit evoluční síly, tedy selekce (ať již chovatelská nebo selekce prostředí vlivem rozdílného fitness různých jedinců), migrace (příchod nových genů) ani mutace (vznik nových alel). Tyto všechny vlivy by působily změny četnosti sledovaných alel tím, že by se v populaci objevily nové alely (v důsledku migrace nebo mutace), nebo by byly některé alely zvýhodněny oproti ostatním, a následně by byly u potomstva četnější, než by byly v modelové populaci.

7.4 Hardyho-Weinbergův zákon

U každého autozomálního genu, který má dvě, a to dominantní alelu P a recesivní alelu Q je pro populaci možno stanovit **absolutní četnost** genotypů a alel.

Populace (N jedinců) obsahuje jisté množství dominantních homozygotů (D), recesivních homozygotů (R) a heterozygotů (H). Platí tedy, že $N = D + R + H$. Každý jedinec má právě jeden genotyp, tedy celkové absolutní množství genotypů je rovno počtu jedinců.

Absolutní početnost dominantní alely $P = 2D + H$, a to protože alelu P má každý dominantní homozygot dvakrát a heterozygot jednou. Podobně tedy absolutní početnost recesivní alely $Q = 2R + H$. Je důležité si uvědomit, že každý jedinec má jeden genotyp, ale dvě alely.

Pro každý genotyp a alelu je možno stanovit i **relativní početnost** v populaci. Pro relativní početnost genotypů (d - dominantních homozygotů, r - recesivních homozygotů a h - heterozygotů) platí, že $1 = d + r + h$, kdy $d = D / N$, atd. Pro relativní početnost alel platí, že relativní četnost dominantní alely $p = P / 2N$. Stejně tak relativní četnost recesivní alely $q = Q / 2N$, tedy četnost dělená celkovým počtem alel v populaci (každý jedinec má dvě alely).

Hardyho-Weinbergův zákon říká, že pro modelovou dostatečně velkou panmiktickou populaci, na kterou nepůsobí žádné vlivy zvenčí (selekce, migrace, mutace) platí, že v důsledku náhodného páření jedinců různých genotypů dochází u následující generace ke vzniku genotypů a alel ve stejném poměru jako byla rodičovská generace. Z generace na generaci se tedy neliší relativní frekvence alel ani genotypů, nicméně může docházet ke změnám v absolutní početnosti (populace může růst nebo ubývat).

Toto je popsáno v **Hardyho-Weinbergově zákoně**:

1. Pro relativní četnosti alel P a Q platí, že $p + q = 1$.
2. Pravděpodobnost vzniku dominantního homozygota v populaci je rovna pravděpodobnosti toho, že oba rodiče vloží do zygoty alelu P . Pravděpodobnost, že bude vložena právě alela P je rovna její četnosti v populaci. Tedy pravděpodobnost toho, že alelu P vloží první rodič je p , pravděpodobnost toho, že ji vloží i druhý rodič je také p , tedy pravděpodobnost vzniku dominantního homozygota je součin těchto dvou pravděpodobností $= p^2$. Podobně je možno vyjádřit pravděpodobnost vzniku recesivního homozygota – jako pravděpodobnost setkání se dvěma alel Q , tedy q^2 .

Heterozygot vzniká dvěma způsoby. Buď tak, že první rodič předá alelu P a současně druhý rodič musí předat alelu Q , tedy pravděpodobnost vzniku tohoto heterozygota je opět součin pravděpodobností výskytu alel P a Q , tedy $p \times q$. Druhou možností je to, že první rodič předá

alelu Q , v tom případě druhý rodič musí předat alelu P , což je s pravděpodobností $q \times p$. Tedy celkově pravděpodobnost vzniku heterozygota je $2pq$.

Protože v populaci jsou recesivní a dominantní homozygoti a heterozygoti, tak platí, že:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Je nutno připomenout, že Hardyho-Weinbergův zákon platí pouze, pokud jsou splněny následující podmínky – jde o panmiktickou dostatečně velkou populaci a nedochází k mutaci, migraci a selekci. Hardyho-Weinbergův zákon platí pro znak s dvěma alelami, tedy pro diploidní organismy (každý jedinec má dvě sady chromozomů, tedy má dvě alely); neplatí tedy pro frekvenci alel na pohlavních chromozomech, kdy některý jedinec má alely dvě a některý jen jednu. Je možno odvodit i Hardyho-Weinbergův zákon pro znaky s více než dvěma alelami, nicméně tyto znaky jsou velmi vzácné a znění Hardyho-Weinbergova zákona je pak značně složitější.

Hardyho-Weinbergův zákon tedy v tomto případě říká, že za určitých podmínek se populace v konkrétním kvalitativním znaku geneticky z generace na generaci nemění, a tento zákon tak vyjadřuje dědičnost kvalitativního znaku v populaci. Naopak, nejsou-li podmínky H-W zákona splněny, populace se z generace na generaci mění. V případě systematických změn, jako jsou mutace, migrace a selekce, je při znalosti jejich parametrů (mutační rychlost, intenzita migrace a selekce) možno odhadnout jejich účinky na další generace. V případě, že je populace příliš malá, jsou její změny stochastické, náhodné a nepředvídatelné. Pro chov zvířat je významný genetický drift, kdy v malých populacích je počet potomků příliš malý na to, aby v příští generaci mohly vzniknout všechny možné genotypové kombinace. Následkem toho, že některé z možných kombinací nevzniknou, se zvyšuje riziko snížení četnosti, až ztráty určitých alel v dané populaci a někdy až dramatického ohrožení populace v důsledku ztráty její diverzity. To je také problém malých ohrožených populací divoče žijících zvířat. Tato rizika se ještě zvyšují s vyšší pravděpodobností inbreedingu: inbreeding v malých i velkých populacích nemění alelové četnosti, ale postupně zvyšuje četnosti homozygotních genotypů na úkor heterozygotů. V kombinaci s malou efektivní velikostí populace je pak riziko ztráty variability ještě vyšší.

7.5 Populační genetika dědičných nemocí zvířat, řešené příklady

Př.1 V populaci divokých potkanů v Belgii a Francii byl sledován gen kódující enzym Vkorc1 (enzym důležitý pro cyklus vitamínu K). Byl zjištěn polymorfismus v pozici 139, kde někteří jedinci neměli obvyklý nukleotid A ale nukleotid T. Z 856 odchycených jedinců bylo 618 homozygotů AA, 219 heterozygotů AT, 19 homozygotů TT. Jaká byla relativní početnost alely A a T?

Řešení: Absolutní početnost alely A je $2 \times AA + 1 \times AT = 2 \times 618 + 1 \times 219 = 1455$. Relativní početnost alely A je absolutní početnost alely A / 2N (počet alel v populaci) = $1455/856 \times 2 = 0,850$

Podobně absolutní početnost alely T = $2 \times TT + 1 \times AT = 2 \times 19 + 1 \times 219 = 257$. Relativní početnost je absolutní početnost alely T / 2N = 0,150.

Pro kontrolu: celkový počet alel = $1455 + 257 = 1712 = 2 \times 856$, relativní početnost alel $p + q = 0,850 + 0,150 = 1$

Pokud se u populace významně liší početnosti genotypů vypočítané podle Hardyho-Weinbergova zákona od skutečně pozorovaných četností, nejsou splněny některé z výše uvedených podmínek (nejčastěji ta, že populace není panmiktická, případně na ni působí selekce a některý genotyp je znevýhodněn oproti ostatním). Častou komplikací platnosti Hardyho-Weinbergova zákona bývá selekce. Selekce bývá využívána při šlechtění, kdy selektujeme na konkrétní žádoucí vlastnosti, a výběrem vhodných rodičů dochází ke změně četnosti alel, např. selekce na barvu, bezrohost, užitkovost, ale i na žádoucí zdravotní vlastnosti (na nepřítomnost dědičných vývojových vad, atd.). V přírodě nebo v populacích zanechaným přirozenějším způsobům života dochází k přirozené selekci nevhodných, méně životaschopných alel, jejichž četnost postupně klesá v důsledku nižšího přežívání nositelů a nižšího počtu jejich mláďat (nebo obojího). Některé kombinace alel mohou být dokonce letální (např. letální kombinace dvou alel pro gen způsobující lysost u psů naháčů. Při plemenitbě může být umělá selekce v rozporu s přírodní selekcí, kdy chtěný znak je spojen s nižší vitalitou jeho nositele (např. selekce na vyšší produkci mléka, výběr kratších psích čenichů, dyschondroplazie psů, atd.).

Selekce rodičů sice pozměňuje alelové a genotypové početnosti v další generaci, nicméně pokud selekce pomine, v další generaci se opět nastolí Hardyho-Weinbergova rovnováha odvozená od četností alel rodičů.

Př. 2. Značná část rodenticidů využívá toho, že inhibuje enzym Vkorc1, tím dochází k zastavení cyklu vitamínu K, což snižuje srážlivost krve. K úhynu hlodavců dochází v důsledku vnitřního krvácení. Mutace zmíněná v př. 1 (z nukleotidu A na T) způsobuje resistenci hlodavců vůči tomuto typu rodenticidů. Jak se změní alelové a genotypové četnosti populace z příkladu č. 1, pokud na tuto dosud přirozeně se chovající populaci aplikujeme rodenticid, který zahubí všechny homozygotní nositele dominantní alely A? Jak bude populace vypadat v další generaci?

Řešení: Z 856 (N) odchycených jedinců bylo 618 homozygotů AA (kteří zahynou, a tedy se nebudou dále účastnit reprodukce), v populaci tedy zbyde 219 heterozygotů AT a 19 homozygotů TT. Tedy četnost alely A je 219 a její relativní četnost = $219 / ((219 + 19) \times 2) = 0,46$. Četnost alely T je $219 + 2 \times 19$, a její relativní početnost je $(219 + 2 \times 19) / ((219 + 19) \times 2) = 0,54$.

Pokud do populace nebudeme opět aplikovat rodenticid, tak v další generaci při relativní početnosti $a = 0,46$ a $t = 0,54$ vznikne opět poměr genotypů podle Hardyho-Weinbergova zákona, tedy poměr homozygotů AA bude $a^2 = 0,212$, heterozygotů AT bude $2 \times at = 0,497$ a homozygotů TT bude $t^2 = 0,292$.

V praxi se poměrně často využívá dlouhodobé selekce, kdy je určitý genotyp po mnoho generací zvýhodňován nebo naopak znevýhodňován a tím dochází k postupné změně četnosti alel. Bývá to jak z důvodů užitkovosti (hospodářská zvířata), vzhledu (malá zvířata), nebo z důvodů zdraví.

Př. 3. Progresivní degenerace tyčinek a čípků (prcd), jedna z forem progresivní retinální atrofie u psů, je podmíněna homozygotním stavem recesivní alely prcd, zatímco jedinci s dominantní alelou PRCD (homozygoti i heterozygoti) jsou zdraví. Protože je tato choroba nežádoucí, chceme její výskyt eliminovat. V studovaném souboru 240 psů různých plemen trpělo prcd chorobou 8 jedinců. Jaké byly frekvence alel PRCD a prcd a jak se změnila početnost nemocných psů, pokud po 3 generace nepouštím do reprodukce žádné nemocné zvíře a křížím jen jedince klinicky zdravé?

Řešení: Je důležité si uvědomit, že nemocní psi jsou recesivní homozygoti (genotyp *prcd/prcd*), četnost tohoto genotypu je $8/240 = 0,033$, tedy 3,3 %. Toto je vlastně $prcd^2$ (tedy ono q^2 z Hardyho-Weibergova zákona), početnost alely *prcd* je tedy $\sqrt{0,0333} = 0,183$. Tedy četnost alely *PRCD* je $1 - 0,183 = 0,817$.

Relativní četnost genotypů v 1. generaci je tedy:

$$PRCD/PRCD = 0,817 \times 0,817 = 0,667$$

$$PRCD/prcd = 2 \times 0,817 \times 0,183 = 0,299$$

$$prcd/prcd = 0,0333$$

Podle procent by tedy v populaci 100 jedinců mělo být 66,7 jedinců *PRCD/PRCD*, 29,9 jedinců *PRCD/prcd* a 3,3 *prcd/prcd* jedinců (počet jedinců je ve skutečnosti vždy celé číslo, což ale není pravidlem při použití teoretických výpočtů).

Při další reprodukci byli využiti jen zdraví jedinci, tedy recesivní homozygoti se nerozmnožovali. Velikost rodičovské populace se zmenšila o recesivní homozygoty (v našem případě se tedy účastní reprodukce 96,7 jedinců). Absolutní četnost alely *PRCD* = $2 \times 66,7 + 29,9 = 163,3$, relativní četnost = $163,3 / 2 \times 96,7 = 0,844$. Absolutní četnost recesivní alely *prcd* = 29,9, relativní početnost = $29,9 / 2 \times 96,7 = 0,154$ (to, že součet všech relativních četností není roven přesně 100 %, je dáno zaokrouhlením).

Za předpokladu, že plemenitba těchto dominantních homozygotů a heterozygotů je přibližně panmiktická, dojde u jejich potomků opět k nastolení Hardyho-Weibergovy rovnováhy. Bude platit Hardyho-Weinbergův zákon $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, tedy homozygotů *PRCD/PRCD* bude $0,844^2 = 0,712$, *prcd/prcd* bude $0,154^2 = 0,024$ a heterozygotů $2 \times 0,844 \times 0,154 = 0,260$. Tedy dojde ke vzniku 2,4 % nemocných recesivních homozygotů.

Pokud při křížení této první generace opět vyloučím nemocné jedince z reprodukce, zase se změní alelové četnosti, a to následovně: absolutní početnost *PRCD* = $71,2 \times 2 + 26 = 168,4$, relativní početnost *PRCD* = $168,4 / 2 \times 97,6 = 0,863$, relativní početnost *prcd* = $1 - 0,863 = 0,137$. Tedy ve druhé generaci potomků bude homozygotů *PRCD/PRCD* = $0,863^2 = 0,745$; homozygotů *prcd/prcd* = $0,137^2 = 0,019$ a heterozygotů *PRCD/prcd* = $2 \times 0,863 \times 0,137 = 0,236$.

Podobně ve třetí generaci bude absolutní početnost *PRCD* = $74,5 \times 2 + 23,6 = 172,6$, relativní početnost *PRCD* = $172,6 / 2 \times 98,63 = 0,875$, relativní početnost *prcd* = $1 - 0,875 = 0,125$. Homozygotů *PRCD/PRCD* = $0,875^2 = 0,766$; homozygotů *prcd/prcd* = $0,125^2 = 0,016$ a heterozygotů *PRCD/prcd* = $2 \times 0,875 \times 0,125 = 0,219$.

Mendelisticky děděné znaky (i např. choroby) mohou být vázané na recesivní nebo dominantní alelu. Pokud je znak vázaný na dominantní alelu, tato alela se fenotypově projeví vždy. Pokud je znak nežádoucí, může být její nositel vyřazen z další reprodukce a tímto se může nežádoucí dominantní alela z chovu (populace) zcela odstranit. Častější případ je ale ten, kdy je znak vázaný na recesivní alelu, tedy fenotypově se projeví pouze recesivní homozygoti. Pokud budeme selektovat zvířata pouze podle jejich fenotypu, vyřadíme pouze malou část nositelů nežádoucí alely a tato alela bude nadále nošena heterozygoty (přenašeči). V další generaci se opět mohou setkat dvě recesivní alely a vzniknout nežádoucí recesivní homozygot. Z výsledků z př. 3 můžeme usuzovat, že negativní selekcí recesivních homozygotů budeme pouze snižovat početnost nežádoucí alely, ale nikdy se jí nezbavíme. Takto probíhá selekce i v přírodních podmínkách, kdy přirozená selekce působí jen proti jedincům, u kterých se oslabující znak (choroba) fenotypově projeví, zatímco heterozygoti nadále přežívají a přispívají do reprodukce. V přírodě tyto recesivní alely v malých četnostech zůstávají a představují skrytý zdroj genetické variability.

V současných podmínkách existuje na značnou část známých mendelisticky děděných chorob vhodný genetický test, umožňující odhalit nežádoucí alelu, a tedy i přenašeče (heterozygoty). Tohoto se využívá při řízené plemenitbě. Při chovu skotu je velmi často požadován zdravý genotyp u chovného býka. Pro užitkové chovy je často povoleno připouštění zdravých býků s heterozygotními kravami, neboť potomstvo bude v každém případě zdravé (byť může být přenašečem). Pro plemenářské využití je často požadován zdravý genotyp i pro samice. U malých zvířat chovatelské kluby stanovují, za jakých podmínek mohou být jedinci uchovněni. Velmi často je povolována reprodukce pouze jedincům, kteří byli geneticky testováni na nejčastější choroby (které jsou často typické pro daná plemena) a byli shledáni zdravými. V některých případech je po jisté období umožněno i řízené spojení zdravého homozygota a heterozygota.

Př. 4. Choroba Episodic Falling Syndrom je choroba vyskytující se u plemene Kavalír King Charles španěl. Tato choroba je autosomálně recesivní (je dána delecí v genu *BCAN*) a je možno ji standartně geneticky testovat. V ČR touto chorobou trpí cca 3,5 % psů. Jaké požadavky na uchovnění jedinců a způsob plemenitby byste doporučili chovatelskému klubu?

Řešení: Pokud je 3,5 % jedinců nemocných, pak $q^2 = 0,035$, tedy $q = 0,187$. Pak $p = 1 - 0,187 = 0,813$. Počet přenašečů $2pq = 2 \times 0,813 \times 0,187 = 0,30$; zcela zdravých jedinců je $p^2 = 0,661$.

Z hlediska eliminace onemocnění by zcela jistě bylo nejlepší dále nerozmnožovat jedince přenášející vadnou alelu. Tímto by byla choroba a s ní i vadná alela již v první generaci vymýcena a dále by již nebylo nutno tuto chorobu ani testovat. Nicméně je nutno se na celý problém dívat v širším kontextu. Tím, že by se nereprodukovala celá třetina současných jedinců, bychom přišli o exteriérově i povahově výjimečně cenné jedince, kteří by nepřenesli své vlohy do dalších generací. Taky je nutné mít na zřeteli, že toto plemeno je v ČR nepříliš početné a značně inbrední a snížením jeho genetické základny by se snížila i diverzita v tomto plemeni. Snížením množství reprodukcujících se jedinců by se ještě více zvýšila inbrednost plemene. Z tohoto důvodu je vhodné zavést po jistý čas řízenou plemenitbu, kdy budou rozmnožováni i jinak výjimeční jedinci s vadnou alelou. Nicméně je nutno sestavovat páry vždy tak, aby se nepáрили dva jedinci nesoucí vadnou alelu (a nedocházelo tak ke vzniku nemocných štěňat). Tedy je možno pářit přenašeče se zdravým jedincem, nebo dokonce nemocného jedince se zdravým jedincem (za vzniku heterozygotů, kteří jsou v další generaci pářeni se zdravým jedincem). Z potomků (respektive prapotomků) pomocí genetických testů jsou následně vybíráni ti, kteří nejsou nositeli vadné alely. Tímto jsou zároveň v plemeni zanechány vlohy po výborných jedincích, kteří ale byli nositelé vadné alely, a zároveň je eliminována choroba. Po jedné až dvou generacích je vhodné upravit stanovy klubu tak, aby se pářili již jen nositelé zdravé alely.

8. Veterinární cytogenetika

8.1 Chromozomy domácích zvířat a metody jejich studia

Jaderný genom je představován molekulami DNA obsaženými v jádře buněk. V jádře nedělící se buňky tvoří DNA spolu s histonovými bílkovinami chromatin, jehož struktura umožňuje regulovat aktivitu genů buněk, které právě neprodělávají buněčné dělení. Při dělení buňky se replikací vzniklé dvě identické kopie musí rozdělit do vznikajících buněk tak, aby se do každé nové dceřiné buňky dostalo po jedné identické kopii. K tomuto účelu vytvoří jednotlivé molekuly DNA opakovanou spiralizací a překládáním chromatinových vláken specializované struktury, chromozomy, které jsou díky kondenzaci chromatinu viditelné ve světelném mikroskopu. Počet chromozomů v diploidní somatické buňce odpovídá počtu jednotlivých molekul DNA a je specifický pro daný druh (viz tabulka 4). Celková délka DNA v takové buňce je v závislosti na druhu přes 100 cm, a jeden chromozom je tedy tvořen jednou molekulou DNA o délce několika centimetrů. Pro účely cytogenetického vyšetřování jsou nejvhodnější chromozomy v metafázi, kdy jsou maximálně spiralizované a nejlépe individuálně rozlišitelné. V této fázi dělicí se buňky, ve které už předtím (v S fázi buněčného cyklu) došlo k replikaci DNA, jsou tedy mikroskopicky viditelné dvě sady chromozomů, spojené v místě centromery, které se v anafázi mitotického dělení rozejdou jako jednotlivé sady do dceřiných buněk. V této podobě se také posuzuje morfologie chromozomů, na které je založena jejich klasifikace a diagnostika odchylek od normálního stavu.

Centromera rozděluje jednotlivé chromozomy na *raménka*, která mohou být v případě umístění centromery uprostřed chromozomu stejně dlouhá (*metacentrické chromozomy*), v případě asymetrického umístění centromery rozlišujeme krátké a dlouhé raménko (*submetacentrické* nebo *subtelocentrické chromozomy*), v případě, že je centromera lokalizovaná na konci nebo téměř na konci chromozomu se hovoří o *telocentrických*, respektive *akrocentrických* chromozomech (viz kapitola Základy genetiky). Dalším kritériem klasifikace chromozomů je jejich velikost. Na základě velikosti a morfologie se pak metafázní chromozomy konkrétního druhu nebo jedince sestavují do *idiogramu* nebo *karyotypu*, což umožní standardní popis chromozomu každého druhu a jednotnou klasifikaci odchylek od normálního stavu.

Schématicky znázorněná sestava chromozomů diploidní somatické buňky konkrétního druhu se nazývá **idiogram**. Sestava metafázních chromozomů diploidní buňky konkrétního jedince uspořádaná podle druhově specifického idiogramu se nazývá **karyotyp**.

Standardizovaný popis chromozomů je možný díky specifickým metodám jejich barvení. Existuje větší počet různých metod barvení chromozomů, které jsou používány k různým účelům. Nejběžnější je rutinní orientační barvení Giemsovým barvivem, které umožní určit počet chromozomů a některé strukturní změny chromozomů většího rozsahu. Pruhování chromozomů je variantou barvení chromozomů, které umožní znázornit systém pruhů, který je pro každý chromozom jedinečný a shodný u obou homologních autozomů, což umožní identifikaci strukturních přestaveb (aberrací) chromozomů. Tyto metody jsou vhodné ke klinické diagnostice, protože změny v počtu a struktuře chromozomů mohou mít významný dopad na fenotyp jedince. Zatímco u domácích zvířat jde zejména o poruchy reprodukce, u lidí se tyto změny projevují i velmi specifickými, klinicky dobře definovanými syndromy. Identifikace jednotlivých chromozomů potřebná například pro diagnostiku klinicky mimořádně významných trizomií nebo diagnostika specifických subchromozomálních změn se dá dále zpřesnit pomocí metody FISH („fluorescence *in situ* hybridization“).

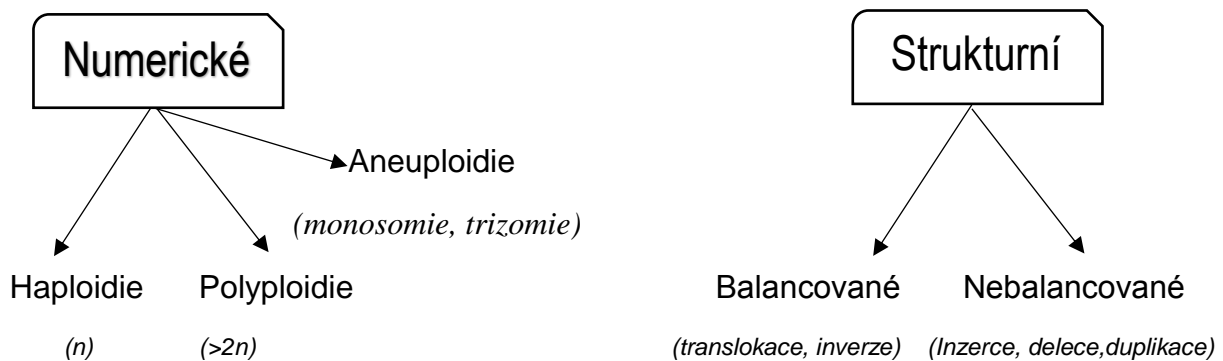
Zavedení molekulárních technik umožnilo další specializovaná vyšetření genomu na buněčné úrovni a rozvoj specializované oblasti cytogenetiky zvané cytogenomika. Podrobná charakteristika karyotypů a vytvoření idiogramu jednotlivých druhů jsou základem pro sestavení jejich podrobných celogenomových map a pro fyzickou lokalizaci známých genů a jiných sekvencí.

Tab. 4: Diploidní (2n) počty chromozomů u vybraných druhů domácích zvířat

<i>Druh</i>	<i>Počet chromozomů 2n</i>
Pes	78
Kočka	38
Skot	60
Ovce	54
Koza	60
Prase	38
Kůň	64
Kur	78

8.2 Změny chromozomů a jejich klasifikace

Jak bylo uvedeno v kapitole Základní pojmy genetiky, jsou v širším slova smyslu odchylky od normálního karyotypu mutacemi na buněčné úrovni. Tyto odchylky se dělí na početní (numerické) a strukturní abnormality. Nejvýznamnější z nich jsou uvedeny v následujícím schématu na obr. 10.



Obr. 10: Rozdělení chromozomových abnormalit

Zvláštními typy změn karyotypu konkrétních jedinců jsou **mozaiky** a **chiméry**. V obou případech jde o koexistenci dvou nebo více karyotypově odlišných populací (linií) buněk u jednoho jedince. U mozaik jsou tyto linie původem od jednoho embrya a vznikají tedy po oplození abnormalitami při mitotických děleních buněk původní zygoty. V případě chimérismu jsou odlišné linie buněk původem z různých embryí. Typickým příkladem jsou chimérickí jedinci vzniklí výměnou buněk mezi různopohlavními dvojčaty v důsledku vzniku placentálních anastomóz v průběhu gravidity (viz níže).

8.3 Klinická cytogenetika domácích zvířat

Cytogenetická diagnostika je v lidské genetice jedním ze základních klinicky významných vyšetření. Celá řada numerických (např. trizomie nebo mnozomie) i strukturních (například translokace, inverze) chromozomálních abnormalit je spojena s patologickými změnami

fenotypu a specifickými syndromy. Naproti tomu u domácích zvířat se většina poruch chromozomů projevuje nespecificky obecně poruchami reprodukce a vzhledem k významu plodnosti pro chov zvířat je jejich eliminace rychlá a efektivní i bez potřeby cytogenetických vyšetření. Přesto mají některé z chromozomálních abnormalit pro chovatele zvláštní význam.

8.3.1 Robertsonovská translokace 1/29 u skotu

V důsledku složitých přestaveb v oblasti centromer největšího (č. 1) a nejmenšího (č. 29) zahrnujících delecí, inverzi a centrickou fúzi (spojení chromozomů) vzniká ze dvou akrocentrických chromozomů nový, submetacentrický chromozom. Jeho přítomnost v buňce je pak příčinou poruch párování chromozomů v meióze. Vznik trivalentů vede k vytvoření aneuploidních embryí, která odumřou v raném stádiu. To se v praxi projevuje přeběhnutím a tím prodloužením service periody. Její projevy jsou tedy závažnější u krav, zatímco u býků je snížení parametrů plodnosti nízké a často při testování býka unikne pozornosti, nicméně dědí se z generace na generaci a heterozygotní jedinci ji přenášejí na 50% potomstva. Tato translokace je častá u skotu, u některých plemen dosahuje její výskyt až desítek procent. V případě prakticky významného výskytu této translokace se u daného plemene cytogeneticky vyšetřují testování býci. U skotu se vyskytují i další, prakticky nevýznamné centrické fúze zahrnující jiné chromozomy. U jiných druhů se podobné translokace vyskytují relativně často u ovcí a koz. U dalších druhů se nalézají spíše vzácně nebo u nich dosud nebyly popsány (například u koně).

8.3.2 Reciproké translokace

Jedná se o výměnu částí genetického materiálu mezi dvěma nehomologními chromozomy, následkem kterých dochází k poruchám jejich párování v meióze. Jsou časté u prasat, u kterých mohou mít praktický význam jako příčina poruch plodnosti, zejména u kanců. Vznikají *de novo* a dosud bylo identifikováno více než 100 různých typů lišících se chromozomy, kterých se výměna týká. Nejčastějším prakticky významným projevem je snížení počtu selat ve vrhu, případně poruchy spermogramu. Reciproké translokace se ojediněle vyskytují také u skotu, kde však nemají praktický význam a vzácně je lze odhalit i u dalších druhů domácích zvířat.

8.3.3 Aneuploidie pohlavních chromozomů

Nejčastějšími změnami v počtu pohlavních chromozomů jsou monozomie X a trizomie XXY, odpovídající u lidí dobře definovaným syndromu (Turnerův, respektive Klinefelterův syndrom). Celkový počet chromozomů v karyotypu se při těchto stavech snižuje (monozomie X) nebo zvyšuje (trizomie XXY). U zvířat však podobné specifické syndromy nepozorujeme. Monozomie X je nejčastější u klisen, které mají normální externí genitálie, ale mají poruchy pohlavního cyklu nebo jsou anestrické, s hypoplastickými vaječníky. Většina klisen jsou mozaiky (viz níže). Monozomie X s podobnými příznaky se občas nalezne u fen, u jiných druhů je zachycována jen vzácně. Výskyt trizomie XXY je nejlépe dokumentován u koček, protože na sebe upozorní výskytem trojbarevného želvovinového zbarvení srsti u kocourů. Trojbarevnost je u koček vázána na heterozygotní stav genů lokalizovaných na chromozomu X a za normálních okolností se tedy objevuje pouze o koček – samic. Kocouři s karyotypem XXY tedy mohou být na rozdíl od kocourů s normální sestavou pohlavních chromozomů XY heterozygotní v X-vázaných genech a tudíž trojbarevní. V důsledku nadbytečného chromozomu X vykazují poruchy plodnosti související s hypoplazií varlat a poruchami spermioqramu. Trizomie XXY se občas vyskytuje u býků s poruchami plodnosti a vzácně i u jiných druhů domácích zvířat. Také další poruchy v počtu pohlavních chromozomů, například trizomie XXX nebo XYY, se mohou u domácích zvířat vzácně vyskytnout ve spojení s poruchami plodnosti.

8.3.4 Mozaiky a chiméry

Nejčastějším případem mozaicismu domácích zvířat je mozaika XX/XO u neplodných klisen. Nejvýznamnějším příkladem chimérismu je freemartinismus skotu. V případě gravidity dvojčat dochází velmi často (>90%) k anastomozám krevních oběhů obou plodů a k výměně buněk mezi nimi. Jsou-li plody různého pohlaví, vznikají chimériční jedinci XX/XY. Vzhledem k mechanismům determinace pohlaví u savců založeným na aktivačním maskulinizujícím efektu přítomnosti chromozomu Y se přítomnost buněk XX u samců na jejich fenotypu nijak neprojeví. Naproti tomu u samic dochází k částečné maskulinizaci jak pohlavního aparátu, tak celkového vzhledu („býčice“).

8.4 Využití cytogenetiky domácích zvířat

I když je využití cytogenetických vyšetření v chovatelství a veterinární medicíně omezené, mohou být tyto metody užitečnou pomůckou například v následujících situacích.

✓ *Specializovaná diagnostika poruch plodnosti*

Cytogenetická vyšetření mohou identifikovat jinak neobjasněné příčiny poruch plodnosti, zejména u potenciálně cenných a masivně využívaných (například díky umělé inseminaci) plemenných zvířat.

✓ *Diagnostika chromozomálních poruch u embryí*

U lidí je součástí metod asistované reprodukce analýza karyotypu přenášených embryí. U skotu se v souvislosti s využitím transferu embryí ke šlechtitelským účelům před zavedením metod založených na PCR využívalo cytogenetického vyšetření k určení pohlaví komerčně nabízených embryí. Tyto techniky je možno využít i k objasňování příčin rané embryonální mortality, která je významným problémem u skotu a prasat.

✓ *Evoluční studie: vývoj a vztahy domácích zvířat a jejich divokých příbuzných*

Vývoj druhů se manifestuje i na úrovni karyotypu. Studium karyotypu domácích zvířat, jejich divokých předků a dalších příbuzných druhů umožňuje studovat mechanismy evoluce a domestikace, historii domácích zvířat a případně objasňovat reprodukční izolovanost a možnosti křížení jednotlivých dnes existujících forem domácích zvířat.

✓ *Modelové studie základních biologických procesů (oplození, gametogeneze, ontogeneze)*

Díky dlouholetým zkušenostem s manipulací s pohlavními buňkami a embryi domácích zvířat jsou například skot a prase vhodnými modelovými druhy pro studium časného vývoje savců a jejich poruch.

9. Genetická odolnost a vnímavost k nemocem u zvířat

9.1 Odolnost a vnímavost k nemocem jako biologický jev

Onemocnění vzniká jako výsledek interakce mezi organismem a vlastní (vnější) příčinou onemocnění. Vnější příčiny onemocnění, abiotické nebo biotické, označujeme obecně jako **patogenní noxy**. Mohou mít charakter fyzikálních faktorů (teplota, tlak), chemických látek (toxiny) nebo především biologických agens, kde se označují jako živé patogeny (bakterie, viry, parazité). Výsledkem interakce mezi organismem (hostitelem) a patogenem je **variabilita v reakci na patogen**. Na této variabilitě se podílí věk, pohlaví, hmotnost, zdravotní stav a také genetické založení hostitele, stejně tak jako variabilita na straně patogenu, a faktory vnějšího prostředí. Vznik onemocnění a jeho průběh pak představuje průnik těchto proměnlivých veličin.

9.2 Interakce hostitel-patogen

Prakticky významným typem interakce hostitele a patogenu jsou infekční onemocnění. Vznik a vývoj infekčního onemocnění lze chápat jako průběžný výsledek konfrontace dvou naprosto odlišných entit – patogenu a hostitele. Každý z aktérů přitom má zcela jiné vlastnosti a využívá jiných strategií k dosažení stejného cíle: přežití. Sledovat průběh interakcí mezi hostiteli a jejich infekčními patogeny je pak jako sledovat nekonečný a dramatický závod. Zatímco dlouhověcí hostitelé se jen pomalu mění a přizpůsobují nepříznivým podmínkám prostředí a rostoucímu tlaku patogenů, infekční agens a jejich rapidně se měnící genom jsou považovány za jednu z hnacích sil evoluce. V zásadě lze u takových evolučních interakcí hostitel-patogen rozeznat několik vítězných strategií. První možností, což je případ řady fatálních infekčních onemocnění, je cesta totální destrukce. Buď zvítězí hostitel, patogenu se úplně zbaví a je-li to možné, dojde k nastolení dlouhodobé imunity; nebo zvítězí patogen, dojde ke kolapsu imunitního systému hostitele a posléze k jeho zániku. Tento typ interakce je typický pro řadu virů, jako jsou např. orbiviry (katarální horečka ovcí, africký mor koní), orthomyxoviry (chřipka A-C) nebo flaviviry (Dengue, západonilská horečka, klíšťová encefalitida), ale i pro některé bakterie (tularémie, tuberkulóza). Taková strategie uplatňovaná patogenem ovšem nemusí být z dlouhodobého hlediska příliš výhodná, a řada patogenů tak preferuje strategie,

kteřé využívají zdrojů hostitele k vlastnímu přežití, avšak nezahrnují jeho likvidaci. Sem lze zařadit původce většiny běžných infekčních onemocnění jak lidí, tak zvířat. Další možností je vznik celoživotní latentní infekce s občasnými exacerbacemi klinických příznaků. Tento typ rovnovážné interakce pozorujeme například u herpesvirových onemocnění nebo toxoplasmózy.

Z hlediska patogeneze lze rozeznat dva základní typy infekčních onemocnění, kdy:

- a) klinické příznaky a patogeneze jsou určeny především vlastnostmi patogenu – např. infekce různými kmeny bakterie *E. coli*, která se běžně vyskytuje ve střevní mikroflóře, avšak může způsobovat i fatální enteritidy v závislosti na faktorech virulence, které nese
- b) klinika a patogeneze jsou dány zejména reakcí hostitele – např. u některých infekcí CNS (*Acanthamoeba spp.*) hraje v patogenezi onemocnění roli především poškození nervových tkání nepřiměřenou zánětlivou reakcí organismu na patogen.

9.2.1 Mechanismy přežití – patogen a hostitel

Za pozorovanými různými výsledky interakcí hostitel – patogen stojí, jak bylo zmíněno výše, i genetická variabilita obou aktérů. Přítomnost různých alel v populaci, byť v nízkých frekvencích, pak umožňuje v případě napadení hostitelské populace patogenem vyselektování odolných genotypů, které svým nositelům poskytují určité výhody. **Variabilita genomu** hostitelské populace tedy umožňuje její **adaptaci**. Stejně tak určité varianty genomu u patogenů mohou svým nositelům poskytnout vlastnosti, které jim umožní úspěšněji infikovat své hostitele a reprodukovat se. Interakce hostitel – patogen tak vlastně neustále probíhá i na úrovni genomů.

Základním zdrojem popisované genetické variability je **mutace**. Díky velmi krátkému generačnímu intervalu patogenů se změny způsobené mutacemi prosazují velmi rychle. Může tak docházet k **úniku obranným mechanismům hostitele** díky častým **změnám antigenních struktur** či využití nových **receptorů pro vstup** do buněk (např. chřipkové viry). Mezi další zbraně patogenů patří **indukce imunoprese** (např. viry HIV, FeLV) nebo zásahy do **řízení imunitních reakcí hostitele** (např. omezení exprese MHC molekul u řady virových onemocnění, modulace Th1 a Th2 typu odpovědi aj.). Zajímavým jevem je také alternace exprese genů u trypanosom. Povrchové antigeny tohoto parazita jsou kódovány genem VSG, který se v genomu trypanosom vyskytuje v mnoha variantách (více než sto). Avšak aby mohl

být exprimován, musí být vždy pouze jedna určitá kopie mechanismem genové konverze „přemístěna“ do speciálního expresního místa. K této konverzi dochází v pravidelných cyklech, přičemž kopie, která bude exprimována, je zvolena náhodně. Každých několik týdnů tak parazit změní své antigenní struktury (tzv. **antigenní variace**), hostitelem vytvořené protilátky přestávají být účinné a začínají se tvořit nové protilátky, specifické proti aktuálním antigenním strukturám na povrchu trypanosom.

Pozice hostitelů je složitější. Rovněž u nich je zdrojem variability mutace a rekombinace, avšak zejména v dlouhodobé, evoluční perspektivě. Díky mnohem delšímu generačnímu intervalu se musí vyrovnávat s neustále se měnícím protivníkem jiným způsobem, což u vyšších organismů posléze vedlo k diferenciaci **imunitního systému** a rozvoji **komplexních imunitních reakcí**. Klíčovou roli přitom hrají lymfocyty se svou schopností rychle se množit a do jisté míry geneticky měnit a geny, kódující molekuly účinné v imunitních reakcích (viz kap. Imunogenomika a imunogenetika). Druhým typem obranných mechanismů hostitele je široké spektrum **neimunitních mechanismů**, kam lze zařadit existenci různých fyzikálních bariér, přítomnost/nepřítomnost specifických receptorů, určité metabolické procesy, morfologické znaky či etologické charakteristiky, které se ukázaly jako výhodné z hlediska přežití jednotlivce i druhu. Jedním z faktorů, který přispívá k odolnosti vůči infestaci klíšťaty u Brahmanského skotu je například regulace exprese genů pro některé proteoglykany, kolagen nebo epidermální diferenciací faktory, které ovlivňují složení a funkci extracelulární matrix v okolí přísátých parazitů. U prasat zase známe určité linie, které jsou rezistentní vůči průjmu způsobenému F4/K88+ kmeny *E. coli*. Tento znak se dědí jednoduše recesivně; u recesivních homozygotů nedochází ke správné glykosylaci receptorových proteinů na povrchu enterocytů a bakterie *E. coli* tak ztrácí možnost přichycení ke stěně střevní. Obecně tak lze říci, že **variabilita v genech kódujících jednotlivé složky imunitních i neimunitních mechanismů rezistence** hostitele přispívá k celkové pozorované variabilitě v rezistenci na patogen u domácích zvířat.

9.3 Podstata a typy odolnosti a vnímavosti k nemocem

9.3.1 Definice rezistence, relativní fenotypy

Z hlediska hostitele může mít výsledek setkání s patogenem řadu různých podob. Příznivá reakce organismu hostitele a/nebo kombinace jiných faktorů může vést ke stavu rezistence – odolnosti hostitele, kdy se onemocnění nerozvíjí vůbec nebo jen v omezené míře a u infekčních

patogenů je hostitel schopen kontrolovat a posléze efektivně snižovat jejich množství. Opačným stavem je pak vnímavost – susceptibilita, tedy taková reakce hostitele, která umožní vznik onemocnění s různým průběhem, někdy i fatálním. Stav odolnosti nebo vnímavosti je vždy výsledek individuální interakce konkrétního hostitele a konkrétního patogenu. Mezi stavy úplné vnímavosti a úplné odolnosti, která je spíše teoretická, tak nacházíme v reálné populaci řadu přechodných stavů.

Je třeba zdůraznit, že pojmy **vnímavost a odolnost jsou relativní** a vždy záleží na použité klasifikaci. U infekčních onemocnění můžeme odolnost definovat různými stavy:

- patogen selže v navození infekce
- patogen navodí infekci, ale nedokončí svůj vývoj
- patogen navodí infekci, rozmnožuje se, ale je hostitelem kontrolován a posléze eliminován

Další možností je definice odolnosti podle určitých kritérií, např. absence nebo určitý titr protilátek, detekovatelnost patogenu ve tkáních, délka inkubační doby, absence klinických příznaků atp. Například v řadě prací o západonilské horečce se považuje výskyt pouze nespecifických klinických příznaků za rezistenci a až výskyt neurologických příznaků meningoencefalitidy je známka vnímavosti. U parazitárních infekcí může být kritériem počet parazitů v krvi (trypanosomiázy) nebo ve výkalech (protozoární cysty, vajíčka helmintů).

Stav odolnosti souvisí se stavem tolerance k infekcím, který je definován jako schopnost hostitele omezit dopad určité patogenní zátěže na jeho zdraví, produktivitu a celkové fitness. Stav tolerance je většinou výsledek působení jiných mechanismů než stav odolnosti, který souvisí s aktivní redukcí patogenní zátěže (např. snížení počtu parazitů nebo vylučování toxických látek), a může být rovněž předmětem selekce.

Výsledek interakce hostitel – patogen je tedy jev, který vykazuje značnou variabilitu a studium této variability (v rezistenci nebo vnímavosti) u infekčních onemocnění u zvířat či u lidí je jedním ze základních kroků k pochopení patogeneze těchto onemocnění a základ pro vývoj efektivních terapeutických postupů.

9.3.2 Typy variability v rezistenci k nemocem

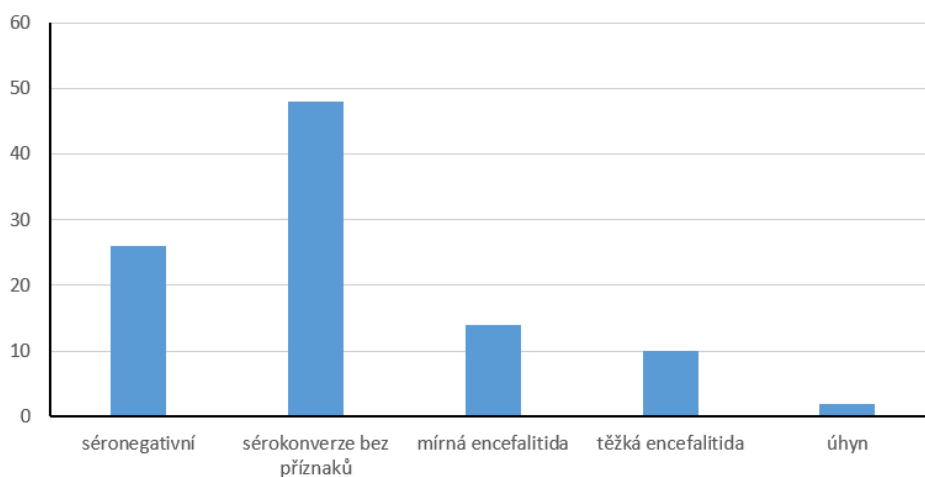
Variabilitu v rezistenci k onemocněním můžeme u zvířat obecně sledovat na třech úrovních:

mezidruhová – jedná se o rozdíly v odolnosti mezi různými druhy zvířat. Často je dána typem metabolismu nebo absencí příslušných receptorů u srovnávaného druhu. Tyto mechanismy

tvoří tzv. mezidruhovou bariéru. Například nestabilní tělesná teplota a odlišný způsob termoregulace jsou podstatou odolnosti plazů vůči některým infekcím savců (vzteklina aj.). Některé infekční patogeny, jako třeba chřipkové viry nebo virus psinky však dokáží mezidruhovou bariéru překonat a jsou schopny infikovat různé, i nepříbuzné druhy zvířat.

meziplenná – pozorujeme rozdíly ve vnímavosti či rezistenci mezi jednotlivými plemeny stejného druhu. Plemenná rezistence byla zaznamenána u reakce na některé infekční patogeny i na řadu nepříznivých faktorů prostředí. Příkladem mohou být plemena skotu, která jsou odolná vůči vysokým teplotám prostředí (Zebu, Brahmský skot) nebo trypanosomám (N'Dama). Plemeno Pottok u koní je zase známé pro odolnost vůči piroplamóze a u ovcí známe plemena odolná vůči infekci parazity *Haemonchus contortus*. Existence meziplenné variability je dokladem genetického založení odolnosti a vnímavosti k danému onemocnění a důkazem o možnostech na ni šlechtit.

individuální - když bychom sledovali střetnutí hostitelské populace určitého plemene s určitým typem patogenu, všimneme si, že každý jedinec bude reagovat trochu jinak. Najdeme jedince velmi odolné, potom řadu jedinců průměrně odolných a dále jedince vnímavé i velmi vnímavé. Výsledek interakce hostitele s patogenem je tedy i v rámci populace jednoho plemene variabilní a vykazuje rozložení jako ostatní kvantitativní znaky. Na příkladu na obrázku 11 můžeme sledovat výsledek interakce mezi virem západonilské horečky a hostitelskou populací koní v endemické oblasti výskytu tohoto onemocnění.



Obr. 11: Výsledek setkání modelové populace koní čítající celkem 100 zvířat s virem WNV. osa X – pozorované fenotypové kategorie, osa Y - počty zvířat v jednotlivých kategoriích

Rezistence k onemocněním je komplexní znak. Vzhledem k existenci vnitrodruhové variability (na úrovni jedince a dále také na úrovni plemen) můžeme předpokládat, že jednou z příčin pozorované variability jsou faktory genetické, tedy **genetická variabilita** mezi jedinci a plemeny téhož druhu. Různé genetické založení pro základní stavební a funkční jednotky imunitních i neimunitních mechanismů obrany tak přispívá k pozorované variabilitě ve vnímavosti a odolnosti k nemocem u zvířat a má praktický význam pro selekci a šlechtění. Dalšími faktory jsou pak environmentální příčiny, interakce genotypu s prostředím a variabilita patogenů. Environmentální příčiny přispívají zejména k variabilitě individuální, zatímco variabilita v rezistenci na úrovni plemen a druhů je dána převážně geneticky.

V rámci vnitrodruhové variability v rezistenci k onemocněním rozeznáváme ještě rezistenci obecnou a specifickou.

- **obecná rezistence** poskytuje svým nositelům celkově vyšší odolnost vůči patogenům i vlivům prostředí, je založená multifaktoriálně (tedy podílí se na ní řada genů malého a velkého účinku, to vše modifikováno interakcí s prostředím) a má proto relativně nízkou heritabilitu. Přesto už středověcí chovatelé položili základy šlechtění na obecnou rezistenci, když do chovů upřednostňovali jedince s tzv. silnou konstitucí, zatímco jedinci se slabou konstitucí, tedy obecně vnímaví, byli vyřazováni.
- **specifická rezistence** označuje odolnost vůči jednomu konkrétnímu patogenu nebo skupině patogenů. Je to dáno mechanismem, prostřednictvím kterého se tato rezistence uplatňuje, a většinou platí, že mechanismy rezistence nejsou stejné jako mechanismy vnímavosti. Heritabilita specifické rezistence je řádově vyšší než u obecné rezistence a v některých případech může být dědičnost až jednoduše monogenní (např. rezistence k malárii prostřednictvím mutace v genu pro beta podjednotku hemoglobinu u lidí, rezistence k průjmovým onemocněním vyvolaným F4 kmeny *Escherichia coli* u novorozených selat, vnímavost k infekci virem západonilské horečky u některých kmenů laboratorních myší).

9.4 Indikace k využití rezistence ve šlechtění domácích zvířat

Možnosti kontroly zdravotního stavu zvířat zahrnují zajištění prostředí chovu, které odpovídá fyziologickým nárokům daného druhu a plemene, odpovídající hygienu prostředí včetně desinfekčních, desinsekčních a deratizačních programů a léčbu medikamenty. U infekčních onemocnění se dále realizují vakcinační a eradikační programy, kontrola šíření vektorů, pravidelné depistáže v přírodních ohniscích nebo systémy včasné výstrahy. Další možnosti kontroly představuje cílená selekce přirozeně rezistentních nebo naopak vyhledávání a vyřazování geneticky mimořádně vnímavých jedinců v chovech zvířat, identifikace genetických mechanismů rezistence a hledání vhodných biologických markerů, které by selekci na rezistenci umožnily na molekulární úrovni bez nutnosti předchozího kontaktu s patogenem (viz. kapitoly Základy genomiky, Základy genetiky šlechtění).

Předpokladem pro využití rezistence (nebo vnímavosti) ve šlechtění je splnění následujících podmínek:

- a) Jiné metody nelze použít nebo **nejsou dostatečně účinné** (např. nelze zabránit šíření vektorů, léčba farmaky není dostatečně účinná, chybějící možnosti vakcinace atd.)
- b) Existence dostatečné **variability** – v populaci se musí vyskytovat žádoucí i nežádoucí varianty znaku, tedy jedinci, kteří jsou dostatečně rozdílně vnímaví i odolní (případně méně a více odolní), aby bylo možné provádět efektivní selekci vhodných variant
- c) **Nezávislost** na rezistenci k jiným onemocněním nebo na užitkových vlastnostech – vzhledem k pleiotropnímu účinku genů, vazbě vloh a vzájemné provázanosti fyziologických pochodů v organismu často pozorujeme korelaci mezi odolností vůči specifickým patogenům a jinými znaky. Tato korelace je z hlediska šlechtění často nežádoucí - u skotu byla např. prokázána negativní korelace mezi odolností k mastitidě a produkcí mléka, u drůbeže je zase odolnost k aviární leukóze spojena s nižší produkcí vajec
- d) Ekonomická efektivita – šlechtění na odolnost je proces náročný časově, organizačně i finančně, a proto musí být pro chovatele **rentabilní**. Náklady na selekční program nemohou převyšovat ztráty způsobené danou nemocí. Výjimkou jsou situace jako je ohrožení veřejného zdraví, například v případě prionových chorob.

9.5 Příklady využití rezistence ve šlechtění u domácích zvířat

9.5.1 Mastitidy u skotu

Mastitida je zánětlivé onemocnění mléčné žlázy infekčního původu. Kvalita mléka při mastitidě klesá – kromě změn ve složení mléka pozorujeme i nárůst počtu patogenních mikroorganismů v mléce a především stoupá počet somatických buněk (SCS) v mléce – epitelii a zejména leukocytů. Ztráty způsobené poklesem kvality mléka mohou být enormní a selekce na rezistenci vůči mastitidám je dnes běžnou součástí šlechtění u skotu, a to navzdory prokázané negativní korelaci mezi odolností k mastitidám a výší produkce mléka. Kromě selekce na SCS a morfologické vlastnosti vemene (viz kapitola Dědičné poruchy zdraví ovlivňující kvalitu živočišných produktů) se u matek býků se sleduje výskyt mastitidy u předků a u býků výskyt mastitid u dcer.

9.5.2 Scrapie

Scrapie u ovcí je onemocnění typu transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE). Postižené ovce vykazují poruchy sensorických vjemů a ataxii, později se rozvíjí poruchy chování, anorexie, letargie a během několika měsíců dochází k úhynu. Onemocnění je značně nakažlivé, přestože zde nenajdeme klasického infekčního původce. V současné době převažuje názor, že etiopatogeneze spočívá v hromadění nedegradovatelné formy prionového proteinu v nervových tkáních. Priony jsou proteiny tělu vlastní, které jsou běžně exprimovány v nervových buňkách, kde souvisí s přenosem vzruchu na synaptických membránách. Prionový protein (PrP) běžně zaujímá prostorovou konformaci, kde převažuje struktura typu α -helix (šroubovice). Za určitých okolností dochází ke změně tohoto uspořádání a PrP zaujme konformaci s převahou typu β -skládaný list. Tato forma proteinu – PrP_{sc}, scrapie forma – je biologicky neodbouratelná, hromadí se ve formě amyloidu podobných plaků v okolí nervových buněk a narušuje jejich funkci. Ke změně konformace dochází po kontaktu mezi normálním PrP a PrP_{sc}, kdy PrP_{sc} slouží jako matrix a indukuje strukturální změny u PrP. Tato forma scrapie se označuje jako získaná a je nejběžnější, avšak existují i případy spontánního přesmyku. Náchylnost PrP ke změně konformace, tedy pravděpodobnost přesmyku na PrP_{sc}, je dána primární strukturou proteinu, tedy jeho aminokyselinovou sekvencí. U ovcí jsou klíčové 136., 154. a 171.

aminokyselina peptidu. Za nejvíce rezistentní se považuje kombinace ARR (alanin, arginin, arginin), za nejvíce vnímavou kombinace VRQ (valin, arginin, glutamin). Aminokyselinová sekvence PrP je dána geneticky. Gen pro PrP je polymorfní a má řadu alel, které kódují různé zastoupení aminokyselin ve zmíněných kritických místech. V současné době probíhá u ovcí v ČR intenzivní selekce a nositelé nejvnímavějších genotypů jsou vyřazováni z chovu. Motivem je obava z možného přenosu prionů na člověka spíše než ekonomické důsledky výskytu onemocnění v ČR

9.5.3 Stresový syndrom prasat

Stresový syndrom prasat (PSS) je autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutací v genu *RYS* (viz kapitola Dědičné poruchy zdraví ovlivňující kvalitu živočišných produktů). Ztráty způsobené úhyny nebo nízkou kvalitou masa u recesivních homozygotů vedly k zavedení povinného testování plemenných zvířat a vyřazování heterozygotů (především kanců) z chovu. Od dřívější metody testování – halotanový test – se již upustilo a dnes se využívá DNA testů.

9.1.1. Markova choroba

Markova choroba je herpesvirové onemocnění drůbeže. V aktivní fázi virus indukuje tvorbu T-lymfomu ve formě perineurálních infiltrátů především u periferních nervů, s čímž souvisí klinické příznaky – paralýza končetin i bránice, dilatace zornic, postižení vnitřních orgánů v důsledku infiltrace nádorovými buňkami. Genetická rezistence vůči Markově chorobě byla u drůbeže intenzivně studována, přičemž bylo prokázáno, že efektivita rezistentního genotypu se vyrovná vakcinaci (rezistentní linie měly stejnou bazální mortalitu jako vakcinované chovy). Nejlepších výsledků (nejnižší úmrtnosti) bylo dosaženo vakcinací rezistentních linií. Za rezistentní genotyp je považován haplotyp B21 komplexu MHC, zatímco haplotyp B19 je velmi vnímavý. Pravděpodobným mechanismem je různá schopnost prezentace virových antigenů a jejich rozpoznávání imunitním systémem. Na základě těchto poznatků byly vyšlechtěny linie slepic odolné k Markově chorobě.

10. Imunogenomika a imunogenetika

S pojmem imunogenetika se můžeme v literatuře setkat ve dvou odlišných významech. Tradiční (historické) pojetí se týká problematiky krevních skupin u zvířat, zatímco současné pojetí představuje studium genetiky imunitní odpovědi. S tím souvisí také využití moderních metod umožňujících analýzu velkého počtu genů podmiňujících imunitní odpověď – imunogenomika.

10.1 Historie: genetika krevních skupin

V minulosti představovala možnost typizace většího množství antigenů krevních skupin u zvířat významný posun ve schopnosti popsat individuální proměnlivost (v rámci druhu, plemene, chovu). Spolu s biochemickými polymorfizmy tvořila soubor prvotních markerů, se kterými mohla genetická analýza pracovat. Byly tak popsány vztahy vazby nebo asociace mezi lokusem krevní skupiny a lokusem pro studovaný znak (fenotyp), i když povaha a lokalizace těchto lokusů (genů) v genomu nebyla známá.

Podrobný přehled krevně skupinových systémů u zvířat uvádí učebnice imunologie. Zmiňme alespoň obecné principy.

Studium krevních skupin u zvířat historicky souvisí s objevem krevních skupin u lidí (1901 - Landsteiner, 1907 - Jánský) tj. schopností krevního séra některých osob shlukovat (aglutinace) erythrocyty některých jiných osob. Jakmile byla dokázána dědičná podmíněnost individuálních rozdílů (systém AB0), obdobné souvislosti se začaly hledat i u hospodářských zvířat. Zpočátku bylo pomocí normálních sér objeveno několik krevních skupin (zejména analogických lidskému systému AB0), ale s ohledem na vzácný výskyt přirozených protilátek vůči krevním skupinám u zvířat se přistoupilo k pokusům s imunizací jedinců erythrocyty jiného jedince a přípravou testovacích (imunních) sér. S jejich pomocí byly postupně definovány různé specifity na povrchu erythrocytů, které v závislosti na živočišném druhu dosahují počtu až desítek rozdílných antigenních faktorů. Dnes tak rozeznáváme faktory krevních skupin (**antigeny**), které představují jednotlivé epitopy molekul na povrchu erythrocytů. Můžou být jednoduché, tj. jeden antigen charakterizuje příslušnou molekulu (**krevní skupinu**) a je

podmíněn alelou daného genu, nebo komplexní, tj. skupina antigenů se může vyskytovat v různých kombinacích v rámci příslušné molekuly a specifická kombinace tvoří tzv. **fenoskupinu**, která se přenáší na potomstvo jako celek (alela daného genu). Imunogenetickou analýzou potomstva mnoha křížení byly objasněny vztahy mezi různými antigeny, které byly rozdělené do skupin na sobě nezávislých faktorů jako produktů jednoho lokusu (genu) nebo skupiny lokusů v těsné vazbě. **Systém krevních skupin** tak označuje soubor erytrocytárních aloantigenů (liší se mezi příslušníky stejného živočišného druhu), které jsou podmíněné alelami daného genu (nebo genů v těsné vazbě), a označujeme ho velkým písmenem (případně dvojicí písmen). Jednotlivé faktory (antigeny) jsou značeny malým písmenem za odpovídajícím označením systému, do kterého jsou řazeny (u skotu se značí jako indexy velkého písmena). U zvířat, např. skot (11), ovce (9), prase (16), kůň (8), pes (12), králík (6) a kur (15), byl popsán rozdílný počet systémů krevních skupin. Některé jsou jednodušší (bialelické) a mají pouze alelu podmiňující daný antigen a alelu podmiňující produkt, vůči kterému nemáme protilátku, nebo dvě rozdílné alely kódující dva antigeny zjizitelné sérologicky. Mnohé systémy však vykazují v populaci druhu výskyt menšího počtu rozdílných antigenů (alelická série) a některé dokonce až stovky fenoskupin (multialelické). Aloantigeny se vyznačují kodominantní dědičností, tj. u heterozygota jsou přítomny produkty obou alel a ve většině systémů krevních skupin jde z fenotypu jedince (zjištěného sérologicky) odvodit přímo jeho genotyp. Zřídka se vyskytuje vztah dominance/recesivita a to zejména v A0 systému prasete, R0 systému ovcí a J systému skotu, které jsou homologní AB0 systému u lidí.

Z pohledu praktického využití se charakterizace krevních skupin neliší od jiných typů polymorfizmů, záleží však na rozsahu variability a dostupnosti sér (protilátek). V rámci genetiky se uplatňuje při identifikaci jedinců a kontrole původu zvířat zejména kvůli své větší/menší schopnosti vyloučit rodičovství, nebo při charakterizaci populací zvířat (genová skladba plemen a linií hospodářských zvířat, ohrožených populací atd.) a jejich genetických vzdáleností, případně při selekci v chovech jako další skupina markerů. S rozvojem poznání polymorfizmu DNA a metod jeho stanovení v genomu zvířete došlo postupně k omezení typizace krevních skupin pro tyto účely. Svě uplatnění si zachovává při určování chimérismu erytrocytů u dvojčat různého pohlaví u skotu a dalších domácích přežvýkavců, který vzniká důsledkem placentárních anastomóz mezi dvěma plody a je u těchto druhů hojný (80-90% dvojčat), a taktéž v imunologické problematice transfuze krve u zvířat (pes, kočka) nebo onemocnění v důsledku inkompatibilního vztahu matka-plod. Ten vede k rozvoji neonatální izoerytolýzy u koní (psů, koček, v malé míře u prasat) po napití mleziva novorozeným mládětem a prostupu protilátek vůči antigenu krevní skupiny do jeho krevního řečiště.

10.2 Genetické řízení imunitní odpovědi, imunogenom

Imunitní odpověď jako celek je mimořádně komplikovaný jev, kterého se účastní různé proteinové faktory (např. komplementová kaskáda, protilátky, cytokinová síť) a mnohé populace buněk (např. fagocyty, antigen prezentující buňky, plazmatické buňky, T lymfocyty, NK buňky). Vznik a diferenciaci těchto buněčných populací představuje jeden stupeň řízení a jejich vzájemné interakce další stupeň v řízení průběhu imunitní odpovědi.

Imunita jako fyziologický děj organismu je z pohledu klasické genetiky znakem komplexním tj. na jeho utváření se podílí jednak vnější prostředí (patogeny, paraziti, toxiny, ionizující záření atd.) a vnitřní prostředí organismu (aktuální zdravotní stav, imunokompetence, imunosuprese), ale také mnoho genů v genomu daného organismu, které přispívají rozdílnou mírou k variabilitě tohoto znaku v populaci.

Aby bylo možné studovat polygenní genetické založení imunity, je častá snaha postihnout alespoň určité složky imunity vyjádřené jako **kvantitativní znak**. Jednou z prvních cest byly selekční experimenty s liniemi laboratorních myší. V roce 1972 Guido Biozzi pomocí selekce na populacích švýcarské albinotické myši získal kmeny laboratorních myší, které vykazovaly vysokou úroveň (ABH kmeny) nebo nízkou úroveň (ABL kmeny) protilátkové odpovědi na definované antigeny. Analýzou potomstva různých typů křížení mezi těmito kmeny odhalil polygenní založení znaku titer protilátek vůči ovčím erytrocytům jako antigenu a taktéž odhadnul heritabilitu tohoto znaku. Později bylo zjištěno, že kromě genů asociovaných s hlavním histokompatibilitním komplexem (u myší H-2) se na tvorbě tohoto znaku účastní na různých chromozomech ještě minimálně šest lokusů, které mají postřehnutelný vliv v rámci klasické genetické analýzy.

V současnosti se odhaduje, že řádově 1000 genů z 20 000 kódujících proteiny v savčím genomu se přímo podílí na imunitní odpovědi, a spolu s geny pro mnohé dosud často neznámé typy RNA (miRNA, lncRNA) tvoří soubor sekvencí regulujících tvorbu složek imunitní odpovědi – **imunogenom**. U konkrétního živočišného druhu pak imunogenom jako funkční celek vykazuje znaky diverzifikující a purifikující selekce ve svých genech. Vznik a rozrůznění alel (diverzifikující selekce) je důležité pro geny imunitní odpovědi (IR geny), které slouží k postižení variability patogenů v mechanismech specifické imunity - tzv. IR geny typu I. Naopak přísné zachování funkcí a omezení počtu alel (purifikující selekce) je typické u genů receptorů (pro např. adhezní molekuly, protilátky, cytokiny) a pro mnohé geny jakožto složky signálních, efektorových a regulačních drah imunitního systému - tzv. IR geny typu II.

10.2.1 IR geny typu I

IR geny typu I zahrnují dvě důležité skupiny genů vyrovnávající se s variabilitou patogenů v prostředí. Jsou to geny mechanismů jednak antigenní prezentace (hlavní histokompatibilní komplex - MHC), jednak antigenní rekognice (receptor T-lymfocytů, receptor B-lymfocytů). **MHC** geny jsou charakteristické svou **dědičně založenou** variabilitou, která na úrovni populace druhu hospodářských zvířat bývá široká (množství alel pro jednotlivé MHC geny) a na úrovni jedince vede obvykle k heterozygotnímu stavu (dvě odlišné alely) ve většině lokusů. Zděděná variabilita tak definuje repertoár antigenních peptidů, které je daný jedinec schopen prezentovat imunitnímu systému a následně pak rozpoznat a případně likvidovat.

Naproti tomu schopnost rozpoznat obrovské množství antigenních variant se vytváří až za života díky změnám v genech kódujících receptory pro antigen. Geny pro receptor T-lymfocytů (**TCR**) a receptor B-lymfocytů (**BCR**) jsou charakteristické obrovskou variabilitou mezi jednotlivými klony lymfocytů v rámci jedince, které bylo dosaženo v průběhu diferenciaci lymfocytů (před kontaktem s antigenem) rekombinací genových segmentů za tvorby funkčního genu a pomocí somatických hypermutací (afinitní maturace po kontaktu s antigenem).

Další skupinou genů, které se potýkají s variabilitou patogenů ale v rámci přirozené imunity, jsou toll-like receptory (**TLR**) a některé receptory NK buněk. Ty jsou zaměřeny na rozpoznání konzervovaných epitopů (patogen associated molecular patterns – PAMPs). TLR mohou rozeznávat složky bakterií nebo virů např. lipopolysacharid, peptidoglykan, nemetylovanou DNA, virovou dsRNA atd. Jiné receptory na NK buňkách naopak rozeznávají MHC molekuly při interakci buněk za účelem kontroly, zda se jedná o tělu vlastní zdravou/nemocnou buňku nebo cizorodou buňku. Genů pro tyto receptory může být v genomu individuálně rozdílný počet a jejich variabilita do jisté míry odráží variabilitu MHC genů.

10.2.2 IR geny typu II

IR geny typu II představují různorodou skupinu genů (pro signální dráhy, cytokiny a jejich receptory atd.), jejichž variabilita bývá porovnatelná s jinými funkčně významnými geny v organismu a řádově představuje existenci jednotek rozdílných funkčních sekvencí v populaci druhu (typicky 1 až 3 proteinové sekvence). V rámci konkrétního genu může v populaci existovat větší množství polymorfních pozic (např. typu jednonukleotidových záměn – SNP), ale jejich podíl v kódující nebo regulační oblasti genu vůči intronovým sekvencím je zpravidla

velmi nízký. Mohou však ovlivnit úroveň nebo místo/čas transkripce genu nebo aktivitu jeho proteinového produktu.

10.3 Geny imunitní odpovědi a nemoci

Z hlediska formální genetiky rozdělujeme mutace v IR genech s ohledem na jejich klinický projev na mutace velkého a malého účinku.

Mutace velkého účinku – jedná se o poruchy genů na různých úrovních imunitního systému, a v závislosti na postavení proteinu v diferenciaci buněk nebo v jejich funkcích mohou vznikat primární imunodeficience (PID) postihující jak buněčnou tak humorální složku (kombinované imunodeficience) nebo jen některé složky imunitní odpovědi (defekt T-lymfocytů, B-lymfocytů, defekt protilátkové odpovědi, fagocytózy, komplementu atd.).

Mutace malého účinku – jedná se na jedné straně o mutace genů, které se neprojeví klinicky díky existenci záložních mechanismů imunitní odpovědi anebo díky jejich podprahovému účinku v daném genomu. Hromaděním těchto mutací nejčastěji ve formě SNP se pak v konkrétním genomu zvyšuje míra jejich vlivu na obranné mechanismy a odolnost/vnímatost k nemocem, které se pak na rozdíl od přechozího typu dědí jako komplexní znak.

U domácích či hospodářských zvířat bylo popsáno poměrně málo primárních imunodeficiencí, částečně kvůli sporadickému výskytu a částečně kvůli brzkému úhynu na infekční choroby. Mezi onemocnění s prokázanou molekulární podstatou patří těžká kombinovaná imunodeficience (**SCID**) u koní arabského původu s autozomálně recesivním deficitem DNA -závislé proteinkinázy (DNA-PK p350 podjednotky). Výskyt může dosahovat relativně vysoké frekvence v závislosti na počtu heterozygotních nositelů mutace v populaci koní. Podobně byl detekován deficit DNA-závislé proteinkinázy při SCID u psů plemene Jack Russel. Obdobné onemocnění popsané u psů je těžká kombinovaná imunodeficience s vazbou na pohlavní X chromozom (**X-SCID**) způsobená mutací genu pro receptor interleukinu 2 (*IL-2R*), u plemene basset se jedná o delecii 4 nukleotidů a u welsh corgi o inzerci jednoho nukleotidu. Deficience adherence leukocytů – LAD syndrom byla popsána u skotu (**BLAD**) a psů (**CLAD**), přičemž se jedná o poruchu fagocytózy vyvolanou neschopností neutrofilů migrovat z krevního řečiště do místa zánětu. U skotu holštýnského plemene se jedná o bodovou mutaci genu pro

adhezivní molekulu CD18 (gen *IGTB2*), u psů plemene irský setr rovněž o bodovou mutaci stejného genu. Porucha degranulace lyzozomů, Chédiakův-Higashiho syndrom, byla popsána u skotu vícero plemen, u japonského černého skotu byla identifikována bodová mutace v genu *LYST* (*lysosomal trafficking regulator*). Naopak s rozvojem imunologie přibývá poznatků o možné účasti mutací v IR genech u častějších poruch imunity spojených s autoimunitními chorobami, alergiemi a vznikem nádorů. Taktéž vznik a průběh různých infekčních onemocnění či odpověď na antigenní podnět (vakcíny) mohou být ovlivněny některými polymorfizmy IR genů.

10.4 Využití imunogenetiky ve veterinární medicíně

Imunogenetika poskytuje metody identifikace primárních imunodeficiencí určením kausálních mutací a vypracováním diagnostických metod pro odhalení heterozygotních nositelů této mutace (např. BLAD).

Umožňuje odhalovat podstatu vnímavosti k určitým typům onemocnění a vypracovat metodiky její detekce pomocí molekulárních markerů nabízených jako komerční testy (např. lentivirová infekce ovci). V oblasti vakcinologie se snaží identifikovat genotypy asociované se slabou odpovědí na významné antigeny.

11. Farmakogenomika a farmakogenetika

11.1 Úvod

Význam genetické proměnlivosti pro adaptaci a vývoj živých organismů je obecně znám. Z jiných kapitol tohoto textu je také zřejmý její význam pro zdraví domácích zvířat. V tomto kontextu je třeba zdůraznit, že kromě individuální variability v reakci na různé patogenní noxy, existuje také přirozená, geneticky podmíněná, individuální proměnlivost v reakci na různé chemické látky vyskytující se v prostředí, včetně například mutagenů a léčiv.

Vzhledem k jejich významu, způsobu a intenzitě používání byla a je největší pozornost věnována variabilitě v reakci na léčiva a možnostem jejího využití v klinické praxi u lidí i u zvířat. Tato variabilita se projevuje jak kvantitativně (efekt dávky), tak kvalitativně (vznik nežádoucích účinků). Konečným cílem studia individuálních rozdílů v reakci na léčiva je individualizace farmakoterapie jako součást širšího konceptu tzv. personalizované medicíny. Personalizovaná medicína nebo v poslední době často používaný termín precizní medicína („precision medicine“) je definována jako využití genetických a jiných znalostí o konkrétním pacientovi s cílem předpovídat jeho rizika onemocnění, stanovit co nejpřesnější prognózu vývoje konkrétní nemoci a předpovědět co nejpřesněji jeho reakce na terapii v jeho konkrétní situaci. Z této definice je patrné, že praktické využití poznatků o variabilitě v reakci na léčiva úzce souvisí s dalšími aspekty genetiky zdravotního stavu, které jsou popsány v jiných částech tohoto učebního textu.

Koncept personalizované medicíny je v současné době aktuálním tématem humánní medicíny, ale první poznatky a aplikace se objevily i v medicíně veterinární, zejména u společenských druhů domácích zvířat, u kterých má individuální přístup větší význam než zdraví populace, respektive stáda, jak je tomu u hospodářských zvířat. Cílem této kapitoly je seznámit studenty veterinární medicíny s obecnými principy farmakogenetiky/farmakogenomiky a s jejich aktuálním využitím u domácích zvířat.

11.2 Terminologie a definice

Terminologie vztahující se k individuální variabilitě v reakci na léčiva a s ní související klinické aplikace se vyvíjela v čase a je tudíž používána nejednotně.

Farmakogenetika byla v medicíně původně definována jako *věda o individuální genetické proměnlivosti v reakci na léčiva*. Termín **farmakogenomika** se začal používat v souvislosti s poznáním lidského genomu a s rozvojem genomických technik. Vztahoval se původně k využití genomických přístupů k vývoji nových léčiv, zejména na úrovni genové exprese. Protože genomické přístupy byly postupně úspěšně využity i ke studiu individuální variability reakce na léčiva, tj. pro účely farmakogenetiky, používá se v současné době termín farmakogenomika i v této souvislosti. S cílem vyhnout se terminologickým diskusím na toto téma se používá „univerzální“ zkratka „**PGx**“ zahrnující současně oba termíny. V tomto učebním textu budeme z didaktických důvodů při konkrétním popisu problematiky rozlišovat mezi farmakogenetikou a farmakogenomikou v původním významu obou termínů.

11.3 Genetická podstata individuální proměnlivosti v reakci na léčiva: farmakogenetika

Variability v reakci na léčiva si lidé všimli ihned, jak je začali používat. Její vysvětlení nabídl jako první A. E. Garrod, který se zabýval lidskými metabolickými poruchami, zejména alkaptonurií. V této souvislosti vyslovil předpoklad, že příčinou odchylných reakcí na léčiva jsou vrozené rozdíly v biochemických reakcích jednotlivých pacientů. Teprve v polovině dvacátého století se však tento jev začal zkoumat systematicky a postupně byla odhalena jeho podstata.

Na molekulární úrovni je příčinou genetické variability v reakci na léčiva polymorfismus DNA, nejčastěji jednonukleotidové polymorfizmy (SNP). Logicky se jedná o polymorfizmy v genech, jejichž funkce se uplatní v osudu léčiva po jeho vpravení do živého organismu, tj. v procesu biotransformace léčiva. Pro lepší názornost lze tuto proměnlivost rozdělit do čtyř skupin odrážejících cestu léčiva k jeho cílové molekule, jeho interakci s touto molekulou/molekulami a jeho účinek na konkrétní organismus.

1. Farmakokinetická variabilita (cesta k cíli v prostředí konkrétního organismu)

Je způsobena polymorfizmy v genech ovlivňujících absorpci, distribuci, metabolismus a eliminaci léčiv (princip ADME), a tudíž i kvalitu anebo kvantitu jejich účinku. Nejznámějšími a typickými příklady jsou geny kódující transportérové proteiny efluxové pumpy a podjednotky komplexu cytochromu P450, který hraje klíčovou úlohu v první fázi metabolismu léčiv.

2. Farmakodynamická variabilita (interakce s cílovou molekulou/molekulami)

Je způsobena polymorfizmy v genech kódujících molekuly, na které léčivo cílí (např. receptory, specifické intracelulární enzymy apod.), čímž vzniká proměnlivost v individuální reakci na přítomnost téhož léčiva i dávky. Příkladem je lidský gen *VKORC1*, který kóduje podjednotku 1 vitamín K epoxid reduktázového komplexu, což je transmembránový protein. Jeho polymorfismus je podstatnou příčinou individuální variability reakce na velikost dávky antagonistů vitamínu K (např. warfarinu), které se v humánní medicíně používají jako perorální antikoagulantia.

3. „On-target“ variabilita (vlastní účinek v konkrétním organismu)

Je způsobena polymorfizmy v genech kódujících proteiny zapojené ve vlastních účincích léčiva na organismus, například transkripční faktory, signální molekuly nebo dráhy buněčného metabolismu. Příkladem je lidský gen *LDLR*, kódující receptor pro „low-density“ lipoprotein. Jeho variabilita ovlivňuje reakci na léčbu statiny u lidské hypercholesterolemie.

4. „Off-target“ variabilita (nežádoucí účinek na přítomnost léčiva v organismu)

Je způsobena polymorfizmy v genech, které ovlivňují reakci na přítomnost léčiva, která se však netýká jeho vlastního léčebného efektu. Nejčastěji se jedná o nežádoucí imunitní reakci na molekulu léčiva a odpovídající geny. Příkladem je souvislost polymorfizmů hlavního histokompatibilitního komplexu lidí (HLA) s nežádoucími imunitními reakcemi (hypersensitivitou) na celou řadu různých léčiv.

11.3.1 Veterinární farmakogenetika

Poznatky o individuální genetické proměnlivosti v reakci na léčiva jsou u domácích zvířat prozkoumány a aplikovány mnohem méně než v humánní medicíně. Veterinární farmakogenetika je v tomto ohledu nejpokročilejší u psů a v menší míře u jiných druhů, jako koně, kočky nebo prasata. Domestikace zvířat a jejich následné šlechtění vedlo ke vzniku

plemen, u nichž došlo ke genetické fixaci původně individuálních rozdílů. Existence meziplemenných rozdílů v určitém znaku bývá prvním indikátorem genetické podstaty daného znaku a stimulem k dalšímu výzkumu individuální variability uvnitř každého plemene.

11.3.1.1 Farmakogenetické rozdíly mezi plemeny domácích zvířat

Existují ojedinělé příklady meziplemné variability v reakci na léčiva například u skotu, ovcí, prasat, nejlépe je však dokumentována u psích plemen. U skotu byl popsán rozdíl ve farmakokinetickém profilu mezi plemenem Aberdeen Angus a holštýnským skotem po podání moxidektinu, což je ve veterinární medicíně široce používané anthelmintikum. Pozorované rozdíly mohou být příčinou pozorované individuální variability klinické účinnosti tohoto antiparazitika. Rozdíly mezi ovčími plemeny byly pozorovány ve farmakokinetice a farmakodynamice reakce na superovulaci pomocí ovčího FSH při produkci embryí, podobně jako jsou známy individuální rozdíly v reakci na stimulaci FSH u krav – dárkyň embryí. U prasat byly pozorovány meziplemné rozdíly v expresi genů fungujících v metabolismu fenbendazolu. U psů byly popsány meziplemné rozdíly v reakci na léčiva, které často s léčivými souvisejí druhotně a odrážejí specifické vlastnosti těchto plemen, například tělesnou stavbu, podíl svaloviny a tuku apod. Některé z nich však souvisejí se specifickým metabolismem určitých skupin látek. Například dobrmani jsou citlivější na sulfonamidy, u labradorů bylo popsáno nižší riziko vzniku gastrointestinálního vředu po aplikaci ibuprofenu, naopak u německých ovčáků bylo toto riziko vyšší. Značné rozdíly mezi plemeny psů byly pozorovány v reakci na anticholinergika (atropin).

11.3.1.2 Individuální farmakogenetické rozdíly u domácích zvířat

1. Geny pro transportérové proteiny

I když doklady o rozdílech mezi plemeny jsou ojedinělé nebo jsou experimentální povahy, signalizují existenci prakticky významné variability uvnitř plemen. Polymorfismus genu z rodiny ABC transportérů je typickým příkladem praktického významu farmakogenetiky u psů a také vztahů mezi individuální a meziplemnou variabilitou. U kolí a některých dalších příbuzných ovčáckých plemen byla objevena mutace v genu *ABCB1* (*MDR1*), který kóduje tzv. P-glykoprotein, fungující v mechanismu ochrany savčích buněk před xenobiotiky. Delece 4

párů bází vede k předčasnému ukončení syntézy tohoto proteinu a ztrátě jeho funkce. Výsledkem je neschopnost ochránit buňky před vysokými koncentracemi některých léčiv, jako je ivermektin, doxorubicin nebo jiná léčiva. Mutace se pravděpodobně objevila ve Velké Británii kolem roku 1800 u společného předka ovčáckých plemen ještě předtím, než byly ustaveny specifické plemenné knihy. Z tohoto důvodu se tato mutace vyskytuje specificky u této skupiny plemen, i když její existenci u jiných plemen nelze vyloučit. Protože uvnitř každého plemene existuje individuální variabilita, vedle psů homozygotních a heterozygotních pro tuto deleci existují zvířata bez mutace. Frekvence nositelů mutace například u ovčáckých plemen je překvapivě vysoká. Její praktický význam spočívá nejen v její vysoké populační frekvenci (u dlouhosrstých kolíí až přes 70 %), ale i v tom, že se týká větší skupiny různých léčiv (zkratka MDR znamená „multi-drug resistance“). K identifikaci nositelů mutace je komerčně nabízen test DNA. Je nabízen i v ČR a veterinární lékaři by měli umět jeho výsledky pro chovatele korektně interpretovat. Delece dvou párů bází v genu *ABCB1* se stejným efektem na P-glykoprotein byla také zjištěna u koček. Údaje o jejich populačních frekvencích a tedy i praktickém významu však chybí.

2. Geny pro enzymy metabolizující léčiva

Individuální variabilita související také s meziplemennými rozdíly u psů byla také popsána pro řadu genů CYP450 komplexu, například pro geny *CYP1A2*, podrodin *CYP2B*, *C* a *D*, *NADPH* cytochrome P450 oxidoreduktázy, thiopurin s-methyltransferázy, n-acetyltransferázy, UDP glukuronyltransferázy, plasmatické esterázy a dalších genů. Na rozdíl od genu *MDR1* není klinický význam těchto polymorfizmů jednoznačně doložen a genetické testování se u nich běžně neprovádí.

3. Ostatní „farmakogeny“

U veterinárně významných druhů dosud nebyla popsána farmakodynamická a „on-target“ genetická variabilita. I když existuje řada příkladů „off-target“ idiosynkratických (individuálně charakteristických) reakcí na léčiva u psů a koček, často imunitní povahy, úloha genů MHC podobná jejich efektu u lidí nebyla studována. O těchto skupinách genů a jejich polymorfizmu a o jejich potenciálním klinickém významu ve veterinární medicíně tedy zatím existuje minimum informací. Výjimkou je gen *RYR1* ovlivňující reakci na inhalační anestetika

(syndrom maligní hypertermie) u lidí, prasat a psů, který lze zařadit do této kategorie a jehož úloha byla u zvířat studována zejména ve vztahu prasečímu stresovému syndromu.

11.4 Využití genomických technik ve vývoji nových léčiv: farmakogenomika

Genomické techniky se využívají k vývoji, testování a produkci nových léčiv. Jejich společným principem je využití poznatků molekulární biologie a genomiky, tytéž techniky se však dají použít k různým účelům, genetické i negenetické povahy. Protože je tento jejich společný princip vysvětlen v jiných předmětech studijního plánu veterinárního lékařství anebo v jiných kapitolách tohoto textu, zde pouze stručně shrneme jejich využití k výše uvedeným účelům.

11.4.1 Detekce farmakogenetické variability

Jak bylo uvedeno, nejčastější příčinou individuální genetické variability v reakci na léčiva jsou jednonukleotidové polymorfizmy v genech souvisejících s osudem a účinky léčiv v konkrétním organismu. K identifikaci těchto SNP a jejich funkčního významu lze efektivně využít jak cílených metod, tj. hledání SNP v kandidátních genech, tak celogenomový screening v podobě GWAS a studia genové exprese na úrovni RNA (genové čipy), případně proteinu (proteomické techniky). Výsledkem jsou molekulární markery, na základě kterých se dá předpokládat individuální reakce na konkrétní léčiva nebo jejich skupiny. Kromě jejich praktického využití v personalizované medicíně (například diagnostika mutací v genech *MDR1* u zvířat nebo *RYR* u lidí) mohou být užitečné pro sestavení vhodných skupin pacientů pro klinické zkoušky nebo ke studiu mechanismů účinků konkrétních léčiv.

11.4.2 Vývoj nových léčiv

Tradiční přístupy k vývoji nových léčiv jsou založeny na identifikaci a znalosti biologicky účinných chemických struktur a jejich derivátech. Éra genomiky obohatila vývoj nových léčiv o možnost využít jejich metod ke studiu biologických mechanismů nemocí a k vývoji léčiv, která tyto mechanismy mohou ovlivnit. Pomocí metod na úrovni DNA (GWAS) a RNA (analýza transkriptomu) je možné studovat rozdíly mezi zdravými a nemocnými jedinci, je možné identifikovat alelické varianty různých genů a jejich kombinace, které jsou rozdílně zastoupeny v obou skupinách (GWAS) nebo u kterých dochází k rozdílné expresi ve zdravých

a nemocných tkáních (geny zapnuté nebo vypnuté v důsledku chorobného procesu). Identifikace takových genů, poznání jejich interakcí s jinými geny a jejich zapojení do genových drah umožňuje vytipovat potenciální cíle farmakoterapie a hledat molekuly, které je mohou žádoucím způsobem ovlivnit. Jakkoli jsou tyto myšlenky zdánlivě jednoduché, jejich realizace je odborně i časově náročná, drahá a dosud nepřilíš efektivní. Počet studií, které až dosud vedly k identifikaci potenciálních cílů terapie a k identifikaci potenciálních nových léčiv je dnes už obrovský, stejně jako množství takových molekul. Nicméně pouze málo z nich vyhoví náročným kritériím uplatňovaným v různých stádiích vývoje nových léčiv a jednotky z nich projdou do posledních stádií klinických zkoušek. Přesto jsou farmakogenomické přístupy považovány za perspektivní oblast farmacie.

11.4.3 Vakcinomika

Genomika se efektivně uplatňuje i ve vztahu k produkci vakcín. Lze jí, podobně jako v produkci léčiv, využít ke dvěma účelům, a to k detekci a diagnostice individuální variability v odpovědi na vakcinaci (viz imunogenetika) a k designu a produkci nových typů vakcín. Genomiky se tedy dnes využívá k produkci vakcín druhé (geneticky manipulované vakcíny) a třetí (DNA vakcíny) generace vakcín. Komplexní integrace všech genomických, proteomických a bioinformatických přístupů k produkci vakcín, které dosud nebylo možno z nejrůznějších důvodů vyvinout, se někdy shrnuje pod pojem vakcinomika.

12. Genetika a reprodukce

12.1 Plodnost jako užitková vlastnost a jako zdravotní znak

Plodnost je schopnost produkovat zdravé a životaschopné potomstvo v počtu přiměřeném pro daný druh. Obecně je plodnost považována za komplexní znak s nízkou heritabilitou ($h^2 = 0,1 - 0,2$), do kterého se promítají vlastnosti zdraví i užitkovosti. Působí zde mnoho genů na mnoha chromozomech a v různých kombinacích se podílejí na jednotlivých složkách plodnosti, jako je tvorba funkčních gamet, podpora časného embryonálního a fetálního vývoje až po narození zdravého potomka.

Plodnost lze tedy popsat jako celek – komplexní kvantitativní znak s nízkou heritabilitou, který je složený z mnoha dílčích znaků jednoduše dědičných s vyšší (např. objem ejakulátu, míra ovulace) ale i nízkou heritabilitou (service perioda, míra zabřezávání po první inseminaci). Ačkoliv byla popsána řada asociovaných genů a QTL na téměř všech chromozomech (např. pro plodnost samců bylo identifikováno více než 800 genů), genetická podstata plodnosti zůstává díky genetické i biologické komplexnosti nejasná nerozšířována

12.2 Selektce na plodnost u domácích zvířat

Plodnost je u různých druhů zvířat popsána a měřena různě, záleží na obvyklém počtu potomků (uniparní nebo multiparní druhy, viz předmět Zootechnika).

Šlechtění na plodnost se provádí například u plemenných zvířat skotu, koní, u mateřských plemen prasat a u linií drůbeže s ohledem na co nejvyšší snášku. Existují dva přístupy, které se používají souběžně – pozitivní a negativní selekce. Znaky plodnosti jsou v současnosti také součástí genomické selekce.

Pozitivní selekce na plodnost se provádí výběrem zvířat z hlediska plodnosti nejlepších. Posouvá hranice potenciální plodnosti (schopnost vytvářet oplození schopné gamety), ale genetický pokrok je pomalý. Nejvíce se využívá u multiparních druhů s krátkým generačním intervalem, ale v různé míře vstupují parametry plodnosti do odhadu plemenných hodnot i u ostatních druhů.

Negativní selekce se týká zejména poruch plodnosti, které mají genetické založení a lze je tímto způsobem eliminovat. Provádí se u všech druhů. Efekt bývá rychlejší, zlepšuje aktuální plodnost (realizovaná plodnost, počet narozených mláďat), ale její možnosti se posléze vyčerpají a neposunuje hranice potenciální plodnosti.

12.3 Poruchy plodnosti

Poruchy plodnosti s genetickým založením zahrnují gametické a somatické mutace, chromozomální mutace a imunogenetické příčiny.

Chromozomální mutace – jsou nejčastější genetickou příčinou poruch plodnosti (viz kapitola Veterinární cytogenetika).

Gametické mutace – jejich projevem jsou dědičná onemocnění a některé vrozené vývojové vady. Eliminují se přenašeči. U recesivních letálních mutací dochází ke snižování plodnosti snižováním počtu mláďat (embryonální mortalita).

Somatické mutace vznikají *de novo*, nedědí se a jsou příčinou vrozených vývojových vad a abortů, nelze na ně tedy šlechtit.

Imunogenetické příčiny podílející se na snižování plodnosti zahrnují nekompatibilitu mezi matkou a plodem v různých krevních systémech. Po napití mleziva s protilátkami se u mláďete projeví hemolytická žloutenka – praktický význam má u koní, koček, vyskytuje se i u prasat.

12.4 Biotechniky v reprodukci domácích zvířat. Genetické dopady ET a AI v chovu zvířat.

Pro zlepšování plodnosti jsou využívány různé biotechniky, které sice nejsou genetickými metodami, ale mají významné genetické dopady, protože ovlivňují intenzitu selekce a genetický pokrok populace.

Umělá inseminace (AI) je nejstarší používanou biotechnikou. Spočívá v odběru ejakulátu, jeho zředění a kryokonzervaci v oplození-schopném stavu. AI je nejpropracovanější a nejvíce využívána u skotu, rozšířena je i u prasat. Používána je i u koní s výjimkou Anglického a

Arabského plnokrevníka, kde se umělá inseminace použít nesmí. Také je využívána v chovu krůt.

Kryokonzervace bezprostředně souvisí s umělou inseminací. Jedná se o řízený proces zmrazení buněk a jejich uchovávání v tekutém dusíku. Zamrazují se obvykle pohlavní buňky a embrya. Nejvíce je rozšířena u skotu, u prasat méně díky technickým problémům spojeným s uchováním spermatu. U koní existuje individuální variabilita v mrazitelnosti spermatu, u některých hřebců nelze sperma uchovat.

Mnohočetná ovulace a embryotransfer jsou biotechniky, kdy hormonální stimulace navodí ovulaci většího počtu vajíček, je provedena inseminace polyovulované elitní samice. Vznikne více embryí, která jsou vypláchnuta a přenesena hormonálně stimulovaným méně užitkovým příjemkyním. Metoda se uplatňuje v amplifikaci výborného genofondu. Proces může být spojen s produkcí mláďat požadovaného pohlaví (sexace embryí). Používá se u skotu, lze u koní.

12.4.1 Genetické dopady biotechnik

Umělá inseminace

Umělá inseminace zvyšuje reprodukční potenciál samců a intenzitu jejich selekce, jednotlivé rodičovské genotypy se prosazují mnohem intenzivněji. Použitím AI dochází k rychlému ovlivnění alelových frekvencí další generace a to jak v žádoucím směru (vlohy pro lepší užitkovost) tak zvýšením rizika rozšíření nežádoucích recesivních mutací (v případě, že jejich nositel, otec budoucí generace, zůstane neodhalen – např. „holštýnské“ mutace).

Díky velkému počtu potomků od jednoho jedince je možný odhad jeho plemenné hodnoty na základě testování potomků.

Mnohočetná ovulace a embryotransfer

Embryotransfer zvyšuje reprodukční potenciál elitních samic i intenzitu jejich selekce u uniparních druhů. Celý proces je u skotu součástí **programu MOET** (Multiple Ovulation and Embryo Transfer), kdy se kombinují biotechniky s výhodami malého chovného stáda. Dochází k intenzivnímu využívání nejlepších samčích i samičích zvířat zvyšováním počtu jejich potomků, urychluje se genetický pokrok. Pro tento přístup je charakteristický pyramidální způsob chovu o třech stupních. Geneticky elitní zvířata tvoří vrchol – nukleus (uplatňovaný MOET biotechniky, testování a genomická selekce). Jejich potomci (vlohy pro vysokou

užitkovost od vynikajících rodičů, vysoké koncentrace aktivních alel) tvoří druhý stupeň pyramidy a produkují užitková zvířata, která tvoří základnu chovu. V tomto systému mohou být plemenci selektováni na základě užitkovosti jejich sourozenců, což vede ke zkracování generačního intervalu. Využívání těchto reprodukčních biotechnik vede ke zlepšování genetické úrovně populace, ale zvyšuje se také riziko inbreedingu díky intenzivnímu využívání malého množství rodičů.

Kryokonzervace

Kryokonzervace umožňuje získat relativně rychle větší množství potomků a na základě informací o potomcích testovat plemennou hodnotu plemníka, zamrazené dávky se uvolní k širokému použití až po stanovení PH.

Technika má uplatnění také v programech uchování genetické diverzity jak domácích, tak ohrožených zvířat. Šlechtění svou podstatou redukuje genetickou variabilitu. Právě ohrožená, lokální plemena a kmeny jsou zdrojem genetické variability. Pokud není, zejména z ekonomických důvodů, možné jejich zachování v běžném chovu, jsou uchovávány ve formě zamrazených pohlavních i somatických buněk a embryí v kryobankách (u nás např. v kryobankách Českomoravské společnosti chovatelů v Hradištku, Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického Jihočeské univerzity ve Vodňanech a Výzkumného ústavu živočišné výroby v Uhřetěvsi).

Jsou ověřovány i možnosti sexace spermatu (průtoková cytometrie, imunologická separace) a embryí (PCR z jedné buňky – SRY oblast). I když sexace je možná, zatím dochází k významnému snižování úspěšnosti inseminace sexovaným spermatem. Separace spermatu podle pohlaví má svůj význam v produkčních chovech preferujících jedno pohlaví (masná produkce preferuje samce, mléčná produkce samice). Sexace je využitelná i pro repopulaci ohrožených druhů a management chovu zvířat v zajetí, ale zatím není uplatňována ve větší míře v praxi.

12.5 Principy klonování a jeho aplikace u domácích zvířat

Biotechnikou související s reprodukcí je i klonování. Klonování obecně je tvorba identických jednotek. Může probíhat na různých úrovních – klonování molekul DNA metodami

molekulární biologie, klonování buněk mitózou, klonování jedinců mikromanipulačními technikami. Přirozeně vznikají geneticky identičtí jedinci jako identická vícerčata

12.5.1 Principy klonování

Klonování jedinců bylo prováděno zpočátku dělením časných embryí zvířat *in vitro* a jejich následným přenosem náhradním matkám. Tento přístup měl svoje omezení v počtu identických jedinců (4) získatelných z jednoho embrya. Metoda, která je považována za klonování v současné době, spočívá v **přenosu jader diploidních buněk do enukleovaného neoplozeného vajíčka (cytoplastu).**

Zpočátku byla přenášena jádra buněk embrya později i jádra buněk somatických. Embryonální buňky jsou nediferencované a totipotentní, při klonování si zachovávají schopnost diferenciaci do jakékoli tkáně. Somatické buňky jsou již plně diferencované, nesou sice kompletní genetickou informaci, ale liší se aktivitou genů. Tělní buňka tedy získává během vývoje svou specializaci (diferenciaci) a ztrácí vývojový potenciál. Pro úspěšné klonování je nutno **reprogramovat** přenášené jádro do stavu totipotence, jaký mělo na počátku vývoje. Reprogramování přirozeně nastává v primordiálních zárodečných buňkách během gametogeneze a v zygotě bezprostředně po oplození. Při klonování se reprogramování děje v cytoplazmě vajíčka v metafázi II, princip není přesně znám. Předpokládá se, že faktory z cytoplazmy vajíčka proniknou do jádra a reprogramují jeho genetickou informaci. Jedná se o epigenetický proces, který nemění sekvenci nukleových kyselin, ale její biochemické vlastnosti a vlastnosti proteinů navázaných na DNA. Oocyt musí být k reprogramování a k dalšímu vývoji embrya aktivován, čehož se dosahuje různými způsoby, např. kombinací chemických a fyzikálních stimulů (napodobuje se stav při oplození). Teoreticky může klonování umožnit produkci velkého množství geneticky identických jedinců. Ačkoliv je v současné době klonována celá řada druhů (ovce, skot, myš, koza, prase, makak, kočka, králík, pes, kuň, velbloud aj.), účinnost klonování stále zůstává velmi nízká (pod 1 %). Příčinou je pravděpodobně nedokonalý průběh reprogramování jádra.

12.5.2 Epigenetické změny při používání biotechnik v reprodukci

Epigenetické změny jsou dědičné změny ve funkci genů, mění se aktivita genů, je ovlivňován fenotyp, aniž by došlo ke změně genotypu (sekvence nukleotidů). **Epigenetické mechanismy zahrnují metylaci DNA, modifikace histonů, s tím spojenou modifikaci chromatinu a RNA**

interference. Tyto procesy mají významnou, i když ne zcela prozkoumanou roli v reprodukčních znacích. Při používání biotechnik v reprodukci jsou buňky vystaveny umělému prostředí, které se může od přirozeného prostředí lišit. Nedostatek esenciálních látek vede obvykle k zániku buněk a embryí, při nadbytku může docházet k epigenetickým změnám, které se projeví později během březosti nebo po narození.

K epigenetickým poruchám (chyby v imprintingu genů, v inaktivaci X chromozomů, změna exprese genů apod.) dochází jak při použití biotechnik jako je kryokonzervace, *in vitro* fertilizace či embryotransfer, tak při klonování. U klonů jsou však tyto poruchy mnohem častější zřejmě zejména kvůli neúplnému reprogramování jádra. Aktivita genů u klonů, přestože mají geneticky identické chromozomy s dárce jádra, často neodpovídá požadavkům vývoje embrya a plodu právě v důsledku epigenetických abnormalit (vysoké ztráty během březosti, vysoká úmrtnost po narození, poruchy imunitního systému, syndrom velkých mláďat, selhání orgánů, placentární a vývojové abnormality).

Pokud by se podařilo tyto problémy překonat, klonování by mohlo být využíváno zejména ve dvou oblastech - k reprodukčnímu nebo terapeutickému klonování (buněčné terapii).

Reprodukční klonování

Cílem reprodukčního klonování je rozmnožení zvířat s unikátním genotypem (elitní jedinci, jedinci se specifickými vlastnostmi, „rekonstrukce“ gonád apod.) nebo zvířat ohrožených (divoký tur, antilopa, pokusy s pandou, kočkovitými šelmami). Řada získaných klonů je také transgenních (viz kapitola Genové manipulace) s vneseným nebo/a knockaut genem (např. prasata pro xenotransplantace, skot a ovce odolné vůči prionovým onemocněním, skot a kozy exprimující transgen v mléce aj.). Příprava klonovaného zvířete (tedy opakování už existující genetické informace) trvá relativně dlouhou dobu a během tohoto období dochází u běžné klasicky šlechtěné populace k selekčnímu pokroku. Široké využití klonů pro běžnou šlechtitelskou praxi proto není pravděpodobné i z hlediska uchování genetické variability. Základem chovu zůstává šlechtění, tedy selekce a plemenitba.

Terapeutické klonování (buněčná terapie)

Další rozvíjející se oblastí aplikace klonování je jeho využití v tkáňové nebo buněčné terapii. Toto terapeutické klonování probíhá zpočátku stejně jako klonování reprodukční, ale cílem je získání embryonálních kmenových buněk (ESC). ESC jsou buňky, které jsou získány kultivací

buněk vnitřní buněčné masy blastocysty. Jsou pluripotentní, schopné diferencovat do jakékoliv tkáně a to z nich dělá perspektivní materiál pro léčbu řady onemocnění. Kultivací ESC v různých podmínkách se již podařilo ESC diferencovat do různých buněčných typů (neurony, kardiomyocyty, endoteliální buňky, osteoblasty, hepatocyty aj.).

Terapeutické klonování pak zjednodušeně řečeno znamená, že pacient je dárce jádra somatické buňky, které je podrobena klonování. Z vyvíjejícího se embrya je ustavena linie embryonálních kmenových buněk a tyto buňky jsou dále specificky kultivovány a diferencovány do žádané tkáně. Takto změněná buňka je histokompatibilní s dárce jádra (pacientem) a bude vrácena zpět do pacientova těla k léčbě konkrétního onemocnění. Při terapii pomocí ESC je třeba brát v úvahu etický aspekt, protože embryo vzniká pouze za účelem jeho následné destrukce a využití k produkci ESC.

Tento problém by mohlo vyřešit zjištění, že je možné v buňky pluripotentní přeměnit i dospělé diferencované buňky vnesením vektorů s geny (princip viz kap. Genové manipulace) několika klíčových transkripčních faktorů. Tyto transkripční faktory aktivují v buňkách celou škálu dalších genů, což nakonec vede ke změně funkce a vzhledu somatických buněk v indukované buňky pluripotentní (iPC). Problémem zůstává, že část vnesených genů jsou protoonkogeny, které mohou být příčinou nádorového bujení. V současné době (2019) probíhají klinické zkoušky využití ESC a iPC u lidí v terapii některých očních, nervových a srdečních chorob a u poškození chrupavek (<https://www.clinicaltrials.gov>). Potenciál terapeutického klonování je obrovský, jeho využití je ale zatím limitováno jednak nedostatkem informací, jak kultivovat a diferencovat kmenové buňky do různých tkání a také jejich genetickou nestabilitou a sklonem k nekontrolovatelnému růstu.

13. Molekulární diagnostika ve veterinární medicíně

Molekulární biologie se snaží popsat vznik, strukturu, funkci a interakce biologických makromolekul, a tím objasnit vlastnosti a funkce živých organismů (a virů). Využívá k tomu metody fyzikální (např. centrifugace, hmotnostní spektrometrie, rentgenová krystalografie), chemické a mnohé biomedicínské obory (např. imunohistochemie, fluorescenční mikroskopie a moderní zobrazovací metody živých buněk a tkání), jakož i vlastní nástroje a metodologii (např. techniky rekombinantních DNA, mutageneze), které naopak ovlivňují rozvoj poznání biologických dějů v organismu (fyziologických nebo patologických) na molekulární úrovni a také rozvoj biotechnologií (produkce biologických makromolekul s využitím ve vědě, farmacii, v průmyslu atd.). Užší oblast dějů, týkající se přenosu genetické informace a funkce informačních makromolekul (nukleové kyseliny a proteiny) studuje molekulární genetika.

13.1 Základní pojmy a principy molekulární genetiky

Molekulární metody jsou dnes standardem laboratorní diagnostiky v řadě oblastí veterinární medicíny. Veterinární lékaři nepotřebují detailní znalosti o jejich technickém provádění, ale měli by rozumět podstatě nejvýznamnějších z nich a měli by umět interpretovat výsledky vyšetření, která se jimi provádějí. K tomu by měla napomoci i tato na první pohled spíše teoretická kapitola.

Informační makromolekuly jsou z biochemického hlediska heteropolymery obsahující v mnohonásobném opakování v různém pořadí příslušné monomery. Pořadí monomerů tvoří primární strukturu daného biopolymeru. Úsek polynukleotidu s konkrétním pořadím nukleotidů se označuje jako **nukleotidová sekvence** (DNA-sekvence, RNA-sekvence) a pro zjednodušení se zapisuje většinou zkratkami pro purinové a pyrimidinové báze (A, C, G, T/U) jako jednořetězcová molekula ve směru od 5' - fosfátového po 3' - hydroxylový konec (5'→3'). Úsek polypeptidu vyznačující se konkrétním pořadím aminokyselin se označuje jako **aminokyselinová sekvence**, která se zapisuje pomocí jednopísmenných zkratk pro aminokyseliny (A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y) ve směru od amino- po karboxylový konec molekuly.

Molekula DNA je většinou v živých organismech (*in vivo*) tvořená dvěma komplementárními a antiparalelními polydeoxyribonukleotidovými řetězci. Tvoří tak dvouřetězcovou **dsDNA** (double-stranded) v podobě dvoušroubovice, jejíž velikost vyjadřujeme v počtu nukleotidových párů sekvence (párů bází – bp z angl. base pairs, kilobází – kb nebo megabází - Mb). Přechodně se může vyskytovat též jako jednořetězcová **ssDNA** (single-stranded) v interakci s různými proteiny nebo permanentně ve virionech některých virů. Ke vzniku nové molekuly dsDNA dochází semikonzervativní replikací na rozvolněných řetězcích, které slouží jako vzor (**templát**) pro syntézu nových komplementárních řetězců. Pomocí denaturace *in vitro* může být dsDNA rozdělena na jednotlivé řetězce ssDNA, které mají schopnost v roztoku opět renaturovat tj. na základě komplementarity bází obnovit původní dvouřetězcovou strukturu. Při kombinaci roztoků ssDNA z různých zdrojů (nebo s roztoky ssRNA) může dojít k spojování částečně nebo úplně komplementárních řetězců z různých dsDNA za tvorby hybridních molekul DNA (nebo DNA/RNA).

Pojem komplementární DNA (**cdDNA**) označuje molekulu (soubor molekul) specificky připravenou *in vitro* působením reverzní transkriptázy na izolovanou mediátorovou RNA (soubor molekul) a v případě eukaryotických organismů představuje pouze sled exonů příslušného genu na rozdíl od exon-intronové organizace tohoto genu v genomické DNA (**gdDNA**) obsažené v chromozomech.

Krátké **oligonukleotidy** představují chemicky syntetizované molekuly ssDNA se záměrně zvolenou sekvencí a jsou využívány jako primery (s délkou obvykle 18-30 nukleotidů) anebo sondy (dlouhé 15-50 nukleotidů) v různých aplikacích.

Různé typy RNA molekul (**lncRNA**, **mRNA**, **miRNA**, **rRNA**, **snRNA**, **tRNA**) vznikají v buňkách na základě informace obsažené v DNA v procesech transkripce a posttranskripčních úprav. Jejich velikost vyjadřujeme v počtu nukleotidů (nt). I když tyto molekuly RNA jsou jednořetězcové, díky komplementaritě úseků v rámci molekuly vytváří různě složité sekundární případně terciární struktury. Některé specializované RNA molekuly mohou katalyzovat štěpení a spojování RNA molekul bez přítomnosti proteinů a označujeme je jako **ribozomy**.

Proteiny jsou tvořeny jedním nebo vícero polypeptidovými řetězci, které mají specifickou sekundární strukturu v závislosti na motivech aminokyselin v polypeptidu a zaujímají komplexní terciární a kvartérní struktury. Protein může představovat soubor různých domén – oblastí s rozdílnou funkcí. Při interakcích proteinů může docházet ke změně konformace (odhalení/skrytí domény) nebo chemické modifikaci a tím k aktivaci/deaktivaci některé z domén. K identifikaci a charakterizaci proteinů využívá molekulární biologie mnoho sofistikovaných metod pro proteomiku, které jsou však nad rámec této kapitoly. Získané

sekvence jsou po charakterizaci uloženy v **databázích** volně dostupných přes internet a umožňují tak vyhledávání stejných (identických) nebo podobných (homologických) už popsaných sekvencí. Obdobně existují možnosti sekvenovat nukleové kyseliny (viz dále).

13.1.1 Obecné metody pro práci s nukleovými kyselinami

Při práci s informačními makromolekulami se využívá celá řada metodických přístupů. Z nich je pro veterinárního lékaře vhodné vyzvednout izolaci nukleových kyselin. **Izolace nukleových kyselin** je základní krok, který má za úkol z biologického vzorku získat dostatečné množství kvalitních molekul, v závislosti na povaze vstupního materiálu se volí různé postupy k uvolnění buněk (homogenizace, pulverizace) a působení enzymů (lysozym, celulázy) a detergentů (dodecylsulfát sodný). Z hlediska veterinární medicíny je třeba upozornit na to, že odběr biologického materiálu pro genetické analýzy, dodržení všech doporučených postupů při odběru i zasilání vzorků je významným faktorem ovlivňujícím kvalitu výsledné DNA, která bude sloužit ke genetickému testování.

13.1.2 Metody molekulární genetiky založené na amplifikaci

Amplifikace DNA pro účely diagnostické i jiné je dnes základním laboratorním postupem i ve veterinární medicíně.

13.1.2.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (**PCR**) představuje rychlou *in vitro* metodu k pomnožení definované cílové sekvence přítomné ve vzorku DNA. Nejčastěji se využívá selektivní amplifikace specifického úseku dsDNA v heterogenním souboru molekul DNA za použití dvou oligonukleotidových **primerů** se známou sekvencí, které jsou komplementární ke koncům cílového úseku a vymezují ho připojením k denaturované DNA v orientaci svých 3'-hydroxylových konců proti sobě. Na těchto koncích termostabilní DNA polymeráza v přítomnosti deoxynukleozidtrifosfátů (dNTP) zahájí syntézu nového řetězce DNA podle templátu. PCR je řetězová reakce, protože nově vzniklé molekuly DNA budou templátem pro syntézu v dalším cyklu reakce. V každém cyklu se střídají tři teplotní kroky: denaturace dsDNA (92-95°C), připojení primerů (50-60°C), syntéza DNA (68-75°C). Teplotní profily a délka

časových intervalů bývá naprogramována v přístroji (**termální cykler**), který automaticky mění požadované teploty. V principu se tak dosáhne zmnožení jedné původní cílové sekvence na 2^{36} (cca 68 miliard) fragmentů dsDNA po 35 cyklech PCR, které se dají charakterizovat gelovou elektroforézou jako proužek s určenou velikostí. Vhodné polymerázy (jejich geny) byly získány z termofilních mikroorganismů např. *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polymeráza), *Thermus thermophilus* (*Tth*), *Thermotoga maritima* (*Tma*), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), *Pyrococcus woesei* (*Pwo*). Specificita PCR závisí především na jedinečnosti sekvencí primerů, které mohou být ale záměrně syntetizovány i s použitím inosinu (báze schopná se vázat s kteroukoliv jinou bází) nebo jako směs sekvencí s některými identickými a některými odlišnými pozicemi (částečně **degenerované oligonukleotidy**) a umožňují tak amplifikaci příbuzné sekvence v rámci druhu nebo mezi druhy organismů, případně pomnožení vícero cílových sekvencí. Primery s náhodnými sekvencemi (směs oligonukleotidů s délkou 6 nukleotidů) se mohou vázat na četná místa v templátové DNA a zprostředkovat tak PCR zmnožení všech přítomných sekvencí před další manipulací (**celogenomovou amplifikací**) v případech limitního množství vyšetřované DNA (starodávná DNA, proužky chromozomů po mikrodisekci, typizace jednotlivých buněk).

13.1.2.2 Modifikace polymerázové řetězové reakce

Existuje větší množství modifikací PCR, z nichž ve veterinární diagnostice se nejčastěji setkám s následujícími.

In situ PCR slouží k amplifikaci specifických sekvencí přímo v buňkách nebo mikroskopických preparátech chromozomů a formalinem fixovaných tkání, přičemž produkty lze vizualizovat následnou hybridizací se sondou nebo imunochemicky. Oproti samotné hybridizaci *in situ* má vyšší citlivost, neboť dochází k amplifikaci cílových sekvencí a je možné detekovat sekvence původně v malém počtu molekul ve vzorku.

Zpětná PCR (RT-PCR) znamená použití reverzní transkriptázy a oligo(dT)-primeru pro prepis mRNA molekul do cDNA, která je prostá intronů a stabilnější než molekula RNA.

Alelově specifická PCR (AS-PCR) umožňuje detekci známých bodových mutací ve dvou nebo více paralelních PCR s použitím alelově specifického primeru. Specificky amplifikuje

jednu ze dvou možných alel, která je předmětem našeho zájmu (například alela s nežádoucím účinkem na významné znaky).

Nested-PCR slouží ke zvýšení specifity produktu PCR a je kombinací alespoň dvou následných reakcí, kdy v první PCR vzniká produkt za použití jednoho páru primerů, ten je následně rozředěn a použit jako templát do další PCR s jiným párem primerů. Ty jsou sice komplementární k oblastem uvnitř prvního PCR produktu, ale kdyby byly použity na gDNA, vedly by k tvorbě směsi různých produktů (např. příbuzných genů nebo genu a pseudogenu).

Multiplex PCR označuje použití vícero párů specifických primerů v jedné PCR reakci, po optimalizaci podmínek reakce se tak dosáhne simultánní amplifikace vícero cílových sekvencí např. při genotypizaci většího počtu markerů.

Real-time PCR je metodologie založená na sledování průběhu PCR pomocí měření úrovně fluorescence jednotlivých reakcí v souboru. Kvalitativní analýza sleduje přítomnost/nepřítomnost specifického produktu ve vzorcích zatím co kvantitativní analýza hodnotí vstupní množství kopií templátu ve vzorku použitým do PCR porovnáním s kalibrační přímkou získanou analýzou standardů se známým množstvím kopií.

Využití PCR a jejích variant ve veterinární medicíně je prezentováno ve specializovaných disciplínách.

13.1.2.3 Metody sekvenování

Sekvenování DNA je stanovení primární struktury DNA, tj. určení sekvence nukleotidů v konkrétní molekule. Klasické metody sekvenování byly technologickým rozvojem rozšířeny do mnoha variant, přičemž některé se v současnosti už nevyužívají. Zachovává se hlavně Automatické Sangerovo sekvenování, enzymatická metoda umožňující získat sekvenci cca 900-1200 nukleotidů buď neznámého fragmentu DNA neseného vhodným vektorem nebo fragmentu DNA získaného pomocí PCR. Požadavky celogenomových projektů vedly ke vzniku úplně odlišných postupů sekvenování nové generace (**NGS** - z anglického next-generation sequencing). Ty využívají různé principy a zaměřují se jednak na navýšení kapacity stanovovaných sekvencí, jednak na prodloužení limitu délky molekuly, která může být sekvenována vcelku. Dnes tak existují metody dovolující sekvenovat jednotlivé molekuly DNA v délce desítek až stovek kilobází, což výrazně pomáhá při sestavování celogenomových

sekvencí. Umožňují také sekvenovat vcelku jednotlivé RNA molekuly buď přímo nebo ve formě cDNA a zjistit tak jejich množství v buňce ale i zastoupení různých izoform (splicingových variant) v rámci transkriptomu dané buňky.

13.1.3 Metody molekulární genetiky založené na hybridizaci

Hybridizace nukleových kyselin je postavena na schopnosti individuálních jednořetězcových molekul vytvářet dvouvláknové molekuly na základě pravidla o párování bází a dostatečně vysoké úrovně vzájemné komplementarity. Klasické metody využívají definovanou značenou nukleovou kyselinu (**sondu**) k identifikaci příbuzných DNA nebo RNA molekul (tj. s vysokou podobností sekvencí) v směsi různorodých neznačených molekul - **cílové nukleové kyselině**.

Tečková hybridizace může využít různé typy sond, vzorek cílové nukleové kyseliny není nijak velikostně upravován, ale je po denaturaci přímo nakapán na membránu a vysušen. Je to rychlá screeningová metoda umožňující vyšetřit větší počet individuálních biologických vzorků.

U Southernova přenosu je kterýkoliv typ sondy hybridizován s cílovou **DNA** (typicky gDNA), která byla štěpena pomocí restričních endonukleáz, fragmenty velikostně rozděleny pomocí gelové elektroforézy a po denaturaci silným alkalickým činidlem jako jednořetězce přeneseny a ukotveny na membráně. Po hybridizaci a detekci pozice sondy na membráně je možné porovnáním s původním gelem odhadnout velikost fragmentu.

Northernový přenos využívá kterýkoliv typ sondy k hybridizaci s cílovou **RNA** (typicky celková RNA buňky/tkáně), která byla rozdělena velikostně gelovou elektroforézou a řetězce následně přeneseny na membránu. Prvořadým využitím je charakterizace exprese genu v různých tkáních organismu s cílem určit typ tkáně s expresí a relativní množství transkriptů. Umožňuje odhalit i odchylky ve velikostech transkriptů, což signalizuje využití alternativních promotorů nebo splicingu pro odlišné formy mRNA.

Chromozomální *in situ* hybridizace je metoda pro fyzické mapování genů nebo jiných DNA sekvencí (izolovaných z genomu klonováním) na metafázních nebo prometafázních chromozomech cytologického preparátu. Zavedení fluorescenční hybridizace *in situ* (**FISH**) znamenalo zásadní krok v rozvoji cytogenetiky, kdy použitím spektra různě fluorescenčně značených sond a vizualizací ve fluorescenčním mikroskopu lze identifikovat jednotlivé chromozomy a sledovat jejich změny v rámci celého karyotypu.

Tkáňová *in situ* hybridizace využívá oligonukleotidy nebo sondy připravené *in vitro* transkripcí klonované cDNA příslušného genu k hybridizaci na cílovou RNA, která se nachází v buňkách nebo řezech tkání fixovaných na podložním skle. S vysokou přesností tak stanoví její prostorovou lokalizaci v rámci řezu tkáně z parafinového bločku nebo zmražené tkáně.

V současnosti je hybridizace využívána v obrovském měřítku např. při charakterizacích individuálních genomů nebo sledování exprese všech genů (transkriptom)

DNA-čipy je miniaturizovaná a automatizovaná technologie s obrácenou hybridizací, kdy je na skleněný povrch fixováno velké množství (řádově desetitisíce) DNA klonů pomocí mikrotisku v přesném schématu nebo je ještě větší množství oligonukleotidů (statisíce až milion) umístěno pomocí *in situ* syntézy na skleněném povrchu čipu. Známa je tak poloha sondy a její sekvence. Cílová nukleová kyselina (gDNA, RNA nebo cDNA) je upravena na vhodnou velikost fragmentů, značena fluorescenčně a hybridizována nanesením roztoku na povrch mikročipu. Po odmytí nenavázané cílové nukleové kyseliny je povrch skenován pomocí detektoru fluorescence a obraz počítačově vyhodnocen. Všechny pozitivní signály jsou zaregistrovány a je vygenerován seznam případně relativní zastoupení přítomných sekvencí. Z hlediska použití rozeznáváme SNP-čipy a genové čipy.

SNP čipy pomocí velkého množství alelově specifických oligonukleotidů umožňují stanovit **genotyp** značného počtu pozic (markerů) v genomu jedince a jsou podkladem např. pro porovnání frekvencí polymorfizmů mezi skupinami jedinců v rámci GWAS. Design SNP-čipů pro jednotlivé živočišné druhy vychází ze znalosti variability genomu daného druhu a existují čipy s různou kapacitou.

Genové čipy naproti tomu využívají jako sondy vhodně navržené oligonukleotidy reprezentující všechny exprimované geny příslušného genomu nebo soubor klonů cDNA daného živočišného druhu. Umožňují tak ze vzorku určité tkáně stanovit soubor exprimovaných genů – **transkriptom** nebo jsou podkladem pro porovnání exprese vybraných genů v různých tkáních nebo u rozdílných jedinců (např. zdravý vs. nemocný).

13.2 Metody molekulární biologie využívané ve veterinární medicíně a v hygieně a technologii potravin.

Základní výzkum ve veterinární medicíně se opírá o široké spektrum sofistikovaných metod molekulární biologie, pomocí kterých se snaží objasnit biologické děje na molekulární úrovni ve zdravém a nemocném organismu, a odhalit tak např. různorodost příčin nebo patologického procesu u konkrétního onemocnění, případně identifikovat molekulární markery významné z hlediska diagnostiky atd. V praxi jde spíše o využití těchto poznatků a použití více či méně náročných testů za účelem diferenciální diagnostiky u většího počtu organismů. Ještě větší množství vzorků k testování lze očekávat v rámci dohledu veterinární hygieny. Použití metod molekulární biologie se často odvíjí od sledovaného cíle, praktičnosti a dostupnosti metody jakož i ekonomické rozvahy nákladů. Většinou se můžeme setkat se situací, kdy je možné použít vícero přístupů a neexistuje striktní předpis pro využití té či oné metody. V tomto kontextu je třeba chápat i následovné příklady metod pro řešení vybrané problematiky v diagnostických postupech.

Vyšetřovaný materiál představuje různorodé typy biologických vzorků pocházejících z rozdílných úrovní živých organismů (exkrementy, tělní tekutiny, buňky periferní krve, biopsáty tkání, cytologické preparáty) či mrtvých organismů (vnitřnosti, maso, kosti, kosterní pozůstatky) zvířat nebo rostlinné materiály jako suroviny pro potravinářství. Odběry vzorků a nakládání s nimi se řídí příslušnými doporučeními a předpisy. Pokud zúžíme problematiku na metody molekulární genetiky, v principu se může jednat o důkaz konkrétního proteinu (ELISA) či identifikaci spektra proteinů (hmotnostní spektrometrie) v biologickém vzorku, nebo obdobně o důkaz konkrétní nukleové kyseliny (PCR, hybridizace) či identifikaci neznámé nukleové kyseliny (PCR → sekvenování → prohledávání databázi). V této souvislosti má významné postavení také zjištění množství konkrétní sekvence ve vzorku nukleové kyseliny (kvantitativní PCR, DNA-čipy).

Různorodost využití metod molekulární genetiky ilustruje následující tabulka 5.

Tab. 5: Příklady použití metod molekulární genetiky

Úkol	Princip řešení	Metoda
Určení chromozomálního pohlaví u ptáků	analýza genu pro amelogenin, rozdílné formy na pohlavních chromozomech	PCR a gelová elektroforéza – rozlišení na základě velikosti PCR produktů
Určení genetického založení zbarvení srsti u zvířat v chovech	genotypizace známých mutací ve vybraných lokusech	PCR a gelová elektroforéza, alelově specifická PCR, PCR-RFLP, real-time PCR
Určení genetického založení u jedince s vrozenou vývojovou vadou	<ul style="list-style-type: none"> - genotypizace nejčastějších mutací ve známých lokusech - identifikace neznámých mutací v lokusu 	<p>alelově specifická PCR, PCR-RFLP, real-time PCR</p> <p>PCR a sekvenování</p>
Detekce RNA-virů	důkaz specifické sekvence RNA	RT-PCR
Detekce bakteriálních patogenů	<ul style="list-style-type: none"> - důkaz specifické sekvence z genomu bakterie - identifikace bakteriální kolonie po kultivaci analýzou 16S rRNA genu 	<p>PCR a gelová elektroforéza, real-time PCR</p> <p>PCR pomocí univerzálních primerů a sekvenování PCR produktu</p>
Detekce GMO plodin	důkaz specifických sekvencí	PCR, real-time PCR
Autentifikace surovin živočišného původu	důkaz druhově specifické sekvence genu mitochondriální DNA	PCR a gelová elektroforéza, PCR-RFLP
Detekce falšování masa druhovou záměnou	<ul style="list-style-type: none"> - důkaz vybraných druhově specifických sekvencí genu mitochondriální DNA - stanovení poměrného zastoupení druhově specifických sekvencí 	<p>PCR a gelová elektroforéza, PCR-RFLP, real-time PCR</p> <p>real-time PCR (kvantitativní analýza)</p>
Určení neznámého druhového zastoupení v masných výrobcích	screening genu cytochrom b mitochondriální DNA vybrané skupiny organismů	DNA-čipy

13.3 Molekulární testy parentity

K odhadům plemenné hodnoty slouží jak údaje o vlastní užitkovosti jedince, tak informace o jeho příbuzných. Špatně určený původ potomka může zkreslit jeho plemennou hodnotu a následně i selekci. V provozních podmínkách chovů může docházet k rozporům mezi plemenářskou evidencí a skutečným biologickým stavem např. díky záměně inseminační dávky, záměnou potomstva ještě před označením (zejména u selat, ale i při narození více telat v jedné stáji během nepřítomnosti personálu), náhodnou chybou při zápisu inseminace atd. Předpokladem kvalitní plemenářské práce je tedy prověřený původ a identita plemenných zvířat.

Zákon 154/2000 Sb. přikazuje stanovovat genetický typ (identitu, DNA profil) a ověřovat původ u vybraných kategorií zvířat (viz dále). Původ a genetický typ skotu, koní, prasat, ovcí, koz, drůbeže a běžců se ověřuje vylučovací metodou pomocí krevních skupin, biochemických polymorfních znaků, ale zejména hlavní určující metodou pomocí mikrosatelitů (v ČR plošně od r. 2002). Podle zákona musí být původ ověřen u býků před výběrem k plemenitbě, u hříbat narozených po inseminaci nebo po přenosu embryí, u hříbat plemene anglický plnokrevník a klusák, u hejna plemenných ryb zařazených do genetických zdrojů a do plemenitby, u dovezeného plemenného materiálu včel, u beranů, kozlů a hřebců zařazených do inseminace. Genetický typ musí být stanoven u býků a hřebců vybraných pro plemenitbu, kanců v rozsahu stanoveném ve šlechtitelském programu, beranů a kozlů zařazených do inseminace. Bez ověření původu nelze zvířata uplatnit v plemenitbě. U malých zvířat, koček a psů není ověřování identity a původu povinné, rozhodování spadá do kompetence Chovatelských klubů a svazů.

Při určení genetického typu a původu se využívají genetické markery. Marker je místo v DNA, ve kterém existuje populační variabilita, je polymorfní. Existují různé typy polymorfizmů, jedním z možných rozlišení je polymorfizmus sekvenční a délkový. U **sekvenčního** polymorfizmu jsou jednotlivé polymorfní varianty dány rozdíly v sekvenci nukleotidů – např. CGATGG × CGACGG. **Délkový** polymorfizmus se vyskytuje u mikrosatelitních markerů, které jsou dnes převážně pro stanovení původu využívány. **Mikrosatelit** (krátká tandemová repetice, short tandem repeats, STR) je místo v sekvenci DNA, kde se několikrát za sebou opakuje krátký motiv (repetice) dvou až šesti nukleotidů. Příklad různých mikrosatelitů je znázorněn na obr. 12.

AT AT AT..... - dinukleotid
TAG TAG TAG..... - trinukleotid
TAGC TAGC TAGC..... - tetranukleotid
TAGGC TAGGC TAGGC..... - pentanukleotid
TAGGCG TAGGCG TAGGCG - hexanukleotid

Obr 12: Ukázky opakujících se motivů v mikrosatelitech.

Mikrosatelity jsou velmi časté, vyskytují se napříč celým genomem. Mutují mnohem rychleji než jiné oblasti genomu, nejde ale o delece nebo inserce jako u sekvenčního polymorfizmu, ale o změnu počtu opakování motivu (dynamické mutace). Polymorfizmus mikrosatelitů bývá proto vysoký a spočívá v rozdílné délce alel díky rozdílnému počtu repetic. V populaci se tedy vyskytuje v mikrosatelitu vždy několik alel např. 4 alely v trinukleotidové repetici viz obr 13.

TAG TAG TAG TAG TAG alela 5

TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG alela 7

TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG alela 11

TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG TAG alela 12

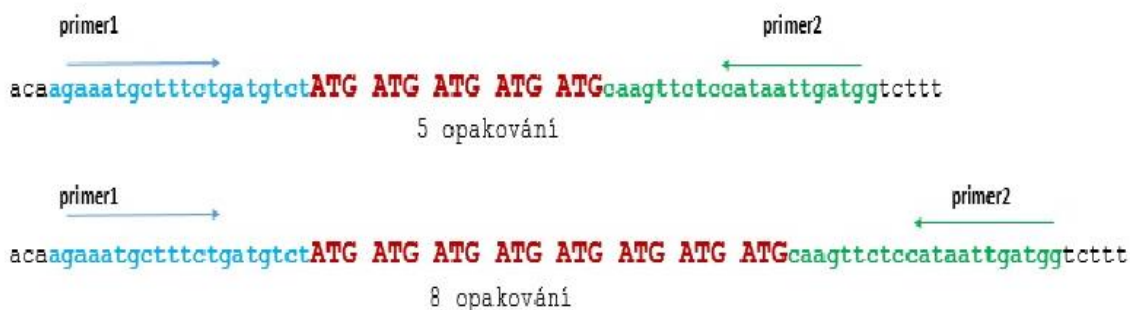
Obr. 13: Alely trinukleotidové repetice.

V genomech různých organismů nalézáme nejčastěji mikrosatelity tvořené dinukleotidovými repeticemi (např. $(AC)_n$). Funkce mikrosatelitů není objasněná, nekódují protein a nejsou exprimovány v RNA. Předpokládá se, že mohou hrát roli v regulaci genové exprese.

Jednotlivé alely mikrosatelitů se značí čísly, která jsou odvozena od jejich celkové délky např. psí mikrosatelit INRA21 genotyp 97/101. Alely se dědí mendelisticky, porovnáním genotypu potomka s genotypem jeho rodičů lze vyhodnotit příbuznost.

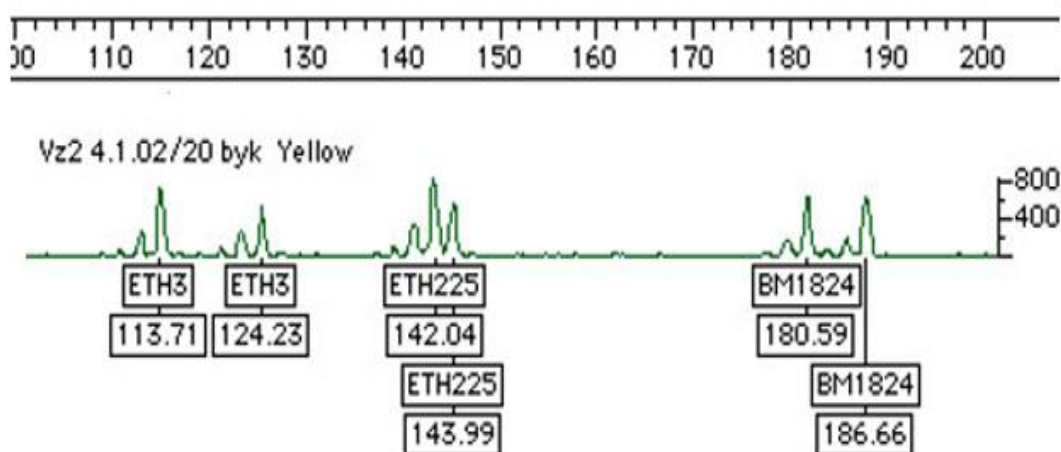
Zdrojem DNA pro analýzu původu může být v zásadě jakákoliv tkáň, nejčastěji krev, sperma, chlupové cibulky nebo stěry z ústní sliznice. Mikrosatelity jsou v genomu obklopeny unikátními sekvencemi, které umožňují umístit kolem nich primery a provést PCR (viz obr. 14) Pro stanovení původu a identity je nutno provést srovnání ve více lokusech, obvykle mezi 10-

25 mikrosatelity. PCR se proto provádí ve variantě multiplex, kdy v jedné PCR zkumavce je amplifikováno více produktů (více dvojic primerů).



Obr. 14: Schéma umístění primerů u mikrosatelitu (ATG)_n.

PCP produkty jsou fluorescenčně značené a jsou děleny v kapilární elektroforéze sekvenátoru. Fluorescenční signál PCR produktu procházejícího kapilárou je zaznamenán detektorem ve formě „vrcholů“ (peak), viz obr. 15 (detaily viz kapitola Molekulární diagnostika). Celý postup se nazývá fragmentační analýza.



Obr. 15: Příklad tří bovinních mikrosatelitů (ETH3, ETH225, BM1824)

Zdroj: publikováno se svolením Laboratoře sekvenování Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MENDELu v Brně (A. Knoll)

Výsledné kombinace genotypů mikrosatelitů jsou pro daného jedince charakteristické a nezaměnitelné, vytvářejí jeho genetický typ (DNA profil). Čím více mikrosatelitů je pro analýzu použito, tím je rozlišovací schopnost vyšší a výsledky jsou přesnější. Pro stanovení genetického typu u různých druhů zvířat je používána mezinárodní minimální standardní sada mikrosatelitů stanovená Mezinárodní společností pro živočišnou genetiku (ISAG, skot – 12, koně – 9, prasata – 15, psi – 21, kočky – 9, ovce – 19, kozy – 16 mikrosatelitů). Tyto mikrosatelity povinně testují všechny akreditované laboratoře, takže výsledky jsou mezinárodně porovnatelné. Příklad genetického typu psa je v tabulce 6.

Tab. 6: Ukázka genetického typu (DNA profilu) u psa.

Lokus	Genotyp	Lokus	Genotyp
AHT121	100/102	INRA21	101/101
AHT137	149/151	INU005	122/124
AHTh130	127/127	INU030	144/150
AHTh171	223/225	INU055	218/220
AHTh260	238/238	REN105L03	235/241
AHTk211	87/97	REN162C04	200/202
AHTk253	284/292	REN169D01	210/212
Amelogenin	XY	REN169O18	168/170
CXX279	120/124	REN247M23	268/272
FH2054	152/164	REN54P11	232/234
FH2848	238/244	REN64E19	145/153

Původ (rodičovství) je ověřován srovnáním genotypů mikrosatelitů (genetických typů) rodičů a potomků (tabulka 7). Po aplikaci mendelistické dědičnosti je patrné, že otce č. 2 můžeme z otcovství vyloučit, v mikrosatelitech FH2001 a FH2164 nesdílí s potenciálním potomkem žádnou alelu.

Tab. 7: Princip ověřování původu u psů.

Mikrosatelit	Matka	Otec1	Otec2	Potomek
AHT121	102/102	97/102	97/102	97/102
AHTH260	252/254	244/250	244/244	244/252
FH2001	144/134	150/150	152/134	144/150
FH2164	310/310	322/350	330/330	310/322
REN162C04	200/202	202/212	206/212	200/212
REN169D01	210/212	202/216	212/220	210/216

Výsledek ověření původu nebo stanovení genetického typu se vyjadřuje slovy:

původ souhlasí s uvedenými rodiči – pokud kombinace genetických typů rodičů je kompatibilní s genetickým typem potomka,

původ nesouhlasí s uvedenými rodiči – pokud kombinace genetických typů rodičů je nekompatibilní s genetickým typem potomka, a to

původ nesouhlasí s uvedenými rodiči – nesouhlasí otec,

původ nesouhlasí s uvedenými rodiči – nesouhlasí matka,

původ nesouhlasí s uvedenými rodiči – nesouhlasí oba rodiče

původ nesouhlasí s uvedenými rodiči – nelze určit, který z rodičů nesouhlasí

původ nelze ověřit – pokud není k dispozici genetický typ jednoho nebo obou rodičů, z více udaných možných otců nelze vyloučit dva a více otců.

V posledním období dochází v oblasti ověřování původu u skotu ke změnám v použitých DNA markerech. Zejména u dojného skotu se přechází na jednonukleotidové polymorfizmy SNP (sekvenční polymorfizmus) stanovené pomocí SNP čipu. Spojují se zde dvě oblasti chovu a šlechtění zvířat – SNP čipy jsou primárně využívány pro určení genomické plemenné hodnoty na základě vyhodnocení desítek tisíc SNP. Ze zmíněných tisíců testovaných SNP je vybráno 200 SNP vhodných pro stanovení genetického typu a ověření původu (tzv. paternitní platforma

– doporučena ISAG). Ověření původu funguje v tomto případě na stejném principu sdílení alel jako u mikrosatelitů. Porovnání původu v případě, že rodiče jsou testováni pomocí mikrosatelitů (STR) a potomek použitím SNP lze s pomocí přepočtu SNP na STR, obráceně, tedy ze STR na SNP nelze. Zatím není jasné, zda se tato metoda uplatní i u jiných druhů.

14. Genové manipulace

Genové manipulace jsou souhrnem metod, jejichž jednotícím hlediskem je pozměňování genetické informace. Jedná se o přímé manipulace metodami molekulární biologie. Výsledkem genových manipulací jsou organismy s pozměněnou genetickou informací, geneticky modifikované organismy (GMO). Podle zákonné definice, jsou GMO organismy, ve kterých byla provedena cílená změna genetického materiálu způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací. Nepřímo člověk manipuluje s genetickou informací také pomocí křížení a šlechtění.

Využívání těchto metod vytváří situace, se kterými se člověk dosud nesetkal, což vzbuzuje kontroverzní reakce a navozuje otázky o jejich etických limitech. Veterinární lékaři jakožto odborníci v biomedicíně bývají často žádáni o vyjádření osobního nebo odborného názoru na pokroky v těchto oblastech. K vytvoření vlastního názoru by měli rozumět jejich biologickému principu a adekvátně ho interpretovat, i když se s těmito metodami ve vlastní práci pravděpodobně nesetkají. Smyslem této kapitoly je poskytnout studentům veterinární medicíny základní poznatky z této oblasti, které jim takové porozumění novým metodám umožní.

14.1 Principy a metody genových manipulací

Genové manipulace nebo také genové inženýrství (GI) připravují umělé kombinace genů nebo vytváří pozměněné či nové geny a zavádí je do genomu organismů. Cílem je poznání funkce genu samotného, změna fenotypu a/nebo uplatnění v biotechnologických procesech. Ačkoliv většina znaků je řízena spíše polygenně, je možné změnou některých genů změnit vlastnosti organismu.

14.1.1 Základní pojmy

Jádrem GI jsou manipulace s nukleovými kyselinami – příprava rekombinantních molekul DNA, jejich klonování a další manipulace.

Rekombinantní DNA je molekula, která je tvořena DNA nejméně ze dvou zdrojů, často ze dvou různých druhů organismů např. myši + lidská. První rekombinantní DNA molekula byla připravena už v roce 1972 kombinací DNA opičího viru SV40 s lambda fágem.

Při **molekulárním klonování** (klonování genů, klonování rekombinantní DNA) jsou zaváděny geny (obecně části DNA) do nepříbuzných organismů (zejména mikroorganismů) a pomnoženy do velkých množství.

Rekombinantní protein je protein, který vzniká translací cizích vnesených genů.

Filosofie genového inženýrství vychází z univerzálnosti genetického kódu – u všech běžných organismů (s výjimkou jejich mitochondrií) má stejný smysl, překládá se do stejného proteinu. Rozdílné jsou však regulační sekvence, např. sekvence regulující iniciaci transkripce genu - promotory bakterie a člověka. Promotory si mohou být podobné, ale RNA polymeráza (enzym katalyzující syntézu RNA) z bakterie se na lidský promotor přesto nenaváže a lidský gen je proto v bakterii neaktivní. Pokud je lidský gen opatřen regulačními sekvencemi bakteriálními, může být jednoduchý gen exprimován i v bakterii. Teoreticky neexistuje druhová hranice genového inženýrství, jen hranice technické.

Manipulace s DNA umožňují dva základní nástroje genového inženýrství, enzymy a klonovací vektory. Enzymy zasahují do struktury nukleových kyselin. Při přípravě rekombinantní DNA se uplatňují zejména restriční endonukleázy a ligázy.

Restriční endonukleázy (RE) přerušují fosfodiesterové vazby sousedních nukleotidů. Při tvorbě rekombinantní DNA jsou přednostně využívány ty RE, které vytvářejí kohezní konce – na jednom vlákně je místo štěpení posunuto a tvoří se několikanukleotidové přesahy. Párování bází v těchto koncích usnadňuje spojení molekul DNA různého původu se stejnými kohezními konci vytvořenými stejnou restriční endonukleázou na principu jejich komplementarity.

Ligázy katalyzují vznik fosfodiesterové vazby v DNA. V genovém inženýrství je ligáza používána ke spojování molekul DNA.

Klonovací vektory jsou tvořeny nosnou, obvykle kružnicovou DNA molekulou, do které je vkládána studovaná DNA. Umožňují přijmout cizí DNA, přenášet ji do hostitelské buňky a replikovat ji prostřednictvím replikačního aparátu hostitelské buňky. Nejčastěji jde o molekuly DNA odvozené z plazmidů nebo virů. Plazmidy jsou přirozenou součástí bakteriálních buněk, nesou vlastní genetickou informaci. Plazmidy obsahují ve své DNA sekvence, které usnadňují vložení cizorodé DNA, její expresi, selekci buněk atd. Jedná se o **sekvenci klonovacího místa (polylinkeru)**, což je to místo na sekvenci, kde jsou restriční místa pro řadu restričních endonukleáz, kam se vkládá cizorodá DNA. Další významnou součástí vektoru jsou **geny selekčních markerů** – obvykle gen rezistence k léčivům, který zajišťuje zvýhodněný růst

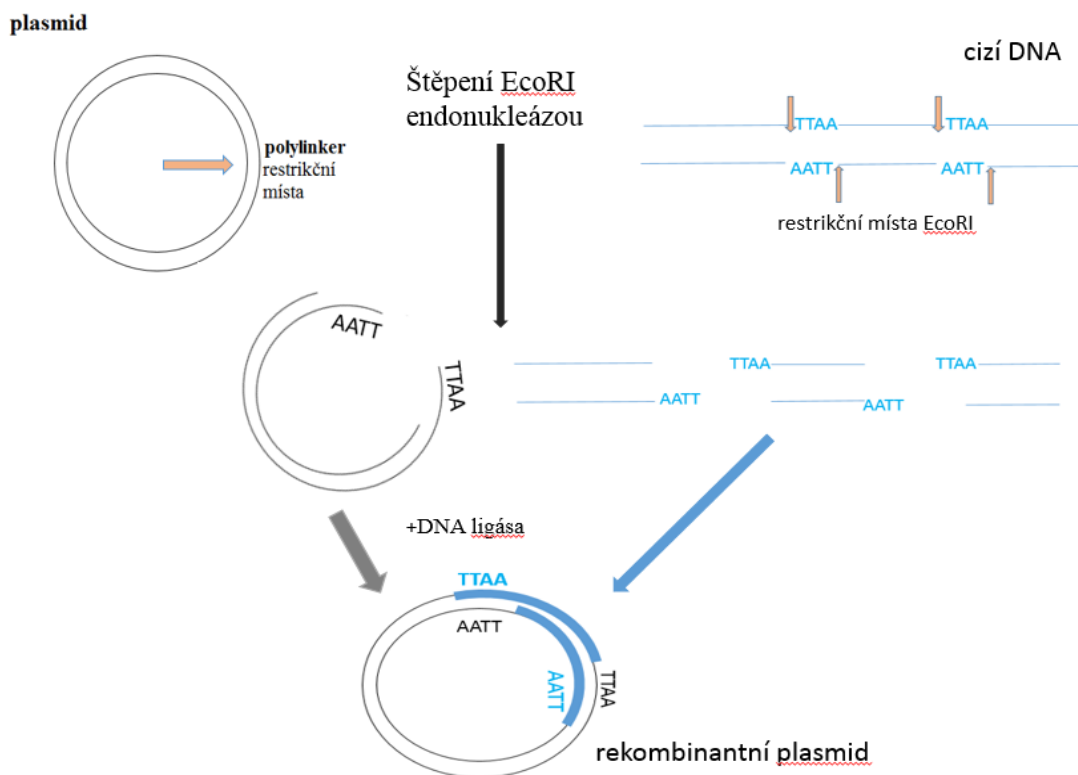
bakteriím s vektorem a rozliší tak hostitelské buňky s vloženým vektorem od buněk bez vektoru. Dále si vektor nese sekvence, které zajistí jeho vlastní replikaci – **místo počátku replikace *ORI***.

Kromě plazmidových existují další typy vektorů, které se liší zejména klonovací kapacitou – velikost vkládané DNA pro plazmidy je do 15 kbp, pro bakteriofágy kolem 20 kbp, pro kosmidy (plazmid s částí sekvence bakteriofága) do 45 kbp, pro BAC (umělé bakteriální chromozomy) do 300 kbp a YAC (umělé kvasinkové chromozomy) 0,2-2 Mbp inzerty.

14.1.2 Molekulární klonování

Klonování genů (molekulární klonování, klonování rekombinantní DNA) je základní technikou genových manipulací. Umožňuje pomnožení cizích genů (nebo vybraných částí DNA) *in vivo* v hostitelských buňkách. Získáváme tak **klony DNA** (soubory identických molekul DNA).

Prvním krokem je izolace genu, který se bude přenášet. Obvykle je nejvýhodnější izolovat mRNA genu a tuto zpětně přepsat do komplementární DNA (cDNA). Lze použít i synteticky vyrobenou sekvenci. Nejběžnějším postupem molekulárního klonování je vpravení cizího genu do bakterie pomocí vektoru plazmidu. Předpokladem spojení plazmidu s cizí DNA je vzájemná komplementarita konců molekul DNA. Té se dá dosáhnout například tak, že plazmid i vnášená DNA jsou rozštěpeny stejnou restriční endonukleázou a vytváří se kohezní konce. Rozštěpená kruhová molekula DNA vektoru se spojí s novým genem díky komplementaritě bází v kohezních koncích a přidáním dalšího enzymu DNA ligázy. Takto vzniká **rekombinantní plazmid** připravený pro vnesení do hostitelských buněk – modifikovaných bakterií (obr. 16).



Obr. 16: Molekulární klonování.

Používají se speciálně upravené buňky se zvýšenou schopností přijmout DNA – **kompetentní buňky**. Nejběžnější jsou bakteriální a kvasinkové buňky, ale občas jsou používány i jiné typy buněk (hmyzí, savčí), které ale vyžadují jiné typy vektorů. Plasmidové vektory vstupují do buněk prostřednictvím metod zajišťujících prostupnost buněčné stěny a cytoplazmatické membrány – transformací (mírný tepelný šok v přítomnosti solného roztoku) nebo elektroporací (elektrické pulsy).

V hostitelské buňce se vektor replikuje společně s novým genem (inzertem), který nese. Při dělení hostitelské buňky se dostávají kopie molekuly vektoru do dceřiných buněk, po mnohonásobném buněčném dělení vznikají kolonie (klony) identických hostitelských buněk s rekombinantním vektorem – gen ve vektoru je klonovaný.

Cílem celého procesu je buď **prosté pomnožení vloženého genu** za účelem získání čistého vzorku genu odděleného od ostatních genů v buňce. Takto získané sekvence jsou pak lépe zpřístupněny pro další studium a manipulaci.

Celý proces může také sloužit k **expresi vneseného genu** – k **syntéze rekombinantních proteinů** v hostitelských buňkách. V tomto případě musí být použity speciální vektory, které zajistí nejen replikaci ale i expresi v hostitelské buňce. **Expresní vektor** proto obsahuje kromě

klasických již zmíněných sekvencí polylinkeru, *ori* a selekčních markerů další sekvence, které je hostitelská buňka schopna rozeznat. Nejčastěji jde o tyto sekvence: silný promotor, který je rozpoznáván RNA polymerázou a řídí míru transkripce vneseného genu, sekvence vazebného místa pro ribozom, startovací kodon (začátek kódující sekvence proteinu), různé sekvence pro snadnější purifikaci rekombinantního proteinu, terminátor transkripce. Některé rekombinantní lidské proteiny užívané jako léčiva neprodukují mikroorganismy v potřebné kvalitě. Řešením by mohla být jejich produkce v mléce či vejcích transgenních zvířat a ptáků – viz kap. Geneticky modifikované živočichové.

14.2 Přenos genů u rostlin a živočichů

Cílem přenosu DNA (genů) u živočichů a rostlin (transgenoze) je obvykle exprese přenášeného genu (transgenu) nutná k dosažení žádaného fenotypu. Organismus s cizím vneseným genem se obvykle označuje jako transgenní. Pro poznání funkce genu se využívá i vyblokování genu (knokaut) nebo jeho pozměnění.

14.2.1 Charakteristika transgenu

Transgen je umělý genový konstrukt připravený metodami rekombinantní technologie. Skládá se z vlastní kódující sekvence genu, která je opatřena sekvencemi regulačními. Kódující oblast je sekvence, která určuje, jaký protein bude produkován. Regulační oblasti jsou nutné pro expresi vnášeného genu v cílových buňkách např. promotory, polyadenylační signály.

Promotory jsou regulační sekvence před začátkem kódující oblasti na 5' konci, kde dochází k iniciaci transkripce. Promotory tedy určují, ve kterých buňkách a kdy bude transgen aktivní. Užívají se silné promotory, které zajistí vysoký stupeň transkripce genu. Podle typu kontroly genové exprese mohou být rozděleny do několika skupin:

- *konstitutivní* promotory jsou regulační sekvence genů aktivních ve většině tkání – provozní geny (house-keeping geny).
- *tkáňově (vývojově) specifické* promotory zajišťují expresi v konkrétní tkáni nebo vývojovém stadiu – jsou užívány zejména pro cílenou expresi do mléka a vajec.

- *indukovatelné* promotory jsou aktivovány vnějším stimulem, který může být uměle regulován – změnou teploty, přítomností specifické látky apod.

Transgen se přenáší buď do jednotlivé buňky (modifikace somatických buněk před klonováním, transgenoze u spermii) nebo do raného embrya či těla již vyvinutého organismu. Přenos do těla již vyvinutého dospělého organismu, kdy se cizí gen dostává pouze do některých buněk a tkání je podstatou genové terapie.

Genová terapie umožňuje takovou modifikaci buněk, která nahradí nefunkční nebo chybějící gen (klasická genová terapie), utlumí/zesílí účinky jiného genu nebo navozuje imunitu u nádorových nebo infekčních onemocnění. Genová terapie dědičných onemocnění u zvířat (zejména psi) slouží jako model pro léčbu člověka. Genová terapie byla u zvířat experimentálně využita ve veterinární onkogenetice např. pro přenos genu *IL12* (antitumor. účinky) do různých typů tumorů u koček, psů, koní. U koní se experimentuje s přenosem genů pro růstové faktory stimulujících hojení do místa poranění a s genovou terapií artritidy koní.

14.2.2 Techniky přenosu genového konstruktů

Způsobů přenosů genového konstruktů je celá řada, lze je rozdělit do dvou skupin – metody přenosu bez zacílení a metody přenosu s přesným zacílením do genomu. U metod bez zacílení dochází k náhodné integraci transgenu do hostitelského genomu a nelze předpovědět, zda nedojde k integrační destrukci důležitých genů nebo k aktivaci onkogenů. Také nelze zajistit expresi genového konstruktů ani jeho stabilitu a přenos na potomstvo. Jedná se o metody starší, stále používané nebo kombinované s metodami skupiny druhé. Obecně lze říci, že volbu metody ovlivňuje její dostupnost, druh modifikovaného organismu a zejména účel genetické modifikace.

14.2.2.1 Metody náhodné integrace

Lipofekce využívá jako nosiče genového konstruktů liposomy – analogy fosfolipidů buněčných membrán. Liposomy splývají s cytoplazmatickou membránou a pronikají tak do buňky. Používáno např. při genové terapii osteoartritidy nebo onkologických onemocnění.

Elektroporace je metoda vnášení DNA do buněk pomocí elektrických pulsů, které otevírají póry v membráně buněk. Použita např. při genové terapii různých typů tumorů u psů.

Bombardování mikroprojektily (genové dělo) se používá pro transgenozu u jednoděložných rostlin – genový konstrukt je na kovové částici vystřelen do rostlinného pletiva (obiloviny).

Agrobacterium tumefaciens je půdní bakterie, která přenáší část své DNA do dvouděložných rostlin. Bakterie má plazmid Ti (**tumor inducing**), jehož část T-DNA (15-30kb) se integruje do chromozomu rostliny. Tento plazmid je využíván jako vektor k přenosu transgenů u rostlin. T-DNA plazmidu je nahrazena transgenem. Transformace se provádí na kulturách rostlinných buněk nebo na protoplastech, protože u dospělé rostliny zůstává klonovaný gen pouze v místě infekce.

Provádí se také **přímé vstříknutí DNA** do tkáně - např. DNA vakcíny (vakcíny 3. generace) – DNA je tvořena genem antigenu patogenu. V těle je poté přepsána do mRNA a do proteinu, což následně vede ke tvorbě protilátek.

Velmi častou metodou je využití **mikroinjekce**. Principem je vpíchnutí roztoku s genovým konstruktem mikromanipulátorem do oplozeného vajíčka před splynutím prvojadér. Embryo je přeneseno náhradní matce, může se narodit transgenní potomek. Účinnost je udávána do 5 %. Nevýhodou je potřeba superovulace pro získání vajíček a náročnost ovládnutí mikromanipulační techniky. Široké využití hlavně u myši a ryb.

Vektory odvozené od virů se používají zejména v transgenozu eukaryot. Viry mají v tomto případě část vlastních genů nahrazenou transgenem a jsou upraveny tak, aby neohrožovaly příjemce patogenitou, ale zachovaly si schopnost průniku a pomnožení v buňce. Nejvíce používány jsou retroviry, adenoviry. Místo integrace do genomu je náhodné. Existují však bezpečnostní rizika – retroviry mohou aktivovat sousedící geny, včetně onkogenů – karcinogeneze.

14.2.2.2 Metody umožňující přesné zacílení genetické manipulace

Genový knockaut je vyblokování konkrétního genu. Vyřazení genu z funkce a pozorování rozdílů ve fenotypu umožňuje odvodit pravděpodobnou funkci genu. V tomto případě je známo přesné místo genové modifikace. Používá se při studiu funkce genů na myším modelu.

Metoda je založena na využití embryonálních kmenových buněk (ESC), což jsou buňky raného embrya, nediferencované, pluripotentní, schopné diferenciaci do jakékoliv tkáně. Na těchto buňkách je proveden genový knockaut homologní rekombinací, buňky jsou vpraveny do recipientního embrya a toto embryo je přeneseno pseudopregnantní samici. Narození potomci

jsou chimérami, mají buňky embrya s vyblokováním genem a buňky embrya, které ho přijalo. Předpokládáme, že v dalších generacích získáme potomstvo plně odvozené z knokaut buněk. Ačkoliv je účinnost metody nízká (desetiny procenta), existují dnes už tisíce knokaut kmenů myši pro různé geny. Knokaut myši se uplatňují téměř ve všech oblastech fyziologie savců – při studiu role genů, vývoje organismu, jako modely chorob apod.

Vyblokování genu je možno docílit i tzv. genovým **knockdownem**. Využívá se nekódujících a protismyslných ribonukleových kyselin k hybridizaci se specifickými transkripty, které jsou tímto způsobem označeny k likvidaci a tak se dále nepřekládají do proteinu. Dochází k potranskripční inaktivaci genů (gene silencing). V tomto případě tedy není ovlivněna primární struktura DNA genu jako je tomu u genového knokautu, ale potlačuje se translace konkrétního genu. Tato metoda nachází aplikace i v oblasti virových infekcí – cílení na životně důležitý gen původce choroby vede k zablokování životního cyklu.

Jedna z nejnovějších metod genových modifikací (r. 2012) nese označení **CRISPR-Cas9**. Využívá bakteriální systém obrany proti bakteriofágům. Zjednodušený princip CRISPR-Cas9 spočívá v tom, že bakterie část DNA bakteriofága, kterým byla infikována, začlení do svého genomu v místě nazvaném CRISPR. Jakmile dojde k opakované infekci, bakterie podle informace v CRISPRu vytvoří RNA, která vyhledá nukleovou kyselinu fága a za pomoci enzymu nukleázy Cas9 ji rozštěpí. Při zkoumání tohoto bakteriálního systému se ukázalo, že je možno ho „programovat“. Umožňuje jak vyblokovat gen, tak ho pozměnit či vnést gen nový neboli přesně **editovat genom**. Používání CRISPR-Cas9 se v genových manipulacích rychle rozšiřuje, protože metodu lze využít s **vysokou** účinností **univerzálně** pro cílené zásahy do genomu u všech organismů.

14.3 Přehled některých produktů rekombinantních technologií

Nejdéle trávající a nejširší praktické uplatnění mají produkty geneticky modifikovaných mikroorganismů. Rekombinantní proteiny se využívají zejména v lékařství, farmacii a souvisejících oborech (hormony, cytokiny, vakcíny, antigenní proteiny pro diagnostické sady, enzymy pro molekulární biologii, celkově stovky různých druhů proteinů), potravinářství (rennin, proteázy, amylázy, laktázy apod.) a dalších průmyslových odvětvích (papírenský, kosmetický, textilní aj. – např. lipáza, proteáza, lakáza). U mikroorganismů se také řada modifikací týká konstrukce či úpravy metabolických drah za účelem vyšší produkce

požadovaných metabolitů (etanol, rozpouštědla, aditiva, barviva, antibiotika) nebo zvýšení schopnosti degradace škodlivých látek (remediace – degradace olejových skvrn, těžkých kovů, herbicidů).

14.3.1 Transgenní rostliny

Jako první bylo v USA uděleno povolení k pěstování rajčete se zpóźděným dozráváním už v r. 1994 pro potravinářské účely. V současné době je rozlišováno už pět generací transgenních rostlin podle způsobu jejich použití.

- *první a druhá generace* jsou rostliny, které jsou upraveny z hlediska způsobu jejich pěstování. Mají vneseny geny zajišťující jejich odolnost vůči škůdcům, herbicidům nebo abiotickým stresům (chlad, sucho, zasolení půdy, delší skladovatelnost).
- *třetí generaci* jsou rostliny s vyšší nutriční hodnotou – vnesené geny např. upravují obsah vitamínů nebo mění složení mastných kyselin (zlatá rýže).
- *ve čtvrté generaci* vznikly geneticky modifikované tzv. ekologicky výhodné rostliny (fytoremediace).
- *pátou generaci* tvoří rostliny produkující suroviny pro průmysl (bionafta, škrob, biodegradovatelné materiály) a zdravotnictví (léčiva, vakcíny, protilátky).

U dřevin jsou experimenty zaměřeny na pozměňování struktury dřeva, urychlení růstu, odolnost vůči onemocněním či na změnu reprodukčního cyklu.

Zatím se můžeme setkat zejména s rostlinami první až třetí generace.

14.3.2 Transgenní živočichové

První geneticky modifikovaná domácí zvířata byla připravena už v roce 1974 (transgenní myš). Do současné doby byly provedeny modifikace a přenosy stovek různých genů. Genetické modifikace u živočichů se provádějí zejména v následujících oblastech:

Modely v základním výzkumu

Drtivá většina genetických modifikací živočichů probíhá v základním výzkumu a to jak u obratlovců tak u bezobratlých např. u hlístice *Caenorhabditis elegans*, octomilky *Drosophila*

melanogaster, kaprovité rybky *Dania pruhoanáho* a zejména u laboratorních myší, potkanů ale i u prasat. Genové manipulace u těchto organismů umožňují zkoumat funkce genů a jejich regulačních oblastí, vytvářet modely chorob a vyhledávat cíle a způsoby léčby. Transgenní živočichové hypersenzitivní k mutagenům nebo karcinogenům jsou využíváni k testování toxicity látek vnějšího prostředí, farmak aj.

Bioreaktory – produkce transgenních proteinů v mléce, moči, krvi a jiných tkáních (animal pharming)

Ke genetické modifikaci se v tomto případě používá transgen složený z kódující sekvence žádaného proteinu, která je opatřena regulačními sekvencemi genů exprimovaných v mléčné žláze, vejcovodu či ledvinách. Metoda je využívána zejména pro produkci lidských proteinů vyžadujících specifické potranslační modifikace a u těch, kde je jejich spotřeba velmi vysoká (např. srážlivé faktory, sérový albumin). Několik transgenních zvířat produkujících rekombinantní protein by stačilo pokrýt potřebu všech nemocných. Dnes je již několik povolených komerčně dostupných rekombinantních léčiv získávaných z mléka transgenních zvířat.

Zvýšení produkčních znaků, rezistence vůči chorobám

V oblasti zvyšování produkčních znaků pomocí genových manipulací se řada pokusů týkala zvyšování růstových schopností (přenos různých genů somatotropní osy). Výsledkem je transgenní losos, který je povolen k chovu a prodeji v Kanadě a USA. U některých plemen skotu se vyskytuje přirozená mutace genu myostatinu, která vede k nadměrnému růstu svalů (dvojitě osvalení). Ukázalo se, že gen myostatinu lze uměle zablokovat genovým knockautem i u dalších obratlovců (myši, ryby). Transgenozé se týká také změny trávících schopností, která by umožnila rozšířit paletu krmiv, popř. snížit ekologickou zátěž prostředí – schopnost redukovat toxicitu některých rostlin u přežvýkavců, schopnost trávit celulózu – u drůbeže a nepřežvykujících savců, prasata lépe vstřebávající fosfor. Genetickými modifikacemi se mění i složení a kvalita potravin živočišného původu. Značná pozornost je věnována modifikacím mléka skotu – přenosy genů použity např. pro zvyšování obsahu kaseinu, změny obsahu tuku, snižování obsahu laktózy nebo při pokusu o tvorbu humanizovaného mléka (přenos genů lidských mléčných proteinů) jako potenciální náhražky mléka mateřského. U masa je úsilí

zaměřeno na změnu podílu mastných kyselin. U drůbeže je v centru pozornosti změna zastoupení jednotlivých bílkovin ve vejcích.

Řada experimentů se věnuje zvyšování rezistence vůči různým typům onemocnění. Genetickou modifikací byly získány např. krávy a kozy s vyšší rezistencí vůči mastitidám (gen lysostafinu a lysozymu exprimovaný v mléčné žláze), zvířata rezistentní vůči prionovým chorobám (knokaut prionového genu), linie kura odolné k virové leukóze nebo ryby odolnější k bakteriálním onemocněním (gen lysozymu).

Genetické modifikace probíhají také u hmyzu – pracuje se na geneticky modifikovaných komárech rezistentních vůči původcům malárie či transgenním bourci morušovém, který produkuje pavoučí vlákno.

14.4 Hodnocení rizik, legislativa, GMO v EU a ČR

V současné době jsou genové manipulace a geneticky modifikované organismy předmětem mnoha diskusí. Tyto zahrnují celou škálu názorů od zásadní kritiky až po nadšený obdiv. EU se k této oblasti staví zdrženlivě, v jiných částech světa (Amerika, část Asie) je přístup ke GMO vstřícný.

Nakládání s GMO je v České republice vymezeno zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s GMO a genetickými produkty (vychází z evropské směrnice 2001/18/EC o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do oběhu). Genetická modifikace je definována jako cílená změna způsobená vnesením nebo vynětím části DNA takovým způsobem, jehož nedosáhneme přirozenou rekombinací. Geneticky modifikovaný organismus je organismus, jehož genetický materiál byl změněn genetickou modifikací. Kromě těchto obecných ustanovení zákon vymezuje pravidla uvádění GMO do životního prostředí a na trh i další pravidla a povinnosti týkající se nakládání s GMO. Zákon vychází z principu předběžné opatrnosti (Cartagenský protokol o biologické bezpečnosti k Úmluvě o biologické rozmanitosti, 2000 Montreal). Tento princip znamená, že vždy, když existuje riziko možného nebezpečí, je třeba jednat tak, jako by toto nebezpečí bylo reálné. A to i v případě, že riziko není zcela ověřené.

14.4.1 Typy nakládání s GMO

Zákon stanovuje 3 typy nakládání s GMO.

Uzavřené nakládání – při tomto způsobu nakládání s GMO je zabráněno úniku GMO mimo prostor, kde se s modifikovanými organismy nakládá (laboratoře, skleníky). V ČR více než 100 pracovišť nakládá s GMO v tomto režimu.

Uvádění GMO do životního prostředí – znamená pěstování v polních pokusech nebo chov v experimentálních chovech. Musí být vytvořeny takové podmínky, aby nemohlo docházet ke kontaminaci okolního prostředí.

Uvádění GMO a produktů do oběhu – znamená jejich dovoz, zpracování, prodej, chov, nebo pěstování. V ČR se mohou pěstovat geneticky modifikované plodiny, které prošly schvalovacím procesem v EU a byly zapsány do evropského katalogu odrůd. K pěstování je v EU povolena kukuřice odolná vůči zavíječi kukuřičnému (k 1. 11. 2018). V roce 2018 se v ČR geneticky modifikované plodiny pro uvádění na trh nepěstovaly. K uvedení na trh jsou v EU povoleny geneticky modifikovaný bavlník, kukuřice, řepka, sója, cukrová řepa a karafiáty. Většina geneticky modifikovaných produktů jsou součástí krmných směsí pro zvířata (85 % krmných směsí). Přehled schválených GM potravin a krmiv lze nalézt v Registru EU geneticky modifikovaných potravin a krmiv (http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm).

14.4.2 Legislativa a hodnocení rizik GMO

O uvedení GMO na trh se rozhoduje na úrovni Evropské unie, zbylé dva způsoby nakládání řeší příslušné státy. V ČR vede evidenci nakládání s GMO Ministerstvo životního prostředí https://www.mzp.cz/cz/registr_povolenych_geneticky_modifikovanych_organismu https://www.mzp.cz/cz/registr_uzivatelu_geneticky_modifikovanych_organismu).

Všechny GMO musí projít schvalovacím procesem. Hodnocení rizik a schvalování GMO provádí Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) ve spolupráci s členskými státy EU podle přesně daných metodik. Stanovení rizika nakládání s GMO zahrnuje srovnávací analýzu s konvenčními plodinami, posouzení možných přímých i nepřímých škodlivých účinků na zdraví člověka a zvířat (toxikologie, alergenita, nutriční hodnota), vliv na životní prostředí a biologickou rozmanitost. Při hodnocení rizik GMO platí zásada, že jsou posuzovány individuálně případ od případu v celkovém kontextu jejich využití. Většina dosud provedených studií nepotvrdila, že by GM potraviny představovaly hrozbu pro člověka nebo živočichy.

Existuje několik studií, kde byl negativní vliv GMO diety na myši nebo krysy prokázán, tyto jsou ale degradovány špatnou metodikou pokusu. Nejasný je zatím také dlouhodobý vliv GMO na ekosystémy.

Evropská legislativa nařizuje označování potravin, které obsahují GMO. Hlavním kontrolním orgánem ČR pro nakládání s GMO je Česká inspekce životního prostředí (ČIŽP). Úřední kontrolu GM potravin na trhu v ČR provádí Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI).

15. Genetika laboratorních zvířat

Experimenty na zvířatech jsou dnes nedílnou součástí vědy. Zvířata jsou používána jednak jako modelové systémy pro některá lidská onemocnění, ale také např. při testování genotoxicity (kapitola Mutace, mutageny a jejich význam) a bezpečnosti nových terapeutických postupů a léčiv. Mimo tyto příklady z oblasti medicíny jsou zvířata také využívána v základním výzkumu (např. pro popis funkce a exprese genů) nebo ve vyšším vzdělávání a ochraně životního prostředí.

15.1 Definice laboratorního zvířete, historie

V rámci experimentování na zvířatech rozlišujeme tato zvířata na dvě skupiny. **Pokusná zvířata** jsou jakákoliv zvířata (obratlovci), na kterých jsou prováděny experimenty. Nejsou zde stanoveny žádné specifické požadavky na vlastnosti takového zvířete. Tedy nerozhoduje věk, pohlaví, zdravotní stav ani individuální historie a vlivy prostředí. Pokusným zvířetem se tedy může stát jakékoliv zvíře (vyjma fetálních a embryonálních forem). Naproti tomu **laboratorní zvíře** je přesně definováno jak po stránce fyziologické, tak genetické a je po všechny generace chováno v přesně kontrolovaných podmínkách laboratorních chovů. Tyto podmínky zajišťují co nejvyšší uniformitu laboratorních zvířat patřících do jedné linie a jsou vyžadovány pro zajištění vysoké vypovídací hodnoty prováděných experimentů. Pokud bude prováděn experiment na pokusných zvířatech, nelze s určitostí říci, jestli pozorované odchylky v reakci na dané experimentální schéma jsou dány odlišnostmi v provedení experimentu (např. rozdílná dávka testované látky), nebo individuální variabilitou vybraných pokusných zvířat (individuální genetická variabilita, působení rozdílných faktorů prostředí a výše jmenované), případně součinností obou faktorů. Laboratorní zvířata limitují tuto variabilitu na minimum, takže pozorované výsledky jsou z velké míry důsledkem experimentálního designu a ne okolních faktorů. To má za následek také to, že pro dosažení statisticky významných výsledků je zpravidla potřeba použití nižšího počtu laboratorních zvířat než v případě použití pokusných zvířat.

Historie pokusných zvířat sahá minimálně do starověku, kde byla používána zvířata pro testování např. účinku přírodních jedů. V antice byla zkoumána anatomická stavba zvířecích

těl a byly prováděny první fyziologické pokusy (např. Hippokrates a Galen). Období středověku nebylo obecně nakloněno vědeckému poznání a ani pokusy na zvířatech nebyly výjimkou. K obnovení zájmu došlo až v období renesance, kdy byly prováděny pokusy v oblasti komparativní anatomie (Vesalius). Stále častějším nástrojem poznání v této oblasti byly až do 18. století **vivisekce** (chirurgické experimenty bez anestezie). V 19. století se spolu s rozvojem vědeckého poznání přesouvá pozornost k mikrobiologickým a imunologickým pokusům (např. Koch, Pasteur). Obzvláště imunologické pokusy s cílem produkce vakcín měly za následek strmý nárůst počtu pokusných zvířat. Vrcholem použití pokusných zvířat pro produkci vakcín byla polovina 20. století, kdy byly použity miliony primátů pro výrobu vakcíny proti obrně. Ve 20. století došlo k rozšíření použití pokusných zvířat do dalších oblastí, jako např. testování léčiv, potravinových doplňků a kosmetiky nebo psychologické pokusy obzvláště na primátech. Naproti tomu došlo k utlumení používání zvířat v produkci vakcín z důvodu objevení alternativních metod.

15.2 Genetika laboratorních zvířat – linie, kmeny laboratorních zvířat

Z pohledu genetiky rozlišujeme **outbrední** laboratorní zvířata a **inbrední** laboratorní zvířata. V obou případech platí, že zvířata jsou chována v kontrolovaných podmínkách, ale je zásadní rozdíl v přístupu k jejich plemenitbě.

15.2.1 Outbrední laboratorní zvířata

Outbrední laboratorní zvířata jsou pářena systémem nepříbuzenské plemenitby. Rozlišujeme několik základních forem tohoto stylu plemenitby:

- Out-crossing
- Jednoduchý outbreeding
- Rotační outbreeding

Out-crossing, někdy také označován jako osvěžení krve, je metoda plemenitby založená na periodickém přísunu jedinců stejného plemene (kmene) z nepřibuzného chovu do chovu, kde má k osvěžení krve dojít. Obvykle to funguje tak, že jsou do chovu každou x-tou generaci přibráni samci z nepřibuzného chovu. Samci se vybírají z důvodu vyššího počtu potomků.

K této formě plemenitby dochází např. u chovů, kde došlo ke snížení celkové fitness přítomných jedinců. K takovému poklesu může dojít chybou v provádění plemenitby, graduálním poklesem heterozygotnosti v průběhu mnoha generací, nebo genetickým driftem v malých chovech. Nevýhodou tohoto přístupu je nebezpečí zavlečení a rozšíření dědičných chorob (efekt zakladatele).

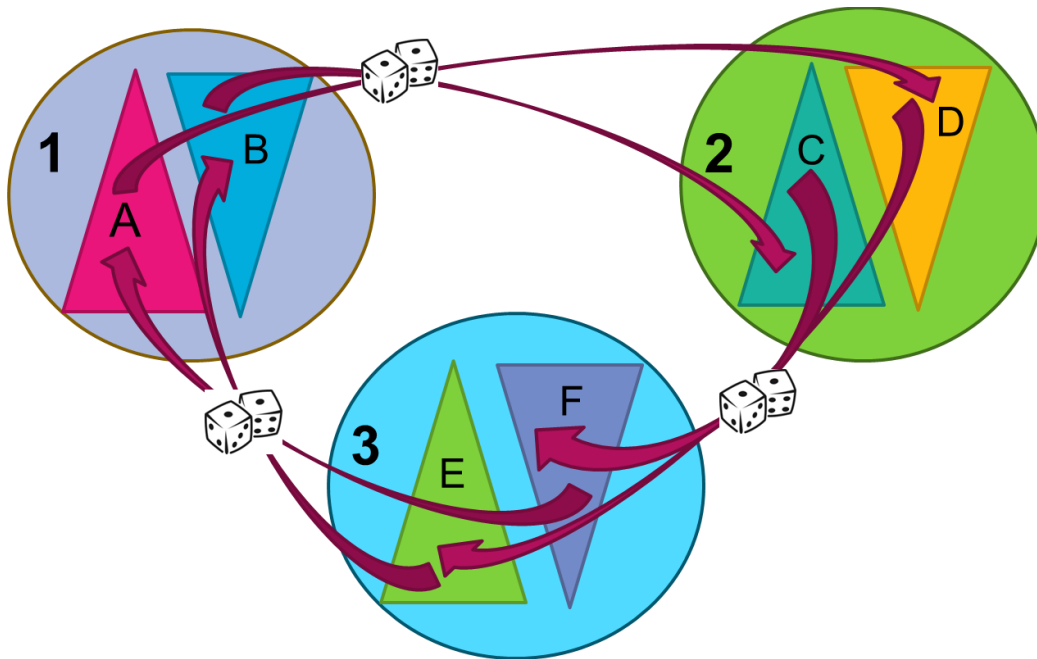
Jednoduchý outbreeding je označení pro náhodnou plemenitbu. Náhodná plemenitba se provádí tak, že do reprodukce je vždy zařazován pouze jeden samec a jedna samice z dané rodiny tak, aby se předešlo příbuzenskému křížení. Tato metoda chovu je vhodná pro velké produkční chovy, kde v důsledku vysokého počtu jedinců v každé generaci klesá riziko snížení heterozygotnosti a genetického driftu.

Rotační outbreeding má několik stupňů v závislosti na komplexnosti zvoleného schématu. Chov je při využití této metody dále dělen na podjednotky. V případě jednorodinových systémů je chov rozdělen na jednotlivé rodiny a samci jsou přenášeni v pevně daném schématu do okolních rodin. Pro představu, pokud máme chov rozdělen na tři rodiny A, B a C, pak samec z rodiny A bude pářen se samicí z rodiny B, samec z rodiny B se samicí z rodiny C a samec z rodiny C se samicí z rodiny A. V případě skutečných chovů je samozřejmě počet rodin podstatně vyšší.

Další možností je připouštění dvourodinových skupin. Každá skupina v takovém chovu je složena ze dvou rodin, kdy z každé rodiny dané skupiny je vybrán jeden samec, který je přenesen do jiné skupiny, kde je náhodně přiřazen k samici z jedné ze dvou přítomných rodin, druhý samec z téže skupiny je pak přiřazen k samici z druhé rodiny. Pro představu, pokud máme skupiny označené 1, 2, 3, atd. Ve skupině 1 máme rodiny A a B a ve skupině 2 máme rodiny C a D, pak samec z rodiny A je náhodně přiřazen k samici z rodiny D a samec z rodiny B je přiřazen k samici z rodiny C. K rotaci zde dochází v rámci skupin, takže samci ze skupiny 1 jsou předáni do skupiny 2, ze skupiny 2 do skupiny 3, atd. Přiřazování samců k samicím je náhodné, takže v předešlém případě je stejně pravděpodobné, že dojde k přiřazení samce A k samici D nebo samici C. Pro lepší představu si prohlédněte obrázek 17.

Posledním zde probíraným systémem chovu outbreedních laboratorních zvířat je rotační připouštění chovných skupin. Na rozdíl od předešlých příkladů rotačních systémů využívá tato metoda přenos jak samců, tak samic. Obvykle se přenášejí samci a samice opačným směrem. Pokud jsou skupiny rozděleny na jednotlivé rodiny lze uplatnit náhodnou distribuci přenášených jedinců jako v případě dvourodinových systémů. Stejně jako v předešlých systémech je vhodné v každé generaci přenášet pouze jednoho samce a jednu samici. Tato

metoda je efektivní v udržování heterozygotnosti chovu, ale je také nejnáročnější na správné provedení, protože vyžaduje precizní záznamy a plánování.



Obr. 17: Schématické zobrazení rotačního outbreedingu dvourodinových skupin. Skupiny označeny číslicemi, rodiny označeny písmeny.

Outbrední laboratorní zvířata se využívají tehdy, když jejich genetická variabilita není omezujícím faktorem v určitém typu experimentu nebo když je naopak žádoucí. Je třeba zdůraznit, že i když jsou tato zvířata geneticky variabilní, výše popsané postupy zajišťují určitou standardizaci jednotlivých kmenů. To znamená, že jedinci jednoho outbredního kmene jsou si navzájem podobnější než jedinci jiného outbredního kmene a informace o použitém kmenu jsou významné pro popis prováděných experimentů.

15.2.2 Inbrední laboratorní zvířata

Inbrední laboratorní zvířata jsou chována systémem příbuzenské plemenitby. V chovu postupně klesá heterozygotnost, což je vyjádřeno vzrůstajícím koeficientem inbreedingu označovaného jako **F**. V tomto místě je potřeba zdůraznit, že koeficient inbreedingu vyjadřuje zastoupení

genů, které jsou homozygotní v důsledku příbuzenského křížení, ale nevypovídá nic o jiných důvodech homozygotnosti. **Pokud tedy máme zvíře s $F = 0,5$, tak takové zvíře má polovinu všech genů homozygotních v důsledku příbuzenského křížení, ale celkový poměr homozygotních genů bude zcela jistě vyšší.**

Skupina jedinců jednoho druhu, kteří sdílejí téměř identický genotyp v důsledku příbuzenské plemenitby je označována jako **linie** nebo **kmen**. V případě inbredních chovů rozlišujeme tři úrovně příbuzenské plemenitby. Úzká příbuzenská plemenitba označuje páření sourozenců, nebo rodičů a potomků. Střední příbuzenská plemenitba pak zahrnuje páření vzdálenějších příbuzných jako sestřence a bratrance, synovci a tety atd. Vzdálený příbuzenský inbreeding zahrnuje všechny ještě vzdálenější možnosti. Úzká plemenitba se používá k tvorbě nových inbredních linií, kdy k nárůstu F na 99 % stačí 20 generací páření bratr \times sestra. Střední příbuzenská plemenitba se používá buď v produkčních jednotkách inbredních chovů, nebo k ozdravení vysoce zimbredizovaných linií. Vzdálená příbuzenská plemenitba se pak rovněž používá pro ozdravení chovů, navíc k ní může docházet neúmyslně v outbredních chovech.

Standardní inbrední chov se obvykle člení na několik jednotek, nebo úrovní. Nejdůležitější jednotkou je chovné jádro. V chovném jádru se udržuje charakteristika daného kmene. Zvířata jsou individuálně číslována a vedou se detailní záznamy. Jedinci v chovném jádru jsou sledováni a testováni tak, aby byla zajištěna kontinuita specifických vlastností daného inbredního kmene. Jedinci jsou zde kříženi na základě principu úzké příbuzenské plemenitby, nejčastěji bratr \times sestra. Nižším stupněm v rámci chovu jsou meziprodukční jednotky. Do meziprodukčních jednotek se dostávají zvířata z chovného jádra, která nebyla vybrána pro udržování tohoto jádra. I zde dochází k úzké příbuzenské plemenitbě. Meziprodukční jednotky slouží zejména k pomnožení chovných zvířat, aby byla zajištěna požadovaná úroveň produkce zvířat daného kmene. Do počtu chovaných jedinců jsou nejpočetnější produkční jednotky. V produkčních jednotkách dochází k maximálnímu pomnožení inbredních zvířat bez ohledu na příbuzenské vztahy. Zvířata v produkčních jednotkách jsou potomky rodičů buď z chovného jádra, nebo meziprodukčních jednotek. Zvíře z produkční jednotky se nemůže stát chovným zvířetem, tedy není možné ho přesunout do chovného jádra, nebo meziprodukční jednotky. Některé chovy mají navíc ještě selekční jednotku. Selekční jednotka obvykle slouží k zakládání nových chovných jader výběrem jedinců se zajímavými odchylkami od původního inbredního kmene. V raných fázích vývoje inbredního chovu slouží selekční jednotka také ke zkvalitnění stávajícího chovu.

I když existuje řada druhů, které se dají využít jako laboratorní zvířata, následující popis jejich genetických vlastností platí v plné míře zejména pro laboratorní hlodavce, hlavně myši a

potkany. U jiných savčích, případně ptačích druhů jsou principy stejné, ale nabídka srovnatelných kmenů je obecně omezenější.

15.2.2.1 Inbrední deprese

Vytváření nových inbredních chovů velmi často naráží na jev tzv. **inbrední deprese**. Pod pojmem inbrední deprese se rozumí obecně snížení vitality a odolnosti zvířat v důsledku příbuzenské plemenitby. Většina projevů inbrední deprese je zapříčiněna faktem, že negativní znaky mají v genomu obvykle recesivní charakter. Pokud tedy křížíme příbuzné jedince, kteří jsou heterozygotní v takovém znaku, významně stoupá šance, že dojde ke spojení dvou recesivních alel a tedy k negativnímu projevu, který podmiňují. Inbrední deprese se obvykle projevuje nejsilněji v počátečních generacích, kdy je nárůst homozygotnosti nejrychlejší. Po dosažení 15. - 20. generace už inbrední deprese obvykle významně nestoupá, neboť většina genů je již v homozygotním stavu a k potenciálnímu negativnímu projevu tedy došlo už dříve. Typickými projevy inbrední deprese je snížená plodnost, zvýšený výskyt malformací plodu, kompromitovaný imunitní systém a růstová retardace často spojená s metabolickými defekty.

15.3 Využití kmenů laboratorních zvířat

Praktické využití kmenů laboratorních zvířat ve výzkumu se primárně odvíjí od charakteristiky daného kmene. Kmeny jsou často vytvářeny za konkrétním účelem a to až do takové hloubky, že mohou umožňovat studium konkrétních genů. Pokud je nově vytvářený kmen určen právě pro studium jednotlivých genů a jejich variant, je nutné zajistit, aby požadované varianty studovaných genů nebyly v průběhu generací ztraceny. Jako ukazatele (markery) přítomnosti vybraných sekvencí lze použít přímo dané varianty (SNP nebo inzerce/delece), za předpokladu, že tyto varianty jsou známy. Pokud známy nejsou, nezbývá než se spoléhat na nepřímé markery, nejčastěji mikrosatelity.

Z hlediska genetiky se inbrední kmeny laboratorních zvířat dělí do celé řady skupin:

Syngenní kmeny – kmeny vzniklé opakovaným úzkým příbuzenským křížením (nejčastěji bratr × sestra) po dobu alespoň 20 generací. V prvních fázích tohoto procesu dochází v původně heterogenní/heterozygotní populaci k vyštěpení homozygotních genotypů, které současně vytvářejí další možné kombinace s homozygotními genotypy v jiných genech genomu. Tím

vznikají jednotlivé kmeny charakteristické konkrétní kombinací homozygotních genotypů v jednotlivých genech. Některé kombinace nikdy nevzniknou ať už v důsledku náhodnosti nebo proto, že jsou letální, jiné vykazují charakteristická postižení nebo charakteristické normální rysy. Tyto kmeny mohou sloužit jako základ pro tvorbu některých dalších druhů inbredních kmenů. Syngenní kmeny jsou považovány za téměř homozygotní (>99 %) a geneticky identické (isogenní). V současné době existuje asi 20 tisíc různých kmenů myši a odhaduje se, že potenciál je ještě o řád víc. Existující syngenní kmeny tedy představují mnoho možných genotypů daného druhu v homozygotním stavu, nesených mnoha geneticky totožnými jedinci. Z tohoto důvodu jsou syngenní kmeny umožňující volbu genotypů vhodných právě pro daný experiment mimořádným nástrojem genetického výzkumu. Vzhledem k tomu, že v průběhu inbredizace jsou velmi často fixovány alely s negativním vlivem na svého nositele, lze syngenní kmeny obvykle využívat jako modelové organismy pro takto podmíněná onemocnění bez nutnosti dalších zásahů. Jako příklad lze uvést krysí kmen ACI, který je náchylný k výskytu vrozených defektů, onemocnění ledvin a nádorů.

Koisogenní kmeny – jedinci takového kmene se od sebe odlišují pouze v jednom lokusu. Tyto kmeny jsou odvozeny od kmenů syngenních. Vznik koisogenních kmenů je způsoben výskytem mutace. Tato mutace může být buď spontánní, nebo indukovaná vnějším mutagenem. Pokud se u jedince syngenního kmene projeví potenciálně zajímavá mutace, může být tento jedinec dále křížen s jedinci původního kmene a dát tak vzniknout novému koisogennímu kmenu. Koisogenní kmeny vytvářené pomocí indukovaných mutací nesou zvýšené riziko, že působením mutagenu došlo k introdukci vyššího počtu změn v DNA a nejsou tedy skutečně koisogenní. V případě indukovaných mutací je tedy potřeba využívat markery k potvrzení, že nedošlo k fixaci dalších variant. Koisogenní kmeny se často využívají k popisu funkce genů, ve kterých se tyto kmeny liší.

Rekombinantní kmeny – vznikají křížením dvou příslušníků různých inbredních kmenů (P), jejichž potomci (F1) jsou kříženi mezi sebou a takto vzniklí jedinci (F2) jsou kříženi bratr × sestra po dobu dalších nejméně 20 generací. Takto vzniklé rekombinantní kmeny mají genom složený z oblastí identických buď s jedním nebo s druhým parentálním kmenem (P). Tyto kmeny obohacují nabídku syngenních kmenů a byly využívány k popisu vazebných vzdáleností a tvorbě genetických map s využitím četnosti rekombinace.

Kongenní kmeny – příslušníci kongenního kmene se od sebe navzájem odlišují v jedné oblasti genomu, která zahrnuje více lokusů. Tyto kmeny vznikají zpětným křížením. Nejprve jsou

zkřížení jedinci z dvou nepříbuzných parentálních inbredních linií. Ve všech dalších generacích (minimálně 10) jsou potomci kříženi s jedincem z jednoho parentálního kmene (zpětné křížení) a probíhá u nich selekce na přítomnost genomické oblasti zájmu s využitím přímých nebo nepřímých markerů. Výsledkem je kongenní kmen, kde jsou jedinci s výjimkou selektované oblasti identičtí s parentálním kmenem použitým ke zpětnému křížení. U kongenních kmenů je potřeba kontrolovat genomickou oblast zájmu v každé další generaci, aby nedošlo k jejímu ztracení. Kmeny myši kongenní pro oblast hlavního histokompatibilitního komplexu byly v minulosti klíčovým nástrojem pro odhalení principů regulace imunitních funkcí. Buněčnými manipulacemi lze získat i kmeny **konsomické**, které se shodují v celém svém genomu s výjimkou jednoho celého chromozomu. Slouží ke studiu funkcí genů lokalizovaných na konkrétním chromozomu, což má význam například při objasňování poruch spojených s aneuploidii.

Mutantní kmeny – jsou kmeny nesoucí určitou, často patologickou mutaci. Jsou opět homozygotní a syngenní, což umožňuje studium účinků těchto mutací na větším množství identických zvířat homozygotních pro danou mutaci. Tyto kmeny slouží jako **biomodely**, nejčastěji pro významné lidské nemoci.

Transgenní kmeny – genom zvířat, ze kterých vzniká transgenní kmen, obsahuje cizorodou kódující DNA. Forma cizorodé DNA má nejčastěji buď charakter (komplementární) cDNA nebo (genomické) gDNA. Mohou být přenášeny buď jednotlivé geny, nebo delší genomické úseky nesoucí více lokusů. Transgenní kmeny slouží nejčastěji jako modelové organismy pro studium nejen lidských onemocnění, nebo jako bioreaktory pro produkci farmaceuticky významných proteinů. Tvorba transgenních kmenů je poměrně náročná. Transgen je různými způsoby vkládán do embrya, kde ideálně dojde k jeho začlenění a následném přenášení do všech dceřiných buněk. Úspěšné začlenění a následná exprese přenášeného transgenu jsou pořád poměrně málo časté (obvykle do 10 %). Transgen se začleňuje do genomu obvykle náhodně a může se tedy začlenit do míst v genomu, která nejsou expresi genů nakloněna, např. vysoce methylované oblasti nebo bezprostřední blízkost regulačních sekvencí. Pokud není introdukce transgenu do vyvíjejícího se embrya správně provedena, může také docházet k objevu mosaicismu a někteří nebo všichni potomci takového jedince pak nebudou daný transgen nadále přenášet. K umlčení nebo úplné ztrátě transgenu může docházet také působením další genomických mechanismů a je tedy potřeba transgenní zvířata v každé generaci testovat na přítomnost a expresi transgenu.

Knokaut (knock-out) kmeny – jedinci z knokaut kmenů mají ve svém genomu umlčený (neexprimovaný) gen. Tohoto umlčení je možno dosáhnout několika různými způsoby, které se všechny opírají o manipulaci s embryonální DNA, podobně jako v případě transgenních kmenů. Na rozdíl od transgenů, je do hostitelského genomu vnášena DNA sekvence komplementární k cílové sekvenci genu, který má být vyřazen. Vnášená DNA je nicméně defektní takovým způsobem, který neumožňuje její úspěšnou expresi. Vhodným křížením v dalších generacích je pak knokaut verze genu uvedena do homozygotního stavu. V posledních letech je pro vytváření knokaut kmenů stále častěji využívána technika CRISPR/Cas9, která umožňuje cílenou editaci genomické DNA. Knokaut kmeny se běžně využívají k popisu funkce genů, ať už se jedná o obecnou funkci, nebo o funkci za specifických podmínek (např. onemocnění).

Kmeny laboratorních zvířat tedy díky své genetické uniformitě přispívají ke standardizaci experimentálních podmínek, slouží jako biomodely významných lidských znaků a v neposlední řadě svou genetickou uniformitou umožňují minimalizovat počty zvířat nutných pro určitý experiment.

15.4 Bioetika výzkumu na zvířatech

Základní etická otázka v souvislosti s výzkumem na zvířatech se zaobírá tím, jestli zvířata mají stejná práva jako lidé. Na jednu stranu jsou alespoň některá zvířata schopna cítit bolest, stres a další negativní vjemy. Na druhou stranu se dá říct, že na to, aby nějaké stvoření mohlo mít práva, je nezbytné, aby bylo součástí společenství, které je schopno morální volby, tedy chápat rozdíl mezi dobrým a špatným. Navíc s právy se obvykle spojují i povinnosti, které je nutné dodržovat, aby takové uspořádání mohlo fungovat. Takové pravidlo se jednoznačně vztahuje na člověka, ale u zvířat pozorujeme instinktivní chování bez zřetele na morální. Výsledkem tohoto dilematu je obecně přijímaný systém, který umožňuje experimenty na zvířatech za specifických okolností. Není možné experimentovat na zvířatech bez adekvátního důvodu, kde navíc musí případný benefit převažovat nad utrpením způsobeným pokusným zvířatům. V této souvislosti se často využívá etického směru nazývaného **utilitarismus**. Tento směr se snaží rozhodovat o morálnosti daného činu tím, že poměřuje jeho přínos a jeho cenu, tedy snaží se rozhodnout, jestli dobré převažuje v konečném důsledku nad špatným, případně se snaží o dosažení největšího dobra pro nejvíce jedinců ("Potřeby mnoha převažují nad potřebami

několika."). Právě o potenciální benefity se mezi zastánci experimentů na zvířatech a jejich odpůrci vede neustálý boj.

Z pohledu zastánců je výzkum na zvířatech nezbytný, protože není adekvátně nahraditelný. Všem klinickým studiím předcházejí preklinické studie na zvířatech. Experimentální zvířata se používají jak v základním, tak v aplikovaném výzkumu a jsou také nedílnou součástí vyššího vzdělávání v relevantních oborech. Jen v ČR je pro tyto a další účely každoročně využito kolem 230 tis. zvířat (<http://eagri.cz/public/web/mze/>). Z relativně nedávné historie jsou známy konkrétní případy, kdy měly experimenty na zvířatech kritický význam pro správné zhodnocení situace nebo pro objev a výrobu nových léčiv. Pokusná zvířata hrála například významnou roli při vývoji vakcíny proti obrně, kde mimo vlastní experimenty sloužila také k produkci této vakcíny. Jiný příklad se týká antibiotika isoniazid, které se dodnes používá k léčbě tuberkulózy. V prvních fázích testování na bakteriálních kulturách nebyla tato látka příliš účinná. Nicméně po aplikaci isoniazidu infikovaným hlodavcům se ukázalo, že je tato látka vysoce efektivní v boji s původcem tuberkulózy. Následně bylo prokázáno, že za tímto dramatickým zvýšením účinnosti stojí metabolická aktivace v těle testovaných jedinců. Na druhé straně thalidomid, který byl v Evropě povolen jako lék předepisovaný těhotným ženám pro potlačení ranních nevolností, byl následně prokázán jako silný teratogen způsobující malformace končetin (fokomelii) u novorozenců dětí. Thalidomid přitom nikdy nezískal povolení k prodeji v USA, FDA (Food and Drug Administration) nepovažovala experimentální rozsah testování této látky na zvířecích modelech za dostatečný.

Ze strany odpůrců experimentů na zvířatech nejčastěji zaznívají argumenty ohledně nedostatečné přenositelnosti výsledků mezi např. pokusnými hlodavci a člověkem při testování nových léčiv a dalších chemických látek. Dalšími argumenty jsou třeba možnost nahrazení zvířat v testování buněčnými kulturami, možnost snížení stresu a bolesti aplikací anestezie a analgezie a nemorálnost testování kosmetiky. Jsou známy případy, kdy i přes správně provedení preklinických studií měla aplikace testované látky závažné, někdy až fatální důsledky pro účastníky klinických studií. Příkladem mohou být klinické studie látky fialuridin (FIAU). I když nebylo odhaleno žádné pochybení v průběhu provádění preklinických ani klinických studií, došlo u některých dobrovolníků k selhání jater, které mělo u pěti z nich fatální následky a další se podařilo zachránit pouze s pomocí transplantace jater. Využívání alternativních metod jako výše zmíněné buněčné kultury je však značně omezené, buněčné kultury nejsou schopny simulovat prostředí organismu *in vivo* a jedná se tedy o model s nižší výpovědní hodnotou, než jsou pokusná zvířata. Buňky v těchto kulturách navíc procházejí v průběhu přípravy změnami

na úrovni DNA, což jejich výpovědní hodnotu ještě snižuje. Aplikace anestezie a analgezie může mít negativní dopad na spolehlivost výsledků, kdy může docházet k vzájemné interakci mezi testovanou látkou a anestetikem/analgetikem. Testování kosmetiky je obecně kontroverzní téma a jeho využití je často regulováno.

15.4.1 Princip 3R

V důsledku potřeby stanovení jasných pravidel pro nakládání s pokusnými zvířaty byl v roce 1959 představen tzv. **Princip 3R** (z angličtiny Replacement, Reduction, Refinement):

Replacement (nahrazení) – původně bylo míněno jako absolutní nahrazení laboratorních zvířat jiným biologickým materiálem, tedy ideálně např. výše zmíněnými tkáňovými kulturami. V průběhu času se ovšem ukázalo, že taková náhrada není plnohodnotná, a tak tento termín dnes zahrnuje také náhradu vyspělejších organismů za méně vyspělé.

Reduction (snížení) – snížení počtu pokusných zvířat na minimální hodnotu nutnou k získání dostatečného množství a kvality dat. Existuje mnoho způsobů, jak implementovat tento princip do laboratorní praxe. Experiment by měl být správně navržený, tak aby poskytl statisticky hodnotná data. Pro daný experiment by měl být vybrán nejvhodnější zvířecí model. Variabilita pokusných zvířat by měla být minimální, tedy měla by mít excelentní zdravotní stav (včetně mikroflóry), měla by jim být poskytována nejlepší možná péče atd. Paradoxně může tento princip v první fázi implementace vést k nárůstu počtu experimentálních zvířat, zejména proto, aby bylo dosaženo opravdu statisticky robustních výsledků. Snížení počtu pokusných zvířat nastává až následně, kdy není potřeba provádět takové studie opakovaně, protože již první studie poskytla kvalitní data.

Refinement (zdokonalení) – zdokonalení zahrnuje používání takových metod, kdy jsou pokusná zvířata vystavena minimální bolesti, stresu a nepohodlí. Tento princip zahrnuje zdokonalování výzkumných metod ale také zlepšení přístupu k laboratorním zvířatům. Při výzkumu na vyšších primátech je např. možné naučit pokusná zvířata nastavit paži pro odběr krve výměnou za žádaný pamlsk, kdy se pokusné zvíře stává ochotným účastníkem výzkumu. Dále je možné zdokonalení metod např. obecným zlepšením prostředí, kde k testování dochází, tak, aby byl omezen stres a nepohodlí na minimum. Tento přístup může zahrnovat nejrůznější specializované pomůcky jako třeba vyhřívané podložky. Velmi efektivní je v tomto ohledu také

zvýšení pozitivní interakce mezi pokusnými zvířaty a jejich ošetřovateli, kdy je vytvářeno citové pouto, které snižuje stres u zvířat a předchází týrání těchto zvířat. Toto citové pouto může mít ale negativní efekt na ošetřovatelský personál, pokud na konci experimentu dochází k eutanázii pokusných zvířat.

Princip 3R se postupem času stal základním kamenem pro návrhy zákonů týkajících se péče o pokusná zvířata. V ČR je obecně upraveno zacházení se zvířaty zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Pokusná zvířata jsou chráněna vyhláškou č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat. Další nepřímou ochranu pokusným zvířatům poskytují např. zákony o veterinární péči, šlechtění a plemenitbě, přepravě zvířat atd. V souvislosti se vstupem ČR do EU bylo také v roce 2003 schváleno přistoupení k dohodě s názvem European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (EST no. 123), které bylo uvedeno v ČR pod číslem 116/2003 Sb. m. s.

16. Použitá literatura

- ADLI, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 2018, 15, 9(1), 1911. ISSN 2041-1723
- BEDNÁŘ, J, KUCIEL, J, VYHNÁNEK T. *Genetika*. 2. vydání. Brno: Mendelova univerzita, 2010. ISBN 978-80-7375-448-8.
- BROWN, TA: *Klonování a analýza genů*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. ISBN 978-80-244-1719-6
- BUDIK S. Genetics in Domestic Animal Reproduction In. ABUBAKAR M. *Trends and Advances in Veterinary Genetics*. 1. vydání. London: IntechOpen, 2017. ISBN: 978-953-51-3042-0
- CIEPLOCH, A, et al. Genetic disorders in beef cattle: a review. *Genes & genomics*. 2017, 39 (5), 461-471. ISSN: 1976-9571
- CONLON, RA. Transgenic and Gene Targeted Models of Dementia. In: DE DEYN, PP, VAN DAM, D, ed. *Animal Models of Dementia*. 1. vydání. Humana Press, 2011. ISBN 978-1-60761-897-3
- DONNER, J, ANDERSON, H, DAVIDSON, S, HUGHES, AM, BOUIRMANE, J, LINDQUIST, J et al. Frequency and distribution of 152 genetic disease variants in over 100,000 mixed breed and purebred dogs. *PLoS Genet.* 2018, 14(4), e1007361. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007361>
- DRAKE, JW, CHARLESWORTH, B, CHARLESWORTH, D, CROW, JF. Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics*. 1998, 148 (4), 1667-1686 ISSN: 1943-2631
- EFSA Scientific Committee. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*. 2011, 9(9), 2379. ISSN: 1831-4732.
- ERIKSSON, S. Invited review: Breeding and ethical perspectives on genetically modified and genome edited cattle. *Journal of Dairy Science*. 2018, 101(1), 1-17. ISSN 00220302.
- FLEMING, A, ABDALLA, EA, MALTECCA, CH, BAES, CH. Invited review: Reproductive and genomic technologies to optimize breeding strategies for genetic progress in dairy cattle. *Archives Animal Breeding*. 2018, 61, 43-57. ISSN 0003-9438
- FRANCO, N. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals*. 2013, 3(1), 238-273. ISSN 2076-2615.
- Geneticky modifikované organismy. *Evropský úřad pro bezpečnost potravin* [online]. Evropská unie© 1995–2019 [cit. 10. 07. 2019]. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/food/plant/gmo>

Geneticky modifikované organismy. *Ministerstvo životního prostředí České republiky* [online]. MŽP ČR © 2008–2019 [cit. 10. 07. 2019]. Dostupné z: https://www.mzp.cz/cz/geneticky_modifikovane_organismy

GRANDEMANGE, A, LASSEUR, R, LONGIN-SAUVAGEON, C, BENOIT, E, BERNY, P. Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest Manag Sci.* 2010, 66(3), 270-6. DOI: 10.1002/ps.1869. ISSN 1526-4998

HANAHAN, D, WEINBERG, RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000, 100(1), 57-70. ISSN 0092-8674

HARDY, A, BENFORD, D, HALLDORSSON T et al. Clarification of some aspects related to genotoxicity assessment. *EFSA Journal* [online]. 2017, 15(12) ©John Wiley & Sons, 1999-2019 [cit. 2019-07-10]. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5113. ISSN 18314732. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2017.5113>

HU, ZL, PARK, CA, REECY, JM. Building a livestock genetic and genomic information knowledgebase through integrative developments of Animal QTLdb and CorrDB. *Nucleic Acids Research.* 2019, 47 (1), 701–710. ISSN 1362-4962

CHRISTENSEN, ND, PENG, X. Rabbit Genetics and Transgenic Models. In: Suckow, MA et al. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. 1. vydání. Londýn: Academic Press, 2011. ISBN 9780123809209.

ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. *European Medicines Agency London* [online]. EMA © 1995-2019, [cit. 10. 7. 2019]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-23.pdf

JINEK, M. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science.* 2012, 337(6096), 816-820. ISSN 00368075.

JOHNSON, M. Laboratory Mice and Rats. *Materials and Methods* [online]. 2012, 2 Labome.com © 2019 [cit. 2019-07-10]. DOI: 10.13070/mm. en. 2.113. ISSN 2329-5139. Dostupné z: <http://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>

Khan Academy | Free Online Courses, Lessons & Practice [online]. ©2019 [cit. 10. 07. 2019]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-rna-and-protein-synthesis/a/intro-to-gene-expression-central-dogma>

KLIMKOVÁ, M. *Využití molekulární genetiky ve zlepšování populací hospodářských zvířat*. Brno, 2012. Bakalářská práce. MZLU v Brně. Agronomická fakulta.

- KNÍŽE, B, ŠILER, R. a kol. *Genetika zvířat*. 1. vydání. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1978. ISBN 07-069-78
- MANNING, FJ, SWARTZ, MN. *Review of the Fialuridine (FIAU) clinical trials*. 1. vydání. Washington, DC: National Academy Press, 1995. ISBN 0-309-05279-3
- Mutace. *Genetika - Biologie. Váš zdroj informací o genetice a biologii* [online]. © 2010 [cit. 10. 07. 2019]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/mutace>
- National Center for Biotechnology information NCBI [online]. ©2019 [cit. 16. 07. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>
- NICHOLAS, FW. *Introduction to Veterinary Genetics*. 3. vydání. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-1-4051-6832-8
- NEČAS, O, et al. (2000) *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, 3. vydání. Jinočany: Nakladatelství H&H Vyšehradská. 2000. ISBN 80-86022-46-3
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. *OECD iLibrary* [online]. © 2019 OECD [cit. 2019-07-10]. Dostupné z: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788
- PALANOVA, A. The genetics of inherited retinal disorders in dogs: implications for diagnosis and management. *Vet Med (Auckl)*. 2016, 7, 41–51. ISSN 2230-2034
- PSE maso aneb jak je to s vodou ve vepřovém mase? *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. © Státní zemědělská a potravinářská inspekce 2019. [cit. 10. 07. 2019]. Dostupné z: <https://www.szpi.gov.cz/clanek/pse-maso-aneb-jak-je-to-s-vodou-ve-veprovem-mase.aspx>
- QIU, X. Strategies for improvement of cloning by somatic cell nuclear transfer. *Animal Production Science*. 2019, **59**(7), 1218-1227. ISSN 1836-0939.
- RAUSELL, A, TELENTI, A. Genomics of host–pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology, Immunogenetics and transplantation*. Special section: Effects of endogenous immune stimulants. 2014, 30, 32–38. ISSN 0952-7915
- ROSYPAL, S, a kol. *Úvod do molekulární biologie - 3. díl*. 2. vydání. Brno: Stanislav Rozsypal, 1997. ISBN 80-902562-2-8.
- RUSSELL, PJ. *Genetics: a molecular approach*. 2. vydání. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2006. ISBN 0-8053-4665-1.
- SAMBRAUS, HH. *Atlas plemen hospodářských zvířat*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Brázda. 2006. ISBN 80-209-0344-5.
- SIMMONDS, RC. Bioethics and Animal Use in Programs of Research, Teaching, and Testing. In: WEICHBROD, RH, THOMPSON GA, NORTON JN. *Management of Animal Care and*

- Use Programs in Research, Education, and Testing*. 2 vydání. Boca Raton: CRC Press, 2017. ISBN 9781315152189
- SIRONI, M, CAGLIANI, R, FORNI, D, CLERICI, M. Evolutionary insights into host – pathogen interactions from mammalian sequence data. *Nature Reviews Genetics*. 2015, 16, 224–236. ISSN 1471-0064
- SCHMID, M, BENNEWITZ, J. Invited review: Genome-wide association analysis for quantitative traits in livestock – a selective review of statistical models and experimental designs. *Arch. Anim. Breed.* 2017, 60, 335–346. ISSN 0003-9438
- SCHROFFELOVA, D. Změny v metodice ověřování původu skotu DNA technologií II. *Zpravodaj ČSCHMS*. 2016, 3, 41-43. ISSN 2464-4838
- SMRČEK, M, SMRČKOVÁ, L. *Psi celého světa: rádce pro správný výběr psa*. 1. vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3759-1.
- SNUSTAD, DP, SIMMONS, MJ. *Genetika*. RELICHOVÁ, J, ed. 2. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.
- STRACHAN, T., READ, AP. *Human Molecular Genetics*. 2. vydání. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1999. ISBN 1-85996-202-5
- TAKAHASHI, K, TANABE, K, OHNUKI, M et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007, 131 (5), 861-872. ISSN 0092-8674
- TOMAN, M, et al. *Veterinární imunologie*. 2. vydání. Praha: Grada Publishing. 2009. ISBN 978-80-247-2464-5
- VAN EENENNAAM, AL. Genetic modification of food animals. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017, 44, 27-34. ISSN 0958-1669
- VISSCHER, PM, WRAY, NR, ZHANG, Q, SKLAR, P, MCCARTHY, MI, BROWN, MA, YANG, J. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet*. 2017, 101(1), 5-22. ISSN 0002-9297
- WEIGEL, KA, SHOOK, GE. Genetic Selection for Mastitis Resistance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2018, 34(3), 457-472. DOI:10.1016/j.cvfa.2018.07.001
- WELLER, JI, EZRA, E, RON, M. Invited review: A perspective on the future of genomic selection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2017, 100, 8633–8644. ISSN 0022-0302

Autoři:	Ing. Leona Vychodilová, Ph.D., MVDr. Karla Stejskalová, Ph.D., MVDr. Jana Bubeníková, Mgr. Ján Futas, Ph.D., Mgr. Martin Plášil, Ph.D., Mgr. Eva Jánová, Ph.D., Prof. MVDr, RNDr. Petr Hořín, CSc.
Název:	Klinická genetika
Ústav:	Ústav genetiky
Počet stran:	163
Vydání:	1. vydání
Vydavatel:	VFU Brno

ISBN 978-80-7305-825-8

