



Středoškolská technika 2016

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

**Genetické mechanismy způsobující světlé zbarvení u lidí a
potkanů**

**Genetic mechanisms causing light pigmentation
in people and rats**

Jan Kindl

Gymnázium Elišky Krásnohorské

Ohradní 55, 140 00 Praha 4

Středoškolská odborná činnost

Obor SOČ: 4. Biologie

**Genetické mechanismy způsobující světlé zbarvení u lidí a
potkanů**

**Genetic mechanisms causing light pigmentation in people
and rats**

Autor: Jan Kindl

Škola: Gymnázium Elišky Krásnohorské, Ohradní 55, 140 00 Praha 4 – Michle

Kraj: Hlavní město Praha

Konzultant: doc. MUDr. František Liška, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto seminární práci vypracoval samostatně pod vedením doc. MUDr. Františka Lišky, Ph.D. a že jsem na konci práce uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

Vdne.....

podpis:

Poděkování

Rád bych poděkoval především doc. MUDr. Františku Liškovi, Ph.D. za to, že mi umožnil vypracovat mojí práci v prostředí a v kolektivu Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, a že jsem s ním mohl konzultovat postup práce jak z teoretického, tak z praktického hlediska.

Dále patří velký dík panu primáři MUDr. Jaroslavu Kotlasovi za to, že výkon mojí práce v ÚBLG zaštiťoval a k možnosti pracovat zde mě přivedl.

Také bych chtěl poděkovat všem laborantkám, které mi byly vždy ochotny poradit, když jsem si nebyl jistý „co a jak dál“, jmenovitě Barboře Baladové DiS., Ing. Blance Chylíkové, Michaele Janků a Andree Novákové.

Všem členům ÚBLG 1. LF jsem nesmírně vděčný, že jsem měl tu možnost poznat alespoň část jejich profese, a že mi k tomu poskytli velmi přátelské pracovní prostředí.

V neposlední řadě si moje poděkování rozhodně zaslouží profesorky RNDr. Alena Volfová a Ing. Marie Nosková, které mi obětavě vyšly vstříc a poskytly mi svůj názor na celou práci. Stejně tak bych rád poděkoval vedení školy Gymnázium Elišky Krásnohorské, že mojí vědeckou činnost podporovalo.

Nakonec bych chtěl poděkovat celé mojí rodině a všem mým kamarádům, kteří mě podporovali, jak to jen šlo, a snažili se mě v době výzkumu udržet v dobré náladě.

Anotace

Smyslem této práce bylo objasnit genetické mechanismy, které regulují zbarvení kůže a srsti, a následně i vysvětlit, z jakých důvodů někdy dochází k jejich světlému zbarvení.

V teoretické části bylo nejdříve vysvětleno, jak pigmentace probíhá z pohledu biochemického. Poté byly popsány nejčastější geny, jejichž mutace způsobuje světlou barvu kůže u lidí, a nakonec jsou uvedeny metody výzkumu, které byly použity během praktické části.

Cílem experimentální části práce bylo odhalit mutaci genu u potkanů kmene CHOCO, která způsobuje jejich světlé zbarvení. Pomocí porovnávání délky fragmentů polymorfních sekvencí DNA u zpětných kříženců homozygotů druhu CHOCO a heterozygotů CHOCO x BN byl pomocí analýzy genové vazby specifikován úsek DNA, na němž se zmutovaný gen vyskytuje. Je to úsek DNA, který obsahuje ortolog jednoho z hlavních genů regulujících zbarvení u lidí, gen *TYR* neboli *OCA1*. Mutace tohoto genu u člověka může způsobovat buď částečný (*OCA1b*), nebo dokonce úplný albinismus (*OCA1a*).

Klíčová slova: pigmentace kůže a srsti; poruchy pigmentace; mutace genu; potkaní kmeny BN, CHOCO; gen *TYR*; *OCA1*; albinismus

Annotation

The purpose of this thesis was to clarify the genetic mechanisms, which regulate skin and hair colour and also to explain, why the deposition of the pigment can be decreased.

In the theoretical part the process of pigmentation from biochemical point of view was explained. After that the most common genes whose mutations cause light skin colour in people were described. Then, the methods used during the practical part were analysed.

The aim of the experimental part was to find the mutation of the gene of rat strain CHOCO, which causes their light hair colour. The DNA segment that carries the mutated gene was specified by comparing the length of fragments of polymorphic DNA sequences in backcross progeny derived from crossing homozygotes CHOCO with heterozygotes BN x CHOCO. Genetic linkage analysis between the DNA polymorphisms and the skin colour enabled to identify a region on chromosome 1 containing the mutated gene. The region contains an ortholog of a most important gene regulating human pigmentation – the tyrosinase gene also known as OCA1. The mutation of this gene in human can cause either partial (OCA1b) or even absolute albinism (OCA1a).

Keywords: skin pigmentation; pigmentation disorders; gene mutation; rat strain BN, CHOCO; *TYR* gene; OCA1; albinism

Obsah

1 ÚVOD	7
2 TEORIE	8
2.1 KŮŽE.....	8
2.1.1 STAVBA KŮŽE.....	8
2.1.2 FUNKCE KŮŽE	9
2.2. MELANOCYTY A MELANIN	10
2.3 MELANOGENEZE	12
2.4 GENY OVLIVŇUJÍCÍ MELANOGENEZI	15
3 METODIKA	18
3.1 ODBĚR VZORKŮ A JEJICH IZOLACE	18
3.2 ŘEDĚNÍ VZORKŮ DNA	19
3.3 PCR	20
3.4 ELEKTROFORÉZA.....	22
3.4.1 AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA	23
3.4.2 POLYAKRYLAMIDOVÁ ELEKTROFORÉZA	25
3.5 DETEKCE GELU	26
3.6 STATISTICKÉ VÝPOČTY	27
4 VÝSLEDKY	29
4.1 BIOLOGICKÉ MATERIÁLY	29
4.2 POSTUP PRÁCE.....	30
4.3 VÝSLEDKY	31
5 DISKUSE	36
ZÁVĚR	37
SLOVNÍČEK POJMŮ A ZKRATEK	38
ZDROJE	41
ZDROJE OBRÁZKŮ:	41
ZDROJE INFORMACÍ:	42

1 Úvod

Cílem této odborné práce je především vysvětlit problematiku pigmentace kůže a chlupů a popsat, jakými mechanismy se řídí od nejzákladnějších chemických reakcí až po transport pigmentu do svrchní vrstvy kůže. Cílem experimentální části práce je zjistit, zda jsou za světlou barvu kůže u člověka a u potkana odpovědné shodné geny. K tomu jsme využili potkany kmene CHOCO, kteří jsou nápadně světle zbarvení (*dilution*). Pomocí genové vazby jsme chtěli určit, kde se gen *dilution* nachází, a porovnat geny v úseku obsahujícím gen *dilution* s geny, jejichž mutace způsobují změny barvy kůže/vlasů u člověka. Tento objev by mohl sloužit pro bližší pochopení molekulárních mechanismů regulace pigmentace a jako základní kámen pro hlubší výzkum problémů s pigmentací (např.: albinismu, rakoviny kůže, ...), protože by bylo možno použít potkana jako modelový organismus dalšího lékařského výzkumu této problematiky.

2 Teorie

2.1 Kůže

Kůže (latinsky *cutis*) je největším orgánem v těle všech obratlovců. Nachází se na jeho povrchu a vytváří tak bariéru mezi vnitřním prostředím organismu a vnějšími vlivy. Vzhledem k tomu, že pozorovanými objekty této práce jsou lidé a potkani, bude dále popisována pouze kůže savců.

2.1.1 Stavba kůže

Kůže savců se skládá ze tří vrstev - pokožky (epidermis), škáry (dermis) a podkožního vaziva (hypodermis).

Pokožka je svrchní vrstva kůže. Je tvořena mnohvrstevným dlaždicovým epitelem, který neobsahuje cévy a je tedy vyživován pouze difuzí ze škáry. Ve spodní vrstvě epidermis neustále vznikají nové buňky, které se diferencují a posouvají do horních vrstev, obohacují se o keratin a mění svůj tvar. Když se buňka dostane na povrch pokožky (tedy zároveň i na povrch těla), odumírá a odlupuje se. Celému tomuto procesu se říká rohovatění (keratinizace). Pro další části této odborné práce je velmi významný fakt, že se právě v této vrstvě nacházejí také melanocyty. To jsou buňky produkující pigment melanin, který vedou do svrchní části epidermis. Množství, složení a prostorové uspořádání melaninových zrn jsou faktory zodpovědné za rozdíly pigmentace u různých jedinců.

Pod pokožkou se nachází další vrstva - škára. Na rozdíl od pokožky je hustě protkaná kapilárami, navíc se v ní nacházejí kolagenní a elastická vlákna, receptory hmatu, teploty a volná nervová zakončení reagující na bolestivé podněty. Ve škáře se nalézají také folikuly vlasů a chlupů. Folikuly samotné a zejména pak vlastní vlasy/chlupy jsou však derivátem epidermis. Pigmentace vlasů/chlupů je proto řízena podobně (i když ne zcela stejně) jako u volné kůže - melanocyty ve folikulu.

Spodní částí kůže neboli hypodermis je podkožní vazivo. Tvoří hranici mezi škárou a svalstvem, popřípadě kostí a je z velké části tvořena tukem. Asi 50% tělesného tuku se

nachází v podkožní tukové vrstvě. Vyskytují se zde také receptory tahu a tlaku, tzv. Vater-Paciniho tělíška.

2.1.2 Funkce kůže

Kůže má velké množství funkcí, které jsou všechny důležité pro celý organismus. Toto jsou její nejvýznamnější funkce:

- **Obranná funkce**

Kůže chrání tělo proti mechanickému poškození, vniknutí škodlivin a nežádoucích mikroorganismů. Navíc je v pokožce obsažen melanin – pigment, který chrání organismus před působením ultrafialového záření. Tato konkrétní funkce je podrobněji rozebrána dále.

- **Zadržování tekutin**

Kůže zabraňuje prostupu tekutin skrze ni, a to jak směrem dovnitř (což zabraňuje vstupu škodlivých látek), tak i zevnitř ven (a tak zabraňuje vysychání organismu).

- **Termoregulační funkce**

Kůže je špatně tepelně vodivá, a tím zabraňuje vysokým výkyvům teploty organismu, které jsou pro něj samozřejmě nežádoucí. Tělesná teplota může být regulována řízením průtoku krve kožními kapilárami, kde povrch těla působí jako tepelný výměník. Dalším významným termoregulačním prvkem je pocení, pomocí něhož se tělo brání přehřívání organismu. U savců je třeba zmínit i funkci srsti, která na povrchu těla v podstatě vytváří izolační vzduchovou vrstvu, a tím ještě více omezuje výměnu tepla organismu s vnějším prostředím.

- **Kůže jako smyslový orgán**

V kůži jsou obsaženy i různé smyslové receptory, tedy hlavně mechano- a termoreceptory, a proto může být považována za hlavní hmatový orgán.

- **Vylučovací funkce**

Tato funkce je realizována především potními a mazovými žlázami. Pot, spolu s kožním mazem, má kromě termoregulačního efektu také určitou ochrannou funkci. Obsahuje soli, má kyselé pH a tím výrazně omezuje růst mikroorganismů na povrchu kůže.

- **Produkce vitamínu D**

Působením slunečního záření je v kůži z cholesterolu produkován vitamin D (cholecalciferol), jehož další přeměnou v játrech a ledvinách vzniká aktivní hormon (Calcitriol= 1alfa,25-dihydroxycholecalciferol), jehož úkolem je zvýšit hladinu vápníku (Ca^{2+}) v krvi. Druhotně ovlivňuje i metabolismus fosfátu. Jeho nedostatek se může projevit např. zvýšenou kazivostí zubů a hlavně demineralizací kostí (jejich odvápněním), u dětí pak i rachitidou (=křivici).

- **Zásobní funkce**

Jak bylo zmíněno výše, v hypodermis se nachází velké množství tuku. Tato vrstva má izolační účinky a zároveň slouží jako energetická zásobárna těla.

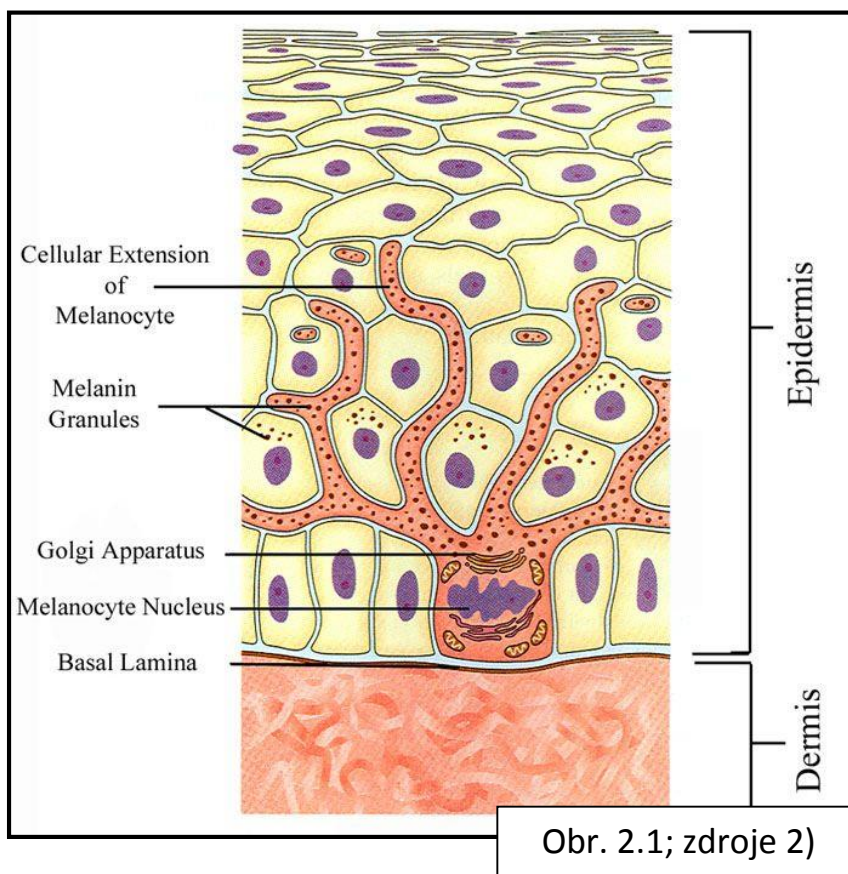
2.2. Melanocyty a melanin

Člověk denně potkává množství lidí a každý z nich vypadá jinak – každý má jiný odstín pleti, jinou barvu vlasů, očí. Stejně tak je tomu i u zvířat, konkrétně u jejich srsti, jejíž barva a vzorování je u každého jedince unikátní. Všechny tyto barevné diference vycházejí z působení jediné látky, z pigmentu nazvaného melanin.

Melanocyty jsou buňky, které melanin produkují. V kůži se nacházejí ve spodní části epidermis (ale vyskytují se také v oku, srdci nebo kostech), obvykle 1000-2000 melanocytů na mm^2 kůže.¹ Zajímavé je, že intenzita zbarvení není určována pouze množstvím, ale především aktivitou těchto buněk.

¹ Melanocyte. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [online]. 19. 5. 2002 [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Melanocyte>

Melanocyty mají „pavoukovitý“ tvar – z jejich kulatého těla vybíhají dendrity (ramena) a tak se napojují na jim blízké keratinocyty. Těmito rameny putují z centra buňky organely zvané melanozomy, ve kterých je melanin vytvářen a přepravován. Když melanozomy opustí prostředí buňky, melanin se z nich uvolní a vstoupí do nejbližších keratinocytů. Díky keratinizaci se tyto keratinocyty obohacené o pigment dostanou na povrch kůže, což je možné pozorovat jako zbarvení kůže.



Melanin se obecně dělí na tři druhy – eumelanin, feomelanin a neuromelanin.

Eumelanin má ještě další dva poddruhy, a sice hnědý a černý eumelanin. Z jejich názvu se dá odvodit, že černý eumelanin způsobuje zbarvení v odstínech šedé až černé a hnědý způsobuje různé hnědé barevné odstíny. Feomelanin není tak častý jako eumelanin a zapříčiňuje poměrně vzácné, červené zbarvení. Dále u lidského těla zbarvuje rty, pohlavní orgány a další, na pohled růžové nebo červené tkáně².

² Melanin. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [online]. 27. 4. 2002 [cit. 2016-01-06].

Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Melanin#Pheomelanin>

Neuromelanin byl objeven v tkáni mozku, nicméně jeho význam zůstává lidstvu prozatím skrytý. Srst, chlupy a vlasy jsou barveny obdobně, tedy eumelaninem a feomelaninem. Vlas je vytvářen epitelem vlasového folikulu, který podobně jako volná kůže obsahuje melanocyty, a proto se do něj dostává i jimi produkováný melanin.

Finální barva	Černý eumelanin	Hnědý eumelanin	Feomelanin
černá	velké množství	nemá vliv	nemá vliv
šedá	malé množství	chybí*	chybí
hnědé odstíny	malé množství	velké množství	nemá vliv
žlutá (blond)	chybí	malé množství	chybí
červená (zrzavá)	chybí	malé množství	malé množství
bílá	chybí	chybí	chybí

Tab. 1; zdroje 1)

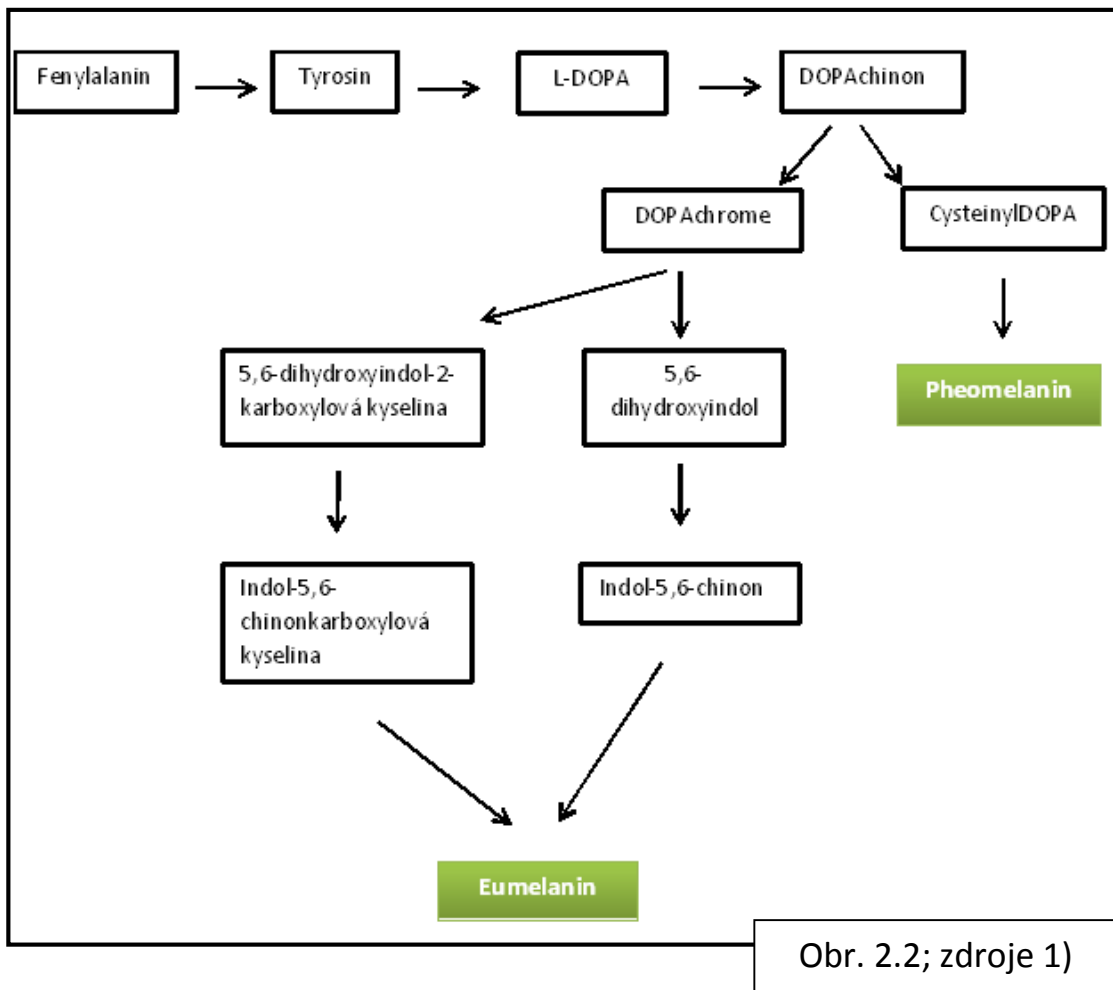
** Pozn. autora: V tabulce 1 je možné prohlédnout si všechny barevné variace, kterých jsou kombinace pigmentů schopny dosáhnout. Výraz „chybí“ nemůže být chápán doslovně – jak v kůži, tak v srsti je vždy obsažena určitá část všech tří pigmentů, tento termín by měl tedy správně znít „množství tak malé, že neovlivní výslednou barvu“. Parametry tabulky tento sice přesnější, ale rozsáhlejší termín neumožňují.*

2.3 Melanogeneze

Melanin je tedy produkován melanocyty a odváděn melanosomy do blízkých buněk, keratinocytů. Těmto transportním dějům ale musí předcházet samotná tvorba melaninu, tzv. melanogeneze. Tvorba melaninu je poměrně komplikovaná (ostatně jako všechny biochemické děje zkoumané do nejmenších detailů), proto bude její průběh dále objasněn ve zjednodušené formě.

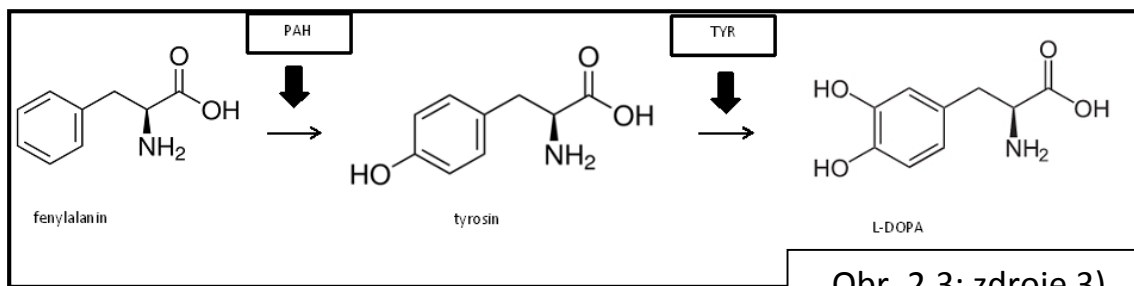
Jak již bylo uvedeno, intenzita zbarvení je významně ovlivňována aktivitou melanocytů. Tu podporují nebo inhibují různé látky, které vstupují a nějakým způsobem ovlivňují cyklus melanogeneze.

Melanogenezí je označován děj, při kterém se přetváří jedna ze základních aminokyselin organismu, tyrosin (který vzniká hydroxylací jiné aminokyseliny - fenylalaninu), na pigmenty eumelanin a feomelanin. Tento proces je názorně shrnut na obrázku 2.2, kde je vidět, jak fenylalanin přechází přes tyrosin v L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanin).

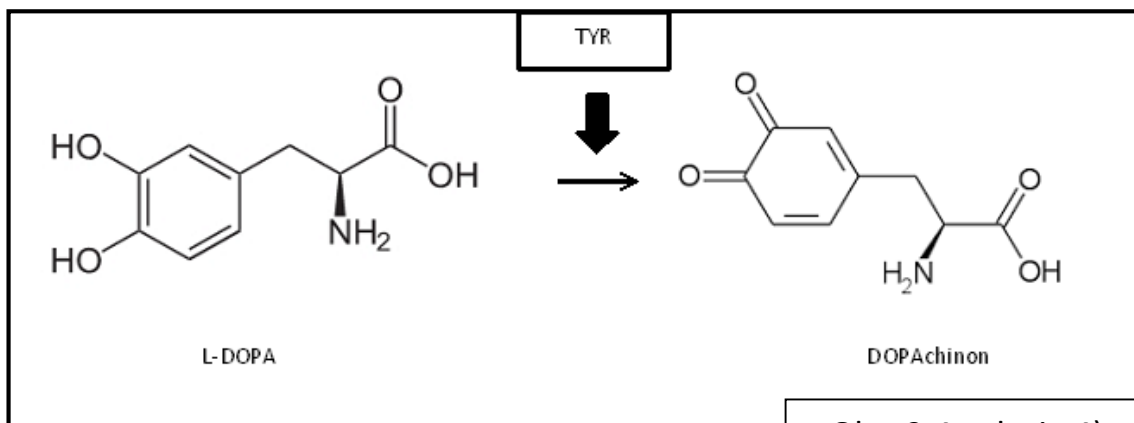


Obě tyto reakce jsou hydroxylace, neboť je během nich látka obohacována o -OH skupinu. V prvním případě reakci katalyzuje enzym PAH (fenylalanin hydroxyláza), u druhé reakce je to tyrozináza. (2.3)

U přeměny L-DOPA v DOPAchion je tyrozináza také katalyzátorem, nicméně už nejde o hydroxylaci, ale o oxidaci, kdy se -OH skupiny mění na skupiny =O. (obr. 2.4)

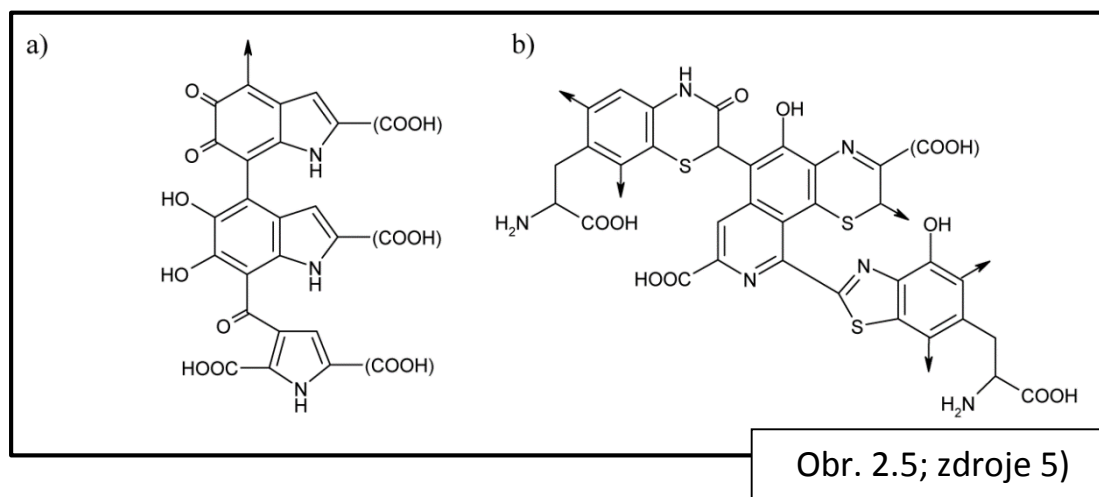


Obr. 2.3; zdroje 3)



Obr. 2.4; zdroje 4)

U DOPachinonu dochází k rozdělení reakcí, jež vedou k získání feomelaninu a eumelaninu. Tyto reakce svou složitostí překračují rámec této práce. Důležité je, že na jejich konci vznikají pigmenty eumelanin (a) a feomelanin (b):



Obr. 2.5; zdroje 5)

Pozn. autora: Na obrázku 2.5 jsou vidět pouze části celých molekul, proto je zde pomocí šipek naznačeno, v jakých místech bude molekula pokračovat. I z obrázku je ale možné udělat si představu o tom, jakým trendem se bude molekula rozvíjet dále.

2.4 Geny ovlivňující melanogenezi

Genů, které mohou nějakým způsobem ovlivnit tvorbu melaninu, je značné množství. Pro lepší pochopení praktické části práce zde budou zmíněny pouze ty, které mají svou funkci prokázány vliv na konečné zbarvení kůže (a tím i vlasů a chlupů) člověka.

Pro experimentální část této práce bylo vybráno 9 základních genů, které jsou zodpovědné za část variability barvy kůže/vlasů u obyvatel Eurasie. Všechny vybrané geny kódují bílkoviny, jednotlivé formy (alely) těchto genů pak kódují bílkoviny s vyšší nebo nižší aktivitou, která se následně projeví tmavším nebo světlejším odstínem barvy. Pro drtivou většinu lidských genů existují u ostatních savců korespondující geny odvozené od společného předka všech savců (tzv. ortology), které jsou jim strukturně podobné (obvykle 80% a větší shoda sekvence aminokyselin). To platí i pro geny ovlivňující melanogenezi. Proto je zde šance, že světlou barvu srsti potkana způsobuje stejný genetický mechanismus jako u lidí. Vybrané geny jsou:

- *MC1R*
- *ASIP*
- *SLC24A5*
- *SLC24A2*
- *KITLG*
- *SLC45A2*
- *TYR*
- *TYRP1*
- *OCA2*

Vliv jednotlivých genů na melanogenezi:

Pozn. autora: Ve většině případů je gen nazýván stejně, jako jeho proteinový produkt (často pouze s přidaným slovem „gen“). Pro zpřehlednění situace je gen v následujícím textu dle zvyklosti označen kurzívou.

- *MC1R* je gen, který kóduje receptor pro melanokortin 1. To je bílkovina, která se nachází v plazmatické membráně melanocytů a řídí produkci melaninu na základě signálu z hypofýzy. Ve chvíli, kdy je receptor aktivován pomocí peptidového hormonu hypofýzy melanokortinu, neboli MSH (melanocyty-stimulující hormon), vyšle signál melanocytu, aby začal namísto feomelaninu produkovat více eumelaninu. Mutace tohoto genu může způsobit nepřetržitou signalizaci ze

strany MC1R receptoru, což v celkovém důsledku vede k tmavé barvě pleti, nebo aktivitu receptorů sníží, a to vede naopak ke světlejšímu zbarvení.

- *ASIP* gen způsobuje tvorbu ASIP (agouti signalling peptide) – peptidu, který se váže na MC1R receptory namísto MSH. Receptory tak nemohou být aktivovány, nemohou stimulovat melanocyt a předat tak pokyn k tvorbě eumelaninu. Tímto mechanismem vede gen *ASIP* k světlé barvě kůže.
- *SLC24A2* a *SLC24A5* jsou geny kódující membránové transportní bílkoviny z rodiny „Solute carrier family 24“, což jsou „antiportéry“, které vypumpují jeden iont Ca^{2+} a jeden K^+ ven z cytoplazmy výměnou za 4 Na^+ kationty do cytoplazmy. Tato výměna je zásadní pro správnou funkci Golgiho aparátu, organely melanocytu, kde se tvoří melanosomy. Proto při mutaci těchto genů dochází k inhibici výroby melaninu a tudíž i ke světlé barvě kůže.
- *KITLG* gen kóduje KIT-ligand (také zvaný „stem cell factor“), který aktivuje membránový tyrozinkinázový receptor KIT. Ten plní svou funkci v melanogenezi především během embryonálního vývoje organismu. Jeho úkolem je mimo jiné dovést melanocyty, které se diferencují během 3. až 5. týdne těhotenství v neurální liště, do správné vrstvy epidermis. Mutace v *KITLG* má za následek snížení nebo ztrátu funkce tohoto proteinu, kvůli tomu se méně melanocytů dostane na své místo v pokožce a proto nemohou vyrábět melanin. Z toho plyne, že mutací genu *KITLG* se snižuje množství pigmentu v kůži a tím je kůže bledší.
- *SLC45A2* gen podobně jako *SLC24A2* a *A5* kóduje transportní protein. U této skupiny dosud není jisté, s jakými látkami operují, nicméně se předpokládá, že jsou to cukry. Tyto proteiny jsou také využívány v Golgiho aparátu melanocytů a ze stejného důvodu jako u výše zmíněných genů *SLC24* způsobuje mutace tohoto genu sníženou pigmentaci pokožky.
- *TYR* gen kóduje enzym tyrozinázu. Tento enzym je, jak bylo vysvětleno v kapitole *Melanogeneze*, nezbytný během procesu výroby melaninu a to hned v několika krocích – 1) u hydroxylace tyrosinu na L-DOPA, 2) u oxidace L-DOPA na DOPACHINON a 3) může dále katalyzovat reakci přeměny 5,6-dihydroxyindolu na

indol-5,6-chinon. Mutace genu *TYR* tedy narušuje správnou funkci tyrozinázy, která tím nemůže katalyzovat reakce melanogeneze a tak dochází ke špatné pigmentaci kůže. Ztráta funkce genu *TYR* je nejčastější příčinou úplného albinismu (kůže a vlasy bílé, oči bledě modré).

- *TYRP1* kóduje tyrozináze podobný protein 1, jehož vlastní enzymatická aktivita není objasněna, ale přítomnost *TYRP1* prokazatelně zvyšuje aktivitu tyrozinázy. Podobně jako tyrozináza tedy vstupuje do reakcí vedoucích ke tvorbě eumelaninu, takže mutace na genu *TYRP1* může být jedna z příčin světlé barvy pokožky.
- *OCA2* gen kóduje tzv. protein P (podle myší mutace „pink-eyed *dilution*“ vedoucí ke světlému zbarvení). Přesné využití tohoto proteinu během melanogeneze není úplně objasněno, možná je to transportér tyrozinu do melanosomů. Nicméně je dokázáno, že jeho absence v melanocytech vede k výrazné depigmentaci, dokonce až k albinismu (odtud jméno genu – OculoCutaneous Albinism = albinismus týkající se očí a kůže), tudíž je nezbytný pro správnou tvorbu melaninu. U albinismu se jedná o ztrátové mutace, které způsobí, že protein P se v těle nevyrábí. Alely se sníženou funkcí jsou nejčastější příčinou modré barvy očí u Evropanů.

3 Metodika

Metody používané během praktické části práce, výzkumu, jsou řazeny podle pořadí, v jakém na sebe v jeho průběhu navazovaly.

3.1 Odběr vzorků a jejich izolace

DNA se vyskytuje ve všech tkáních organismu, ale třeba v chlupech jí jednak není dostatečné množství a jednak je degradovaná (buňky před keratinizací prodělají tzv. apoptózu, při které je DNA enzymaticky štěpena na malé fragmenty). Proto chlupy nejsou nejvhodnějším materiálem pro její izolaci. U potkanů je obvyklým způsobem izolace DNA z ocásků. Odběr vzorků tedy probíhal tak, že byla daným potkanům ustřižena špička ocásku v délce asi 3-5 mm. (Tento způsob je považován za optimální, protože výtěžek odběru je velký a působení bolesti zvířatům minimální, pro potkany je tento zásah bolestivý srovnatelně s aplikací injekce pro člověka.)

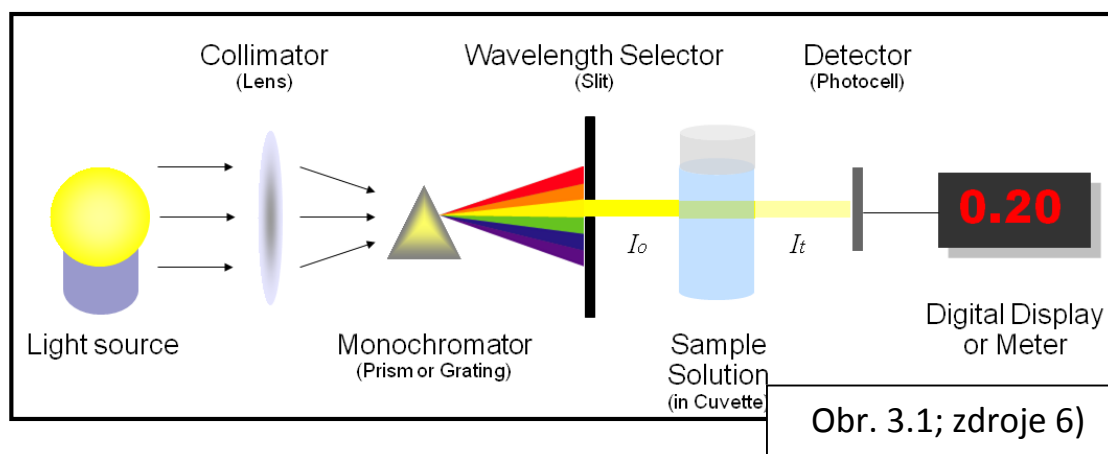
Další fází je samotná izolace DNA. Nejdříve je třeba oddělit DNA od zbylé tkáně, proto se tkáň naloží alespoň na 24 hodin do tzv. trávícího pufru. Jde o roztok, jehož úkolem, už podle názvu, je natrávit tkáň a uvolnit tak DNA z buněk a ze sevření histonů (bílkovin, okolo kterých se dvoušroubovice obtáčí). Proto pufr obsahuje silný detergent dodecylsírán sodný (rozkládá membrány) a proteinázu K (štěpí bílkoviny). RNA, která je jinak chemicky podobná DNA degraduje „sama“ díky všudypřítomným RNázám. Degradaci DNA zabrání přídavek EDTA, který vyvázáním dvojmocných kationtů inhibuje DNázy. Následuje extrakce pomocí směsi fenolu s chloroformem v poměru 1:1 (DNA se po centrifugaci drží v horní části pufru, ve spodní části fenolu s chloroformem a na rozhraní těchto částí se dostanou zbytky denaturovaných bílkovin a SDS. Nakonec se roztok mírně okyselí pomocí octanu sodného a poté se DNA precipituje (vysráží) pomocí etanolu (cca 60% finální koncentrace), propláchne se 70% etanolem a rozpustí v pufru, obvykle 10 mM Tris pH 8 + 1mM EDTA. Výsledkem této pracovní fáze je, že se pomocí precipitace etanolem odstraní většina nežádoucích solí a jiných nízkomolekulárních kontaminantů.

3.2 Ředění vzorků DNA

Po izolaci se v roztoku nachází čistá DNA. Nicméně pro další postup je nutné vědět, jaká je v roztoku její koncentrace. Ve většině případů je hodnota koncentrace DNA příliš vysoká, a pro její snížení je nutno vzorek správně naředit. K měření koncentrace se v tomto případě používá přístroj zvaný spektrofotometr.

1. <http://www.intechopen.com/books/ophthalmology-current-clinical-and-research-updates/application-of-electron-paramagnetic-resonance-spectroscopy-in-ophthalmology>

Spektrofotometr měří absorbanci světla (množství pohlceného světla) daného vzorku – vyše světlo ze zdroje skrz monochromátor, který polychromatické světlo změní na monochromatické (světlo kmitající na jedné frekvenci); pak projde měřeným vzorkem a dopadá na detektor, který zbylé světlo zachytí a změří hodnotu absorbance. Díky Beer-Lambertovu zákonu (zákon, který určuje lineární vztah mezi absorbancí a koncentrací) je možné z naměřené absorbance (A) vypočítat hledanou koncentraci (c). (obr. 3.1)



DNA absorbuje v ultrafialové oblasti s maximem 260 nm (aromatické π -elektrony bazí), zatímco proteiny při 280 nm (tyrozin), a další kontaminanty při 320 a 230 nm. Absorbance při 260 nm je potom přímo úměrná koncentraci ($c = 50 \times A_{260}$; $c[\text{ng}/\mu\text{l}]$). Poměr $A_{260}/280$ odpovídá čistotě vzorku, když je výsledek poměru roven 1,7-1,85, stejně jako $A_{260}/230$ se rovná alespoň 2. A_{320} by měla být nulová.

Po stanovení koncentrace následuje samotné ředění, spočívající v přidávání ředícího pufru do roztoků DNA tak, aby byla koncentrace všech vzorků stejná. Výsledkem je finální verze výchozích vzorků, které se uplatní při dalších metodách.

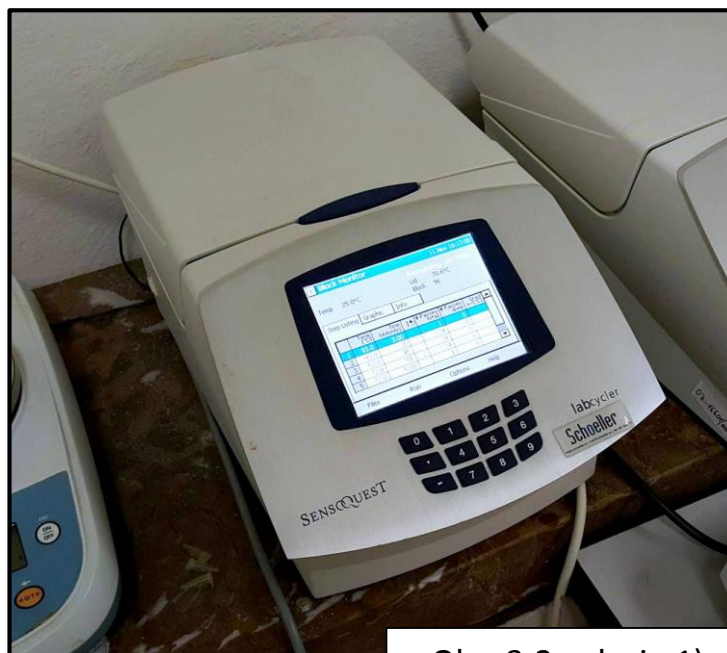
3.3 PCR

PCR je zkratka anglického *Polymerase Chain Reaction* (neboli polymerázová řetězová reakce) a vyjadřuje metodu amplifikace (zmnožení) konkrétního úseku DNA. Důvodem k označení této metody řetězovou reakcí je, že s každým cyklem exponenciálně roste množství amplifikovaného materiálu (2 → 4 → 8...). Díky tomu vzniká z jediné molekuly DNA po 30 cyklech více než jedna miliarda replik ($2^{30}=1\ 073\ 741\ 824$).

Příprava na PCR spočívá v smíchání naředěné DNA s látkami, které jsou u polymerázové řetězové reakce potřebné. Jsou to především: nukleotidy, primery a polymeráza.

Primery jsou velmi krátké úseky DNA (dlouhé obvykle 18-30 bazí). K tomu, aby bylo možno amplifikovanou sekvenci DNA (tzv. STS) ohraničit z obou stran, se vždy používají dva primery (F – forward a R – reverse).

Polymeráza je enzym izolovaný z termofilních bakterií (aby nedeneduroval při teplotě denaturace DNA) a její funkcí v PCR je schopnost přidávat nukleotidy do již zahájeného řetězce (tedy primeru). Nukleotidy ale vždy napojuje pouze ve směru 5' → 3' (viz obr.). Když jsou všechny potřebné chemikálie vloženy do mikroskopické zkumavky, umístí se zkumavky do tepelného cyklu – přístroje, který je schopný měnit v krátkém časovém úseku teplotu v požadovaném rozmezí (obr. 3.2). V cyklu je zahájena PCR podle předem nastaveného programu, který vyhovuje použitým chemikáliím. Jsou přesně stanovené cykly, jejich teplota, trvání a počet opakování.



Obr. 3.2; zdroje 1)

Vlastní PCR je založena na opakujících se cyklech, které vždy sestávají ze tří fází- denaturace, annealingu a elongace.

1. Denaturace

Při denaturaci se cykler zahřeje na teplotu 95°C po dobu 30 vteřin (teplota i čas se ale můžou měnit v závislosti na specifickém nastavení cykleru). Během této fáze se zruší vodíkové můstky mezi řetězci DNA, takže z dvoušroubovice vznikají dva jednotlivé řetězce.

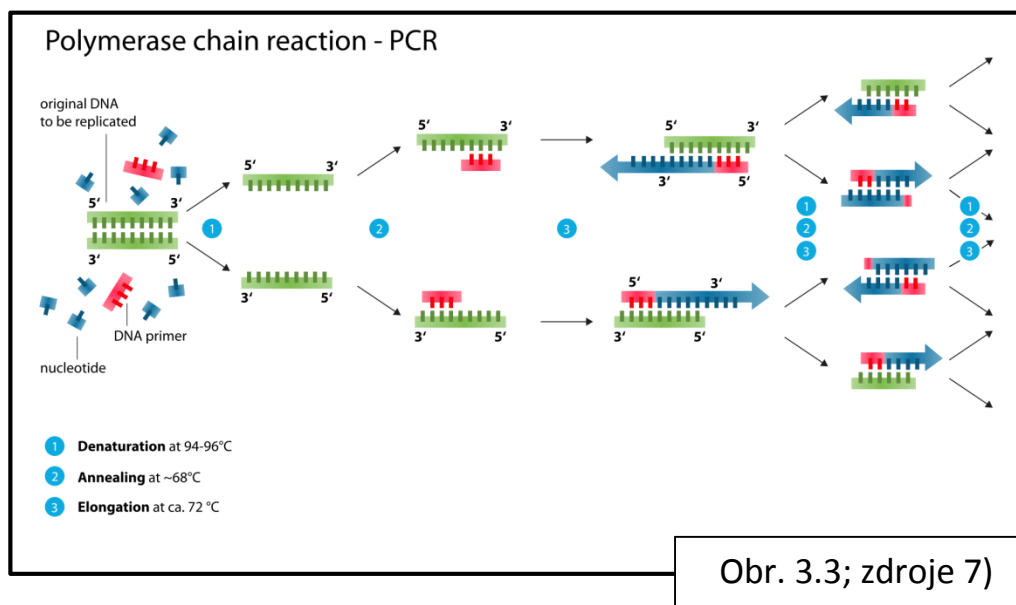
2. Annealing

V této fázi na řetězce „nasednou“ primery, což je dáno snížením teploty cykleru na cca 50-65°C. Primer F nasedne na jeden z řetězců a primer R na druhý.

3. Elongace

Po annealingu je na každém řetězci přítomen jeden primer a na řadu přichází poslední fáze cyklu, tzv. elongace. Teplotu při této fázi určuje typ polymerázy, která je používána. U PCR DNA potkanů je to nejčastěji tzv. Taq polymeráza (izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*), pro kterou je optimální aktivační teplota 72°C. Polymeráza v tomto kroku postupně

přidává nukleotidy k primeru, až se dostane na konec replikovaného řetězce. Tím skončí první cyklus PCR s výsledkem čtyř řetězců (dva původní celé, dva poloviční).



Stejným způsobem probíhají i další cykly. Rozdíl je pouze v tom, že když primer nasedne na původní řetězec, vznikne poloviční omezený z jedné strany, ale na poloviční řetězec v dalším cyklu nasedne druhý primer, který řetězec omezí i z druhé strany a vzniká tak cílová replika. Na obrázku je vidět, že po druhém cyklu vznikají dva původní řetězce, čtyři poloviční a dva cílové. Po třetím už ale vznikají dva původní, šest polovičních a osm cílových řetězců (viz obr. 3.3).

Množství původních a polovičních řetězců je na konci PCR mnohonásobně převyšeno množstvím cílových replik. Po 30. cyklu stojí 2 původní a 60 polovičních řetězců oproti 1 miliardě cílových replik. Tím na dalších výsledcích původní a poloviční řetězce ztrácejí podíl.

3.4 Elektroforéza

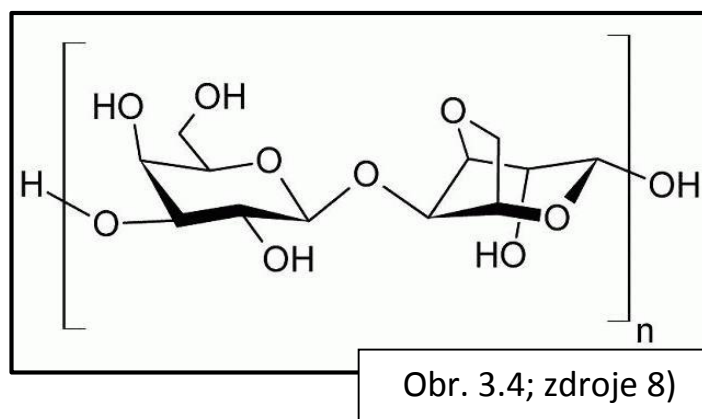
Elektroforéza (EF) je analytická metoda, která je využívána k separaci makromolekul, jako jsou proteiny, RNA, nebo DNA, a to na základě jejich velikosti. Princip metody spočívá v tom, že částice nukleových kyselin, nacházející se v koloidním roztoku, kterým prochází stejnosměrný proud, putují k anodě (tedy kladně nabitě částici

přitahující anionty). V případě gelové EF (ta byla používána v průběhu výzkumu) se izolované vzorky DNA nanese do gelu (agarového nebo polyakrylamidového), celý gel se ponoří do TBE pufru (funguje jako vodič elektrického proudu a udržuje pH během celé elektroforézy) a připojí se na zdroj. Gel je tvořen složitou sítí polymerů, která je protkána úzkými póry, jimiž procházejí fragmenty DNA. Proto jsou rychlosti pohybu těchto molekul nepřímo úměrné jejich velikosti (čím větší, tím pomaleji se fragmenty „protahují“ póry).

Základními typy elektroforéz jsou agarózová a polyakrylamidová EF a každá z nich má své výhody a nevýhody. Obecně se dá říci, že agarózová EF je snazší na přípravu a vyžaduje méně času, zatímco polyakrylamidová je přesnější při separaci kratších fragmentů a na výsledných gelech jsme lépe schopni rozpoznat rozdíly v délkách fragmentů. Proto je důležité vědět, jakých hodnot délka DNA na daném primeru nabývá, což se dá pro jednotlivé používané primery dopředu snadno zjistit na webových stránkách <http://rgd.mcw.edu/> - v databázi potkaního genomu.

3.4.1 Agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza je jedním ze dvou typů elektroforézy používaných během tohoto vědeckého výzkumu. Jak napovídá název, na místě gelu je používána agaróza, látka získávaná izolací z agaru, který je obsažen v mořských řasách. Je to polysacharid,

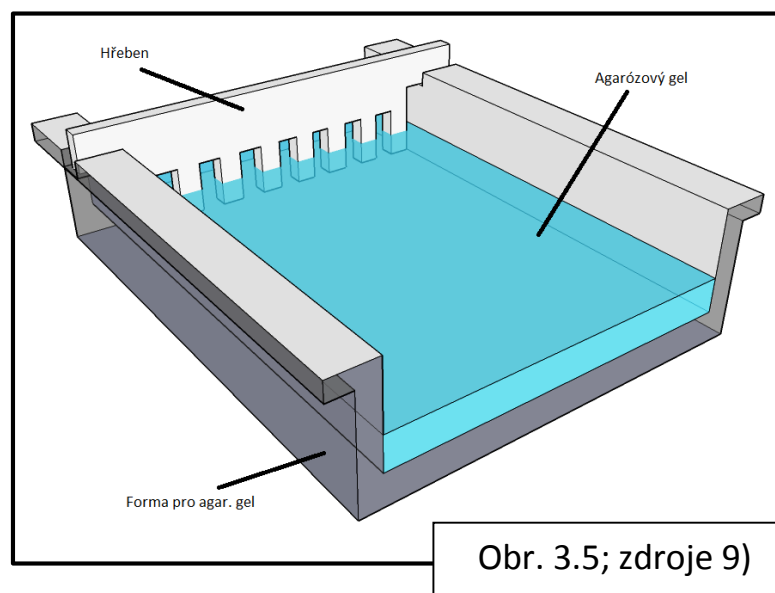


respektive polymer disacharidu galaktózy a 3,6-anhydrogalaktózy (viz obr. 3.4)

Agarózový gel se připravuje z agarózy, TBE pufru a vody. Poté, co se tato směs v daném poměru přivede do varu, přidá se do ní barvivo, které se váže na DNA a pod UV zářením emituje světlo. Tradiční barvivo na nukleové kyseliny v gelech je ethidium

bromid, ale vzhledem k tomu, že má mutagenní účinky na organismus, dává se v posledních letech přednost jiným látkám (např.: GelRed™), které jsou pro tyto účely jeho bezpečnější alternativou.

Hotový gel se chladí studeným proudem vody, nicméně je důležité jím stále míchat, jinak by mohl částečně ztuhnout už ve skle. Ve chvíli, kdy teplota gelu dosáhne zhruba 60°C, je gel nalit do formy, ve které během 30 minut úplně ztuhne. Ve formě musí být zasazené tzv. hřebeny, které vytvoří jamky, do nichž budou později nanášeny vzorky. (obr. 3.5)



Do jamek v připraveném agaru/gelu se nanášou vzorky DNA (už po proběhlé PCR). Do jedné z jamek se obvykle také přidává takzvaný žebříček (ladder), což je směs fragmentů různých DNA o různých délkách (velikostech), které jsou předem známe. Funkcí žebříčku je ukázat, v jakém velikostním rozmezí se výsledná DNA pohybuje, ověřit, že příprava gelu proběhla správně, a celkově pomoci při finální detekci gelů.

Produkty PCR i žebříček je před nanášením nutné smíchat s roztokem o vysoké hustotě (např. glycerolem) s přísadou barviva. To proto, aby vzorky jednak klesly na dno jamky, a jednak byly dobře vidět. V protokolu výzkumu se tato činidla (betain a kresolová červeň) přidávají do vzorků již před PCR.

Celý gel i s formou se připojí k elektrickému zdroji (cca 80 V) a po uplynutí 30-50 minut je možné přejít k závěrečné fázi celého cyklu, tedy k detekci.

3.4.2 Polyakrylamidová elektroforéza

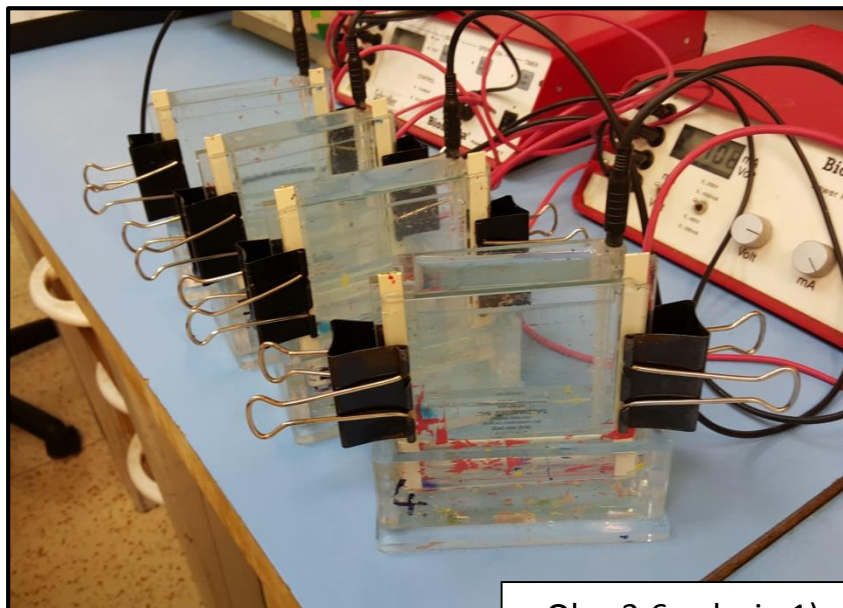
Na rozdíl od agarózy, která je zdravotně nezávadná (agar se používá i v potravinářství), je akrylamid (monomer) toxickou a karcinogenní látkou, takže při přípravě polyakrylamidového gelu je nutné dbát na bezpečnost práce. Gel je zde tvořen kombinací akrylamidu a bisakrylamidu, které společně polymerací vytvoří obrovskou hustou síť, jejíž oka mohou být chápána jako cesta pro fragmenty DNA. Připravuje se z uvedených dvou látek buď v poměru 19:1, anebo 37,5:1 (akrylamid ku bisakrylamidu). Gel 19:1 má hustější oka, proto se připravuje pro fragmenty, které jsou rychlejší (kratší), varianta 37,5:1 se používá naopak u fragmentů pomalejších.

Tento typ gelové elektroforézy je na přípravu složitější než agarózová EF. Nejdříve je třeba smíchat všechny chemikálie: vodu a TBE pufr (význam je zde stejný jako u agarózy), připravená směs akrylamidu a bisakrylamidu ve správném poměru, chemikálie APS (Ammonium PerSulfate) a TEMED (TEtraMethylEthylenDiamin), jejichž funkcí je katalyzovat celou polymeraci a zachytávat volné radikály akrylamidu.

Po přidání TEMEDu musí být směs urychleně nalita do připravené komory (opět s hřebenem), protože oproti agaróze je akrylamid plně ztuhlý už do pěti minut, ale tuhnout začíná ihned. Komora se skládá ze dvou skel, mezi kterými je vytvořen prostor pro gel.

Když gel ztuhne, jsou skla spojena s druhou komorou a umístěna do vany. (viz obr. 3.6) Do vany i do komory se nalije pufr tak, aby se dotýkal gelu shora (v komoře) i zespodu (ve vaně). Celá aparatura je dále připojena ke zdroji elektřiny (140-200 V). U polyakrylamidových gelů většinou trvá samotná EF (doba, kdy gelem teče proud) více než hodinu.

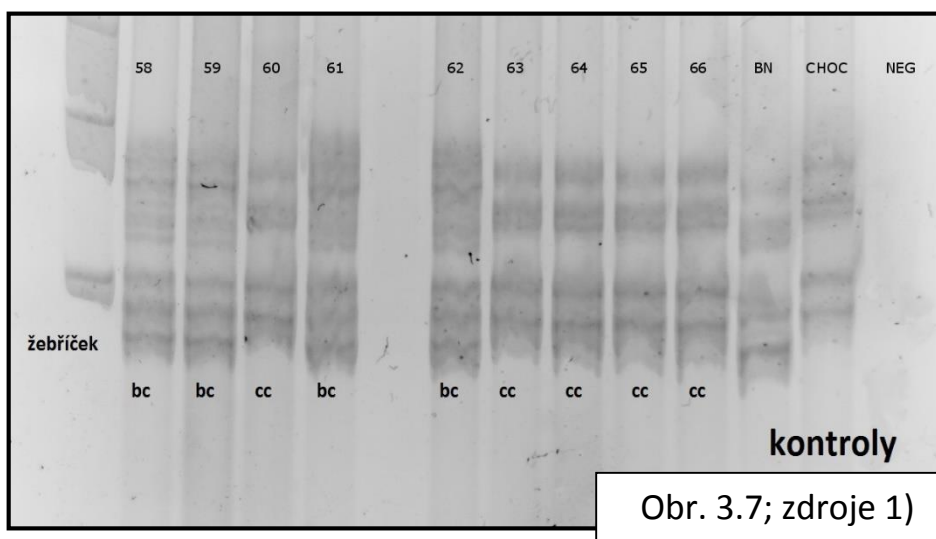
Po uplynutí EF se gel vyjme z aparatury a nabarví se – nechá se asi na 3 minuty v roztoku ethidia/GelRedu a je připraven k detekci pod UV zářením.



Obr. 3.6; zdroje 1)

3.5 Detekce gelu

Detekce gelu probíhá pod ultrafialovým zářením. Jak u polyakrylamidového, tak u agarózového gelu byl gel (ve fázi EF) obarven barvivem, které se váže na molekuly DNA a zároveň vyzařuje světlo (fluoreskuje) vlivem UV záření. V této fázi je gel umístěn do UV komory, připojené k počítači. Na počítači se ve vhodném programu (GeneSnap) zobrazí snímek, který je možno upravit tak, aby měl co nejlepší vypovídací kvalitu. Do PCR se obvykle přidávají i takzvané kontroly, tedy fragmenty, s kterými se dají pozorované vzorky srovnávat. Pro zjištění délky fragmentu si je také možno pomoci žebříčkem, (opět srovnáváním vzorku s fragmentem žebříčku).



Obr. 3.7; zdroje 1)

Ideální detekce probíhá takto: Na obrázku 3.7 je vidět 9 vzorků (+1x žebříček a 3x kontroly) vynesných na akrylamidovém gelu. V tomto případě je detekce poměrně nenáročná, protože se vzorky dělí pouze do dvou variant – heterozygoti BN x CHOC a homozygoti CHOC. Navíc je možné je snadno srovnávat s kontrolami vpravo – heterozygoti budou kombinací obou kontrol, homozygoti by měli vypadat stejně jako kontrola CHOC. Porovnáním lze tedy dospět k závěru, že na snímku gelu jsou z devíti vzorků 4 heterozygoti a 5 homozygotů (popsáno pod fragmenty – bc = heterozygot, cc = homozygot). Celá detekce končí tím, že jsou snímky gelů uloženy do paměti počítače, data zanesena do tabulek, a to vše ideálně uchované i v tištěné podobě.

3.6 Hodnocení vazby genů

Dosud neznámý gen, jehož alela způsobuje světlou barvu potkanů CHOCO, hledáme metodou tzv. pozičního klonování. Při tomto postupu je nejprve co nejpřesněji určena poloha neznámého genu na chromozomu. Používá se k tomu metoda genové vazby, kdy geny umístěné na stejném chromozomu v dostatečné blízkosti se předávají do další generace společně častěji, než by bylo při jejich náhodné segregaci. Oddělit je může rekombinace (crossing over). Rekombinanti jsou pak v případě této práce ti potkani, kteří se na daném testovaném STS neshodují svým genotypem a pozorovaným fenotypem. Podíl rekombinantů a všech potomků určí tzv. podíl rekombinantů – Morganovo číslo (θ - théta). K určení statistické významnosti vazby genu pro barvu srsti a polymorfním STS bylo během výzkumu použito LOD skóre. To je logaritmus podílu pravděpodobnosti pozorovaných výsledků (tj. počet rekombinantů a počet ostatních zvířat) za předpokladu vazby s pozorovaným podílem rekombinantů ku pravděpodobnosti pozorování stejných výsledků bez vazby (pravděpodobnost „rekombinace“ při zpětném křížení $\frac{1}{2}$), viz následující vzorec., tedy statistická hodnota, která je výsledkem hodnot dosazených do vzorce pro LOD skóre. (obr. 3.8)

$$\text{LOD score} = Z = \log_{10} \left(\frac{\theta^{(\# \text{ OF RECOMBINANTS})} \cdot (1-\theta)^{(\# \text{ OF NONRECOMBINANTS})}}{(\frac{1}{2})^{(\# \text{ OF RECOMBINANTS})} (\frac{1}{2})^{(\# \text{ OF NONRECOMBINANTS})}} \right)$$

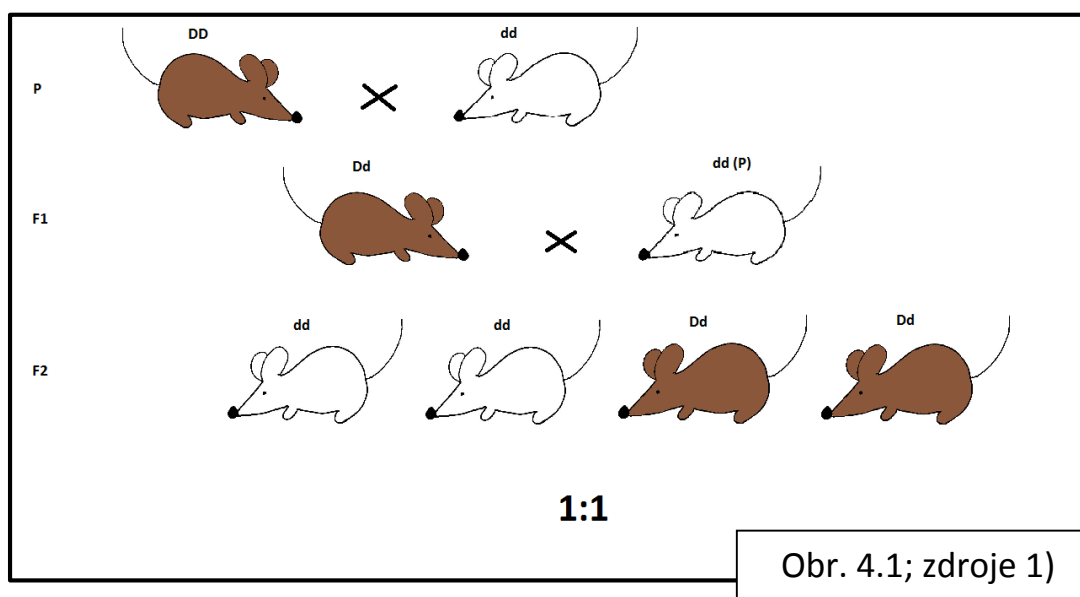
Obr. 3.8; zdroje 10)

Tato hodnota tedy udává výši pravděpodobnosti, že dva zkoumané geny jsou ve vazbě (jeden z nich je neznámý, projevuje se pouze sledovaným fenotypem – barvou, a druhý je polymorfní úsek DNA, který má známou chromozomální lokalizaci). Za hranici evidentních výsledků je považováno LOD skóre vyšší než 3, protože díky dekadickému logaritmu ve vzorci výsledek 3 znamená, že je šance 1:1000, že zjištěné výsledky jsou pouze náhodné (s hodnotou vyšší než 3 tato šance klesá dle křivky logaritmické funkce).

4 Výsledky

4.1 Biologické materiály

Mezi biologickými materiály jsme pro experimentální část práce použili vzorky DNA odebrané a zpracované dle popsaných metod. Celkem byla DNA izolována ze 70 jedinců potkana (35 Dd, 35 dd), kteří všichni pocházejí z „backcrossových vrhů“ dle následujícího obrázku 4.1.



Křížením dominantního homozygota BN (tmavého, genotyp DD) a recesivního homozygota CHOCO (světlého, genotyp dd) vzniklo 100% tmavých heterozygotů (Dd). Dále byl proveden tzv. backcross, neboli zpětné křížení – potomek (Dd) byl zkřížen s jedincem parentální generace CHOCO, resp. s jedincem se stejnými alelami (dd). Tím vznikli homozygotní jedinci (dd - choco) a heterozygotní jedinci (Dd - choco X bn).

Mezi biologické materiály musí být zařazeny i kontroly, se kterými jsme výslednou délku fragmentů srovnávali při detekci gelů. Tyto kontrolní vzorky byly celkem 3 – kontrola BN (BN homozygot), kontrola CHOCO (CHOCO homozygot) a negativní kontrola (kontrola bez DNA). Negativní kontrola slouží k ověření toho, zda nedošlo ke kontaminaci vzorku, kvůli které bychom museli měření opakovat.



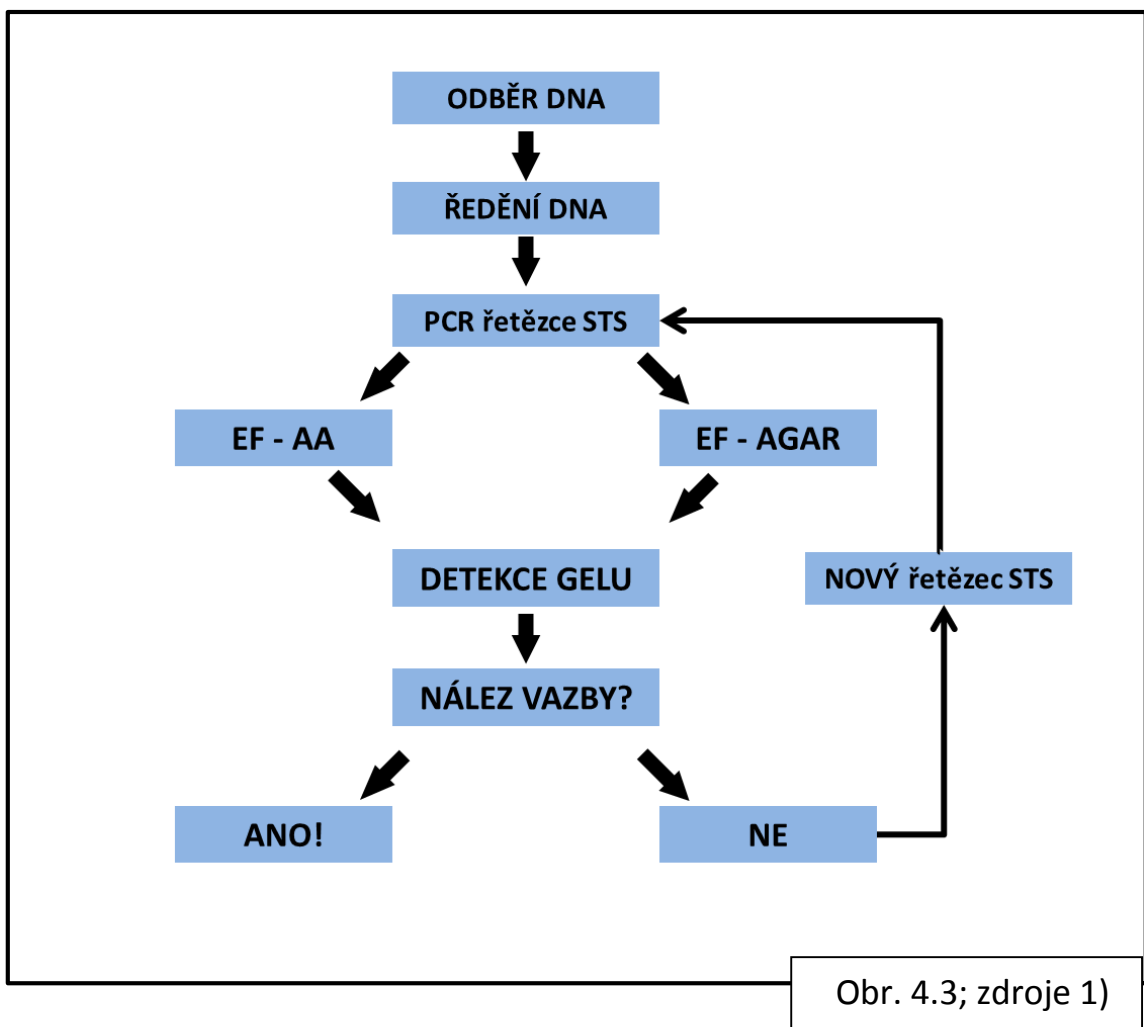
Obr. 4.2: Backcrossový vrh – matka (nahore) – recesivní homozygot kmene CHOCO; potomci – 3x recesivní homozygot kmene CHOC, 1x heterozygot BN x CHOCO.

4.2 Postup práce

Cílem naší práce bylo určit co nejkratší úsek DNA potkanů CHOCO, který skrývá mutaci způsobující jejich světlé zbarvení. Potkaní genom se skládá z 20 párů nepohlavních a 1 páru pohlavních chromozomů. Už při odběru vzorků jsme vyloučili pohlavní chromozomy, protože kdyby se kódující gen nacházel na nich, bylo by světlé zbarvení předáváno do další generace rozdílně podle pohlaví světlé zbarveného rodiče (např. při lokalizaci na chr. Y by byl znak viditelný pouze u samců). Proto bylo od

začátku výzkumu cílem hledat na těchto 20 chromozomech, mají dohromady délku asi 2,5 Gbp (bp = párů bazí).

Hledanému kódujícímu genu byl přiřazen pracovní název gen *DILUTION* (*dilution* z ang. znamená ředění- potkani CHOCO mají světlou, dalo by se říci naředěnou hnědou barvu). Při jeho hledání výrazně nám pomohl fakt, že v určité vzdálenosti od něj je také možno pozorovat vazbu s fenotypem (s barvami potkanů). Se vzrůstající vzdáleností od genu vazba slábne a je pozorovatelná až do 20 Mbp od genu (na obě strany). Na základě toho jsme vždy vybrali STS (krátké sekvence DNA) v oblastech, které ještě nebyly prozkoumané a podle popsaných metod jsme je otestovali. Algoritmus práce (resp. jeho zjednodušená forma) a řazení metod by mohlo být znázorněno asi takto:



Obr. 4.3; zdroje 1)

4.3 Výsledky

Nejdříve jsme otestovali 61 STS, jejichž souhrn následuje. V tabulce 1 je zaznamenán název STS, počet zkoumaných vzorků, počet rekombinantů v daném STS, jejich podíl a

výsledné LOD skóre. Zde uvedená data jsou pouze extrakcí nejdůležitějších informací. Celková tabulka, ze které jsou tyto údaje vyňaty, se nachází v přílohách (toto platí zároveň i pro tabulku 2). Přílohy této práce jsou v elektronické podobě na přenosném médiu CD umístěném na konci práce, neboť rozsah zmíněných tabulek neumožňuje předložit jejich tištěnou verzi. Počet zkoumaných vzorků se měnil zejména proto, že na začátku výzkumu bylo naším cílem pouze najít samotnou vazbu, k tomu bylo vhodnější zkoumání nižšího počtu vzorků. Když byl blíže lokalizován gen *dilution*, začali jsme testovat na větším množství vzorků, aby byly výsledky přesnější.

STS	Nr. of rats	Nr. of rec.	Rec. fraction.	LOD score
D2MGH12	20	8	0,400	0,175
D2MIT16	21	11	0,524	0,010
D2MIT8	21	11	0,524	0,010
D3MGH3	40	24	0,600	0,350
D3MIT14	45	25	0,556	0,121
D3MIT4	40	21	0,525	0,022
D3RAT159	21	8	0,381	0,261
D3RAT21	44	25	0,568	0,178
D3RAT53	21	10	0,476	0,010
D3RAT82	21	8	0,381	0,261
D4MGH4	21	9	0,429	0,093
IL6(CHR4)	20	12	0,600	0,175
D4RAT240	21	7	0,333	0,517
D5MIT14	21	13	0,619	0,261
D5MIT5	42	25	0,595	0,333
D5R133	21	12	0,571	0,093
D5RAT107	38	20	0,526	0,023
D5RAT39	21	12	0,571	0,093
D7RAT181	45	18	0,400	0,394
D7RAT51	21	10	0,476	0,010
D7RAT6	20	14	0,700	0,715
D8MIT2	21	10	0,476	0,010
D8MIT5	21	8	0,381	0,261
D8RAT228	18	6	0,333	0,443
D9RAT1	21	10	0,476	0,010
D9RAT171	21	8	0,381	0,261

STS	Nr. of rats	Nr. of rec.	Rec. fraction.	LOD score
D9RAT4	21	9	0,429	0,093
D9RAT75	19	9	0,474	0,011
D10RAT102	21	11	0,524	0,010
D10RAT116	21	12	0,571	0,093
D10RAT218	21	12	0,571	0,093
D10RAT241	21	10	0,476	0,010
D10RAT83	21	12	0,571	0,093
SMST(CHR11)	21	10	0,476	0,010
D12MGH5	21	16	0,762	1,316
D12RAT22	20	11	0,550	0,044
D13MIT2	21	12	0,571	0,093
D13MIT4	21	11	0,524	0,010
D14RAT38	21	12	0,571	0,093
D14RAT52	21	10	0,476	0,010
D14RAT77	21	9	0,429	0,093
D15RAT15	21	7	0,333	0,517
D15RAT21	65	33	0,508	0,003
D16MIT3	21	13	0,619	0,261
D16RAT37	20	14	0,700	0,715
D17RAT107	21	10	0,476	0,010
D17RAT108	21	9	0,429	0,093
D17RAT119	21	6	0,286	0,865
D17RAT144	21	6	0,286	0,865
D17RAT17	66	34	0,515	0,013
D17RAT67	21	7	0,333	0,517
D18MIT1	39	17	0,436	0,140
D18RAT30	45	19	0,422	0,237
D18RAT55	20	10	0,500	0,000
D18RAT67	45	18	0,400	0,394
D19MGH3	38	21	0,553	0,092
D19RAT9	43	21	0,488	0,005
D1ARB11	70	9	0,129	9,409
D1MIT14	21	9	0,429	0,093
D1RAT268	70	14	0,200	5,860
D1RAT35	45	20	0,444	0,121

Tab. 1; zdroje 2)

Výrazná vazba u STS D1ARB11 nám ukázala, že se gen *dilution* nachází v blízkosti tohoto STS (D1ARB11 – chr1, 122463047-122463222 bp). Proto jsme dále testovali blízké STS, abychom tak co nejvíce zúžili oblast, ve které se hledaný gen nachází.

Výsledky těchto STS jsou v následující tabulce. STS jsou řazené dle pozice na chromozomu, aby bylo dobře pozorovatelné postupné snižování podílu rekombinantů (a tím pádem i zvyšování hodnoty LOD skóre) směrem ke genu *dilution*.

STS	Position [Mbp]	Nr. of rats	Nr. of rec.	Rec. fraction	LOD score
D1RAT268	109,266	70	14	0,200	5,860
D1ARB11	122,463	70	9	0,129	9,409
D1MIT17	127,608	69	8	0,116	10,020
D1MIT2	134,980	70	4	0,057	14,413
D1GOT130	137,684	70	4	0,057	14,413
D1RAT273	140,644	70	0	0,000	21,072
D1RAT58	177,329	70	14	0,200	5,860

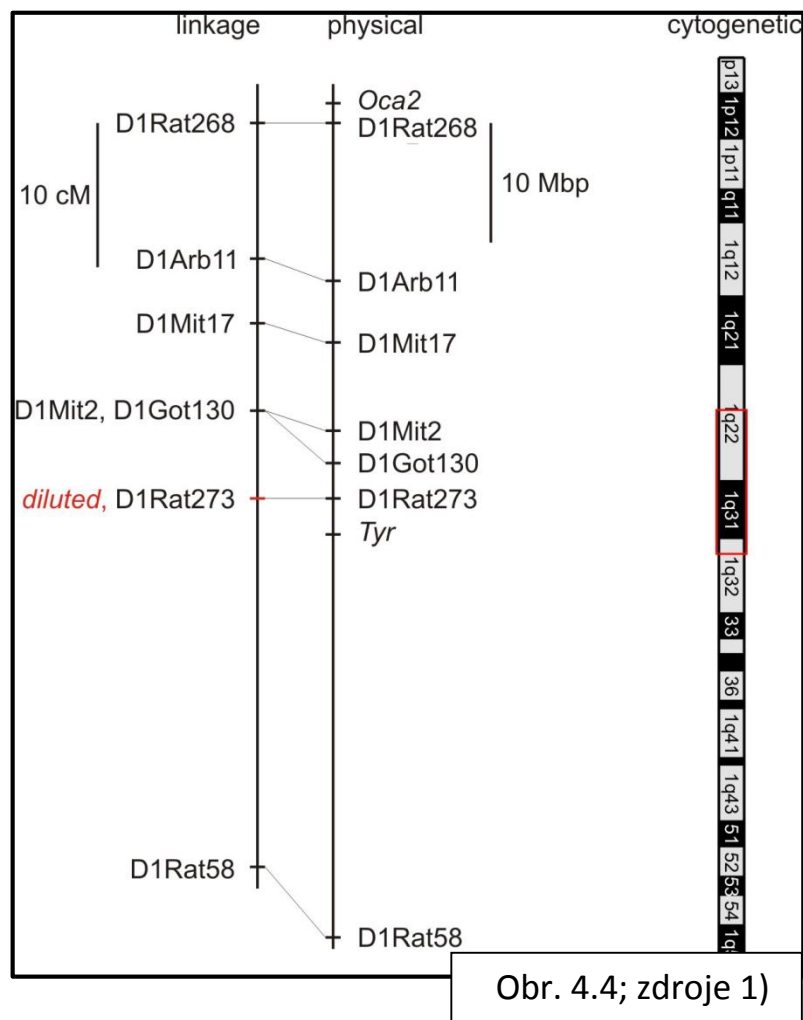
Tab. 1; zdroje 3)

Z dat uvedených v tabulce je možné pozorovat vzrůstající LOD skóre a snižující se podíl rekombinantů u sekvencí blíže k genu *dilution*. STS D1RAT273 nemá žádného rekombinanta, což znamená, že mezi ním a genem *dilution* je tzv. úplná vazba.

To nám potvrdilo fakt, že se gen nachází opravdu blízko STS D1RAT273 (chr1, 140644473-140644634 bp). Ve velké blízkosti k STS D1RAT273 (o 3Mbp pod ním) je také jeden z genů zmíněných v teoretické části práce – gen *TYR*, neboli *tyrosinase* gene (chr1, 143641257-143746315 bp).

Dle uvedených výsledků jsme dospěli k závěru, že hledaný gen *dilution* se nachází mezi STS D1GOT130 a D1RAT58, tedy v sekvenci 137684450-177328929 bp chr. 1.

Na následující vazební mapě je znázorněn vztah mezi fyzickou pozicí STS (vpravo), ta byla známá už dopředu, a genotypovou pozicí (vlevo) vytvořenou podle podílu rekombinací mezi jednotlivými STS. Levá část je tvořena na základě 3. Morganova zákona o dědičnosti, který říká, že frekvence crossing-overu je přímo úměrná vzdálenosti genů. Na základě podílu crossing-overů (rekombinací) tak lze vytvořit genetickou mapu, která má stejné pořadí genů jako fyzická mapa. Jednotkou této genetické mapy nejsou páry bazí, ale centimorgany, přičemž u savců platí přibližný vztah, že 1 cM \approx 1 Mbp.



5 Diskuse

Velké množství genů ovlivňujících zbarvení kůže a srsti se nachází jak v potkaním, tak v lidském genomu. Většina z nich může být svojí funkcí mezidruhově shodná a lišit se svým umístěním v genomu. Shoda protein kódující sekvence DNA mezi člověkem a potkanem se pohybuje kolem 80%, funkčně jsou lidské a potkaní proteiny často zaměnitelné.

S velkou pravděpodobností je tomu tak i v případě problematiky řešené v této práci, tedy u světlého zbarvení potkanů kmene CHOCO. Na základě pozorovaných výsledků bylo totiž zjištěno, že „gen *dilution*“, což je pracovní název hledaného genu, se nachází v sekvenci DNA dlouhé přibližně 39,64 Mbp, ve které je zároveň umístěn gen *TYR*.

Výsledek by mohl být upřesněn ohraničením genu *dilution* bližšími STS. Tím by se buď potvrdilo, že světlou barvu potkaního kmene CHOCO způsobuje mutace genu *TYR*, nebo by se zjistilo, že je tento úkaz způsobený jiným genem ve zjištěné sekvenci. Časová tíseň ale nedovolila toto dokončení, proto bude další upřesňování provedeno v blízké budoucnosti týmem ÚBLG 1. LF.

Mutace genu *TYR* u člověka vede k omezení produkce enzymu tyrozinázy, který hraje zásadní roli v tvorbě melaninu. To, že je produkce tyrozinázy takto změněna, vede k albinismu typu I., tedy k OCA1. Samotný albinismus OCA1 má dvě varianty. OCA1a způsobuje, že tělo postiženého jedince není schopno vytvářet po celý život ani malé množství melaninu, což je nazýváno úplným albinismem (amelanismus). Mírnější varianta OCA1b omezuje produkci melaninu na velmi nízkou hodnotu a způsobuje tak částečný albinismus (hypomelanismus).

Tento objev by mohl mít využití na poli genetického inženýrství a medicíny. Předkládá totiž potkaní kmen CHOCO jako vhodný modelový organismus k testování albinismu typu I., jeho důkladnému prozkoumání. Může to být jeden krok na cestě k léčbě těchto typů albinismu (OCA1a i OCA1b), jimiž trpí asi jeden člověk ze 40 000³.

³ Oculocutaneous albinism. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [online]. 17.2.2016 [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Oculocutaneous_albinism

Závěr

V této práci se nám úspěšně podařilo splnit všechny předem vytyčené cíle. V teoretické části byly popsány genetické mechanismy vedoucí ke světlému zbarvení u lidí a ostatní témata s tím související. Praktická část byla zdařilá především v tom, že se nám podařilo určit oblast, ve které se nachází gen způsobující světlou barvu srsti potkanů kmene CHOCO.

Práce může mít význam pro další zkoumání albinismu a hypomelanismu, protože předkládá potkaní kmen CHOCO jako vhodný modelový organismus k testování albinismu OCA1 a dává příležitost k prozkoumání regulačních mechanismů genu *TYR*, které OCA1 způsobuje.

Slovníček pojmů a zkratek

absorbance – bezrozměrná veličina popisující množství světla pohlceného měřeným vzorkem (během spektrofotometrie)

agar – přírodní polysacharid se schopností tvořit gelovou strukturu

agaróza – součást agaru, uplatňuje se při agarózové elektroforéze

akrylamid – organická chemikálie obsahující amidovou NH_2 skupinu, jeho polymerací v kombinaci s bisakrylamidem vzniká gel se síťovitou strukturou

alela – konkrétní forma genu, gen může mít jednu nebo více forem, obvyklé jsou dvě formy jednoho genu – dominantní a recesivní, v případě, že má gen dominantní i recesivní formu, projeví se ta dominantní

aminokyseliny, AMK – organické látky obsahující NH_2 skupinu a COOH skupinu; skládají se z nich bílkoviny

amplifikace – děj vedoucí k získání mnohonásobného množství kopií výchozího úseku DNA

apoptóza – buněčná smrt

APS, Ammonium persulfate - syntetická sloučenina, u polyakrylamidové EF zachytává volné radikály

backcross – „zpětné křížení“, křížení jedince parentální a filiální generace

betain – chemikálie, která zlepšuje výsledky PCR a udržuje pH celého roztoku

bílkovina, protein – řetězec aminokyselin propojených peptidickou vazbou, základní stavební jednotka živých organismů

BN – „brown norway“, potkaní kmen s tmavou barvou srsti

depigmentace – částečné či úplné odbarvení tkáně kvůli nedostatku/absenci pigmentu

DNA, deoxyribonucleic acid – nositel genetické informace organismů

dvoušroubovice – prostorová formace, ve které se DNA obvykle nachází, jde o spojení dvou vláken DNA vodíkovými můstky

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid – chemikálie inhibující DNázy – enzymy rozkládající DNA

EF, elektroforéza - analytická metoda využívaná k separaci makromolekul

enzymy – biologické katalyzátory spouštějící a zesilující chemické reakce

epitel – buněčná tkáň kryjící vnitřní a vnější povrchy organismu

gen – konkrétní úsek DNA se specifickou funkcí

genom – celková genetická informace jednoho organismu

Golgiho aparát – buněčná organela s funkcí transportu a úpravy bílkovin

heterozygot – jedinec, jehož genotyp je v daném lokusu tvořen jednou dominantní a jednou recesivní alelou

histony – krátké bílkoviny, kolem nichž se obtáčí dvoušroubovice DNA

homozygot - jedinec, jehož genotyp je v daném lokusu tvořen dvěma dominantními alelami (dominantní homozygot), nebo dvěma recesivními alelami (recesivní homozygot)

hormon – látka, která v těle působí jako biokatalyzátor, má specifický účinek na určité fyziologické pochody

hydroxylace – reakce, kdy se na výchozí látku napojuje OH skupina

hypofýza – žláza s vnitřní sekrecí

CHOC – „choco“, potkaní kmen se světlou barvou srsti

chromozomy – menší části genomu, člověk má celkem 23 párů chromozomů, z toho jeden pár pohlavních chromozomů XX (ženské pohlaví) nebo XY (mužské pohlaví); potkaní genom má 20 nepohlavních a jeden pohlavní pár

keratin – stavební protein, vzniká v rohovatějících buňkách na povrchu pokožky

keratinizace – proces rohovatění buněk na povrchu pokožky

kresolová červeň – barvivo pro zvýraznění vzorků, se kterými se pracuje

LOD skóre – statistická hodnota (aplikovatelná v genetice), určující pravděpodobnost, s jakou je výsledek správný

lokus – specifické umístění genu na chromozomu

melanin – pigmentové barvivo, hnědý a černý eumelanin a feomelanin

melanocyt – buňka, ve které je melanin tvořen

melanogeneze – děj, během kterého je melanin vytvářen

melanozom – organela, ve které melanin putuje z centra melanocyту dál do dendritů buňky

monochromátor – přístroj, který dělí světlo a propouští jen úzkou část spektra

mutace – změna genetické informace v konkrétní oblasti

nukleotidy – malé jednotky spojených sacharidů a dusíkatých bází, jejich přesným řazením za sebou vzniká vlákno DNA, nebo RNA

oxidace – reakce, změna -OH skupiny na skupinu =O

PCR, polymerázová řetězová reakce – metoda amplifikace daného úseku DNA

peptidy – organické sloučeniny, jako proteiny jsou tvořeny AMK, ale jsou kratší

pigment – chemická látka, která v buňce způsobuje změnu zbarvení

plazmatická membrána – obal buňky ohraničující vnitřní prostředí buňky

polyakrylamid – polymer akrylamidu (může být kombinován s bisakrylamidem)

primer – velmi krátká sekvence DNA, u PCR na něm polymeráza začíná přidávat nukleotidy

receptory – bílkoviny umístěné na plazmatické membráně, přijímají signál tím, že se na ně naváže hormon a spustí změnu daných fyziologických dějů

rekombinant – jedinec, který se v určitém úseku DNA neshoduje se sledovaným fenotypem

RNA, ribonucleic acid – nukleová kyselina tvořená vláknem ribonukleotidů

spektrofotometr – přístroj sloužící k měření koncentrace roztoku pomocí světla

STS – „sequence-tagged site“, krátká sekvence DNA, která se v celém genomu vyskytuje pouze jednou a její pozice je nám známá; u PCR ohraničena primery

TBE – směs chemických látek (tris, kyselina boritá a EDTA), které dohromady tvoří vhodné prostředí pro EF

TEMED, tetramethylethylendiamid – katalyzátor polymerace akrylamidu

tepelný cykler – přístroj, schopný měnit v krátkém časovém úseku teplotu

žebříček – směs různě dlouhých fragmentů, pomáhá při detekci gelu

Zdroje

Tabulky:

- 1) na základě informací z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Melanin>
- 2) vlastní zdroje viz Přílohy - CHOCxBN_results – All_Markers
- 3) vlastní zdroje viz Přílohy - CHOCxBN_results – CHR1_Markers

Obrázky:

1. vlastní zdroje
2. <http://healthfavo.com/melanocytes.html>
3.
 - a. <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02102623&country=56>
 - b. <http://www.pillscout.com/2015/07/13/l-tyrosine-vs-nalt-best/>
 - c. <https://dcadmh-loosescrews.wikispaces.com/3.+Drug+Therapy+-+L-Dopa>
4.
 - a. <https://dcadmh-loosescrews.wikispaces.com/3.+Drug+Therapy+-+L-Dopa>
 - b. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dopaquinone.svg>
5. <http://www.intechopen.com/books/ophthalmology-current-clinical-and-research-updates/application-of-electron-paramagnetic-resonance-spectroscopy-in-ophthalmology>
6. http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry
7. https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction#/media/File:Polymerase_chain_reaction.svg
8. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16500500>
9. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agarose_Gel,_with_Comb_inserted,_in_a_Gel_Tray_\(Front,_angled_view\)_-_SketchUp.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agarose_Gel,_with_Comb_inserted,_in_a_Gel_Tray_(Front,_angled_view)_-_SketchUp.png)
10. <http://studentreader.com/lod-score/>

Zdroje informací:

- 1) Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2015, xxxi, 680 stran. ISBN 978-80-247-4867-2.
- 2) *Lidské tělo: Srozumitelný a zevrubný průvodce po strukturách a funkcích lidského organismu*. 3.vyd. Bratislava: Gemini, 1993, 336 s. ISBN 80-716-1049-6.
- 3) Melanogenesis – Homo sapiens (human). *Kegg Pathway*. [online]. 23.10.2015 [cit. 2016-01-01]. Dostupné z: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=hsa04916&show_description=show
- 4) Gelová elektroforéza. *Molekulární biologie*. [online]. 2011 [cit. 2016-01-01]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
- 5) *GeneCards*. [online]. 1996-2016 [cit. 2016-01-01]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/>
- 6) OCA2. *Genetics home reference*. [online]. 10. 2015 [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/OCA2>
- 7) *Wikipedia, The Free Encyklopedia*. [online]. 6. 1. 2001 [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki>
- 8) *Wikipedie, otevřená encyklopedie*. [online]. 14. 11. 2002 [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki>
- 9) Karaman, Ali. (2008). Oculocutaneous albinism type 1A: A case report. *Dermatology Online Journal*, 14(11). Retrieved from: <http://escholarship.org/uc/item/1w92n374>
- 10) TYR. *Genetics Home Reference* [online]. 2016 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene=TYR>