

Molekulární genetiká zvířat 5
Antonín Stratil

Česká zemědělská univerzita v Praze

Osnova

Kandidátní geny

Příčinné geny

Gen RYR1 prasete

Gen IGF2 prasete

Gen PRKAG3 prasete

Gen MSTN skotu

Defekt adherence leukocytů

Komplexní vertebrální malformace

Lokus CLPG u ovcí

Genetické aspekty produkce masa

Genetické aspekty produkce mléka

Gen DGAT1 skotu

Efekty genotypů mléčných proteinů

Gen NHEJ1 u psů

Genomický imprinting

Inaktivace X chromozómu

Zjišťování pohlaví u zvířat

Geny pro reprodukci (BMPR1B; BMP15; QTL)

Priony. BSE

Imunogenetika

Imunita

- Imunoglobuliny

Domény imunoglobulinových řetězců

Komplexní geny

- Hlavní histokompatibilitní komplex

- Krevněskupinové antigeny

Mapování QTL

- Celogenomová analýza
- Není potřebná znalost funkce
- Testování velkého počtu márkřů
- Stanovit vysoké prahy statistické významnosti
- Neidentifikuje přímo kandidátní nebo příčinný gen

Kandidátní geny

Výhody:

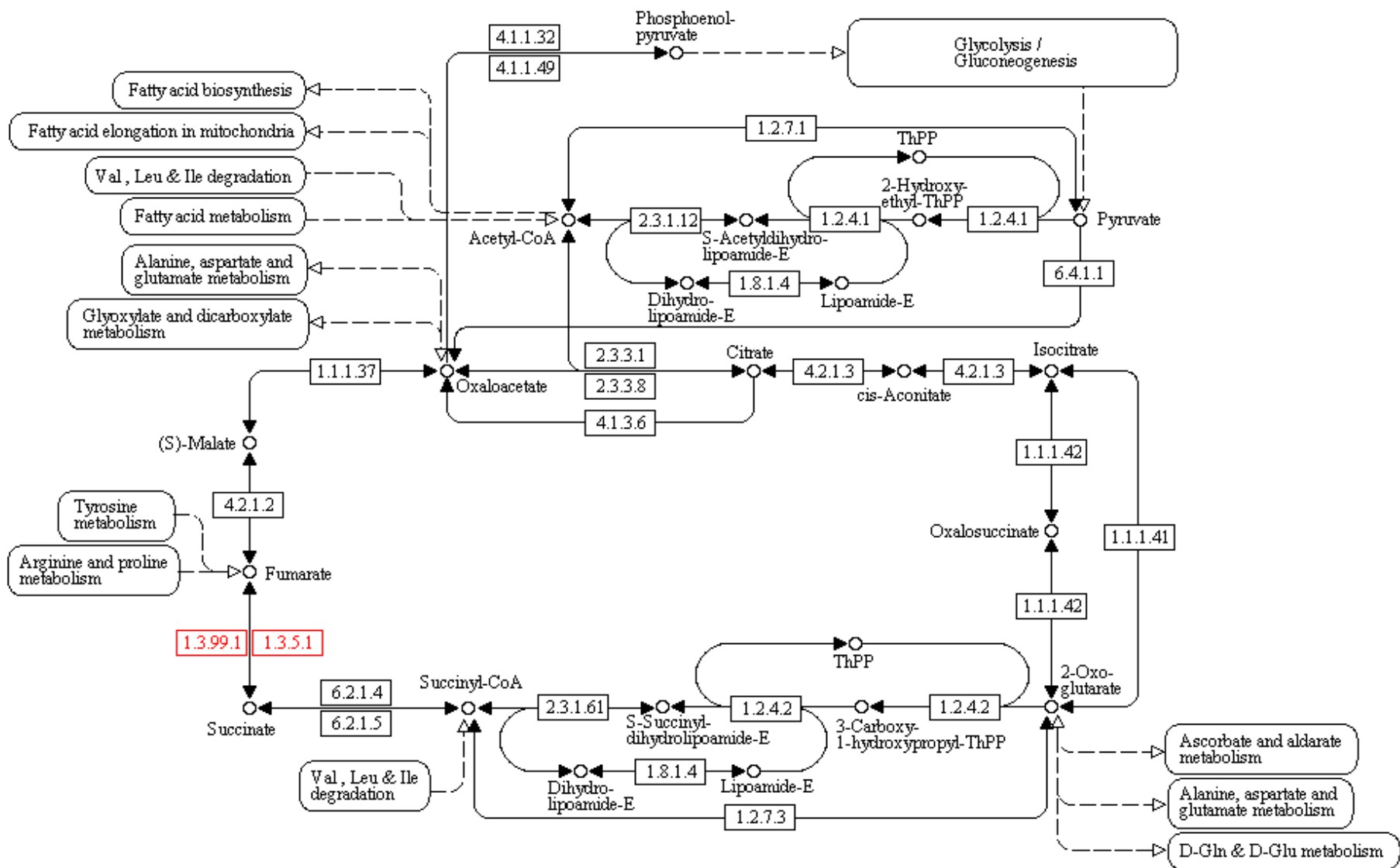
- Není potřeba testovat příliš mnoho márkřů (testuje se jeden gen)
- Identifikace příčinné alely umožňuje přímé a jednoduché využití v selekci

Kandidátní geny

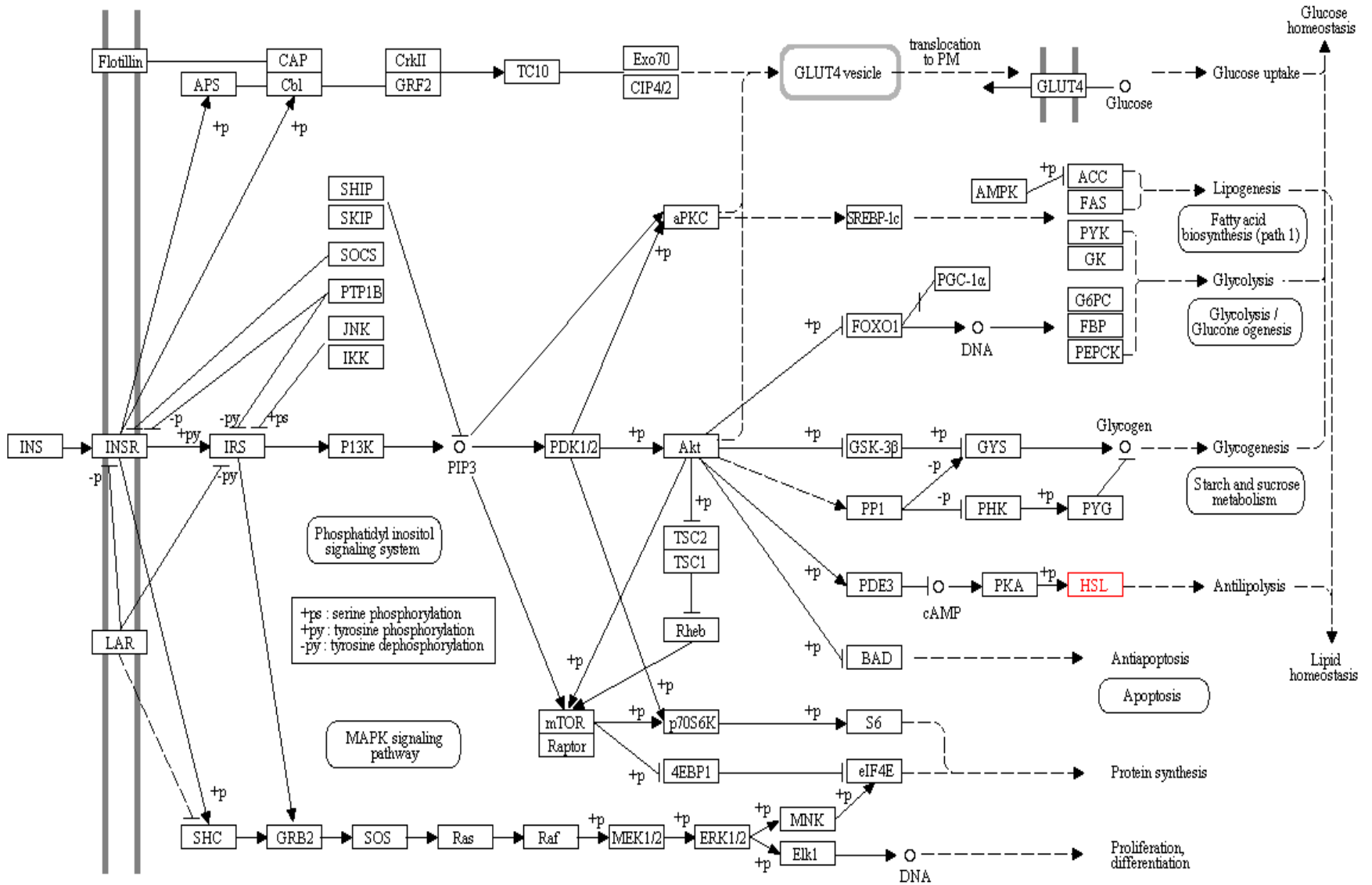
Nevýhody:

- Vyžaduje dobrou znalost biologie
- Mnoho genů je neznámých
- Asociace mezi určitou alelou a užitkovým znakem nedokazuje příčinný vztah

CITRATE CYCLE (TCA CYCLE)



INSULIN SIGNALING PATHWAY



Příklady kandidátních genů u prasete

Gen	Název	Asociace
<i>ESR1</i>	Estrogenový receptor 1	Reprodukce
<i>PIT1</i>	Hypofyzární transkripční faktor	Růst a reprodukce
<i>MYOG</i>	Myogenní transkripční faktor	Myogenesa; produkce masa
<i>MYOD1</i>	Myogenní transkripční faktor	Myogenesa; produkce masa
<i>MYF5</i>	Myogenní transkripční faktor	Myogenesa; produkce masa
<i>MYF6</i>	Myogenní transkripční faktor	Myogenesa; produkce masa
<i>LEP</i>	Leptin	Žravost, obezita, reprodukce
<i>LEPR</i>	Receptor pro leptin	Reprodukce
<i>FABP3</i>	Protein vázající mastné kyseliny, srdeční forma	Intramuskulární tuk
<i>A-FABP</i>	Adipocytární protein vázající mastné kyseliny	Intramuskulární tuk
<i>GH1</i>	Růstový hormon	Růst a masná užitkovost
<i>SPP1</i>	Osteopontin	Reprodukce

Kandidátní geny asociované se znaky reprodukce u prasat

Candidate genes with association to reproductive traits in pigs

Gene	SSC	Polymorphism	Breed/crossbreeding ^a	No. of genotyped pigs	Trait ^b	References
ESR	1	Intron ^c	(M × SL); LW	161 and 1079 ^d	TNB, NBA	Rothschild et al. (1997)
		No information	LW	4262	TNB, NBA, Teat number	Short et al. (1997)
		No information	CB	262	TNB, NBA	Chen et al. (2000)
		Intron	(M × LW)	275	TNB, NBA	Van Rens et al. (2003)
		No information	LW	74 and 124 ^d	TNB, NBA	Matoušek et al. (2003)
		No information	LW	1030	TNB, NBA	Goliášová and Wolfová (2005)
		No information	LW	226	TNB, NBA	Horogh et al. (2005)
		Exon 8	Lr; SL	144	NBA	Depuydt et al. (1997)
PRLR	16	No information	LW	400	NBA	Vincent et al. (1998)
		No information	M, Lr	261 and 416	TNB, NBA	Vincent et al. (1998)
		No information	SL	273	NBA	Drogemuller et al. (2000)
		No information	(M × LW)	77	Age of puberty, TNB, NBA	Van Rens and Van Rens (2003)
		Exon ^e	(M × LR)	55	Ovulation rate, Uterine length	Van Rens et al. (2003)
FSHb	2	Intron	(YS × EL)	289	TNB, NBA	Li et al. (1998)
		Promotor	LP; DP; Lr	No information	Litter size	Du et al. (2002)
RBP4	14	Intron	SL	1300	TNB, NBA	Rothschild et al. (2000)
GNRHR	8	3'UTR	(M × LW)	200	Ovulation rate	Jiang et al. (2001)
LEP	18	Exon 3 ^f	SL	519	>1 litter TNB, NBA	Korwin-Kossakowski et al. (2004a)
		Exon 3	Ys; Lr	62 and 170	Litter size, 1–4 parity	Chen et al. (2004b)
		Intron 1	Du	246	1 litter	Chen et al. (2004b)
LEPR	6	Intron 2, Exon 2, Exon 18	Ys, Du	62 and 246	Litter size, 1–4 parity	Chen et al. (2004a)
OPN ^g	8	Intron	SL	519	>1 litter, TNB, NBA	Korwin-Kossakowski et al. (2004a)
BF	7	Intron 1	(LW × Lr) × Lc	123	TNB, NBA, 2–4 parity	Buske et al. (2005)
FUT1	6	Exon 2	PBP	104	TNB, NBA, 1–6 parity	Horák et al. (2005)
EPOR	2	Intron 4	(Ys × Lr × CW × LW)	402	Uterine capacity	Vallet et al. (2005)

^a CB = Chinese breeds, CW = Chester White DP = Duli pigs, Du = Duroc, EL = Erhualian line, Lc = Leicoma, LP = Laiwu pigs, Lr = Landrace, LW = Large White, M = Meishan, PBP = Preštica Black-Pied, SL = Synthetic line, Ys = Yorkshire.

^b TNB = total newborn, NBA = newborn alive.

^c Personal communication by M. Rothschild in Van Rens et al. (2002).

^d Two investigations.

^e Personal communication by M. Rothschild in Van Rens et al. (2003).

^f In Chen et al. (2004b).

^g OPN = SPP1.

Asociační studie

ESR1 (estrogen receptor 1) (Rothschild *et al.*, 1996)

Prasnice s 50% podílem Meishana:

první vrhy - navíc 2,3 selete

všechny vrhy - navíc 1,5 selete

pozitivní efekt alely *B* (homozygoti)

metoda: RFLP - *PvuII*

Prasnice Large White – homozygoti *BB* - 1 sele navíc

V dalších pracích (např. Short *et al.*, 1997) efekt alely *B* byl 0,3 – 1,4 selete

(na kopii alely *B*).

V jiných pracích efekt alely *B* nebyl, nebo byla výhodnější alela *A*
(např. Goliášová a Wolf, 2004)

První vrhy *AA* prasnice o 0,5 selete více než prasnice *BB*

Všechny vrhy *AA* prasnice o 0,25 selete více než prasnice *BB*

- nejedná se zřejmě o příčinnou mutaci, ale o genetickou vazbu,
- mezi *ESR* a příčinným genem není těsná vazba,
- vyskytující se rekombinace mohou ovlivnit výsledek asociace,
- úloha genetického pozadí na expresi ?

Příklady příčinných genů

Druh	Znak	Gen
Prase	<p>Maligní hypertermie Zmasilost Obsah glykogenu ve svalech Vnímavost na infekci <i>E. coli</i> Hypercholesterolemie Biosyntéza vitamínu C Dominantní bílé zbarvení Zbarvení</p>	<p><i>RYR1 (CRC)</i> <i>IGF2</i> <i>PRKAG3</i> <i>FUT1</i> <i>LDLR</i> <i>GULO</i> <i>KIT</i> <i>MC1R</i></p>
Skot	<p>Svalová hypertrofie Křehkost masa Defekt adherence leukocytů (BLAD) Komplexní vertebrální malformace (CVM) Deficience uridinmonofosfátsyntázy (DUMPS) Deficience kyselá alfa-glukozidázy (Pompeho choroba) Zápach mléka Zbarvení srsti</p>	<p><i>MSTN</i> <i>CAPN1</i> <i>CD18</i> <i>SLC35A3</i> <i>UMPS</i> <i>AAG</i> <i>FMO3</i> <i>MC1R</i></p>
Ovce	<p>Svalová hypertrofie (callipyge) Plodnost, ovulace (booroola) Plodnost, ovulace (inverdale)</p>	<p><i>CLPG</i> <i>BMPR1B</i> <i>BMP15</i></p>
Kůň	<p>Hyperkalemická periodická paralýza (HYPP) Těžká kombinovaná imunodeficience (SCID) Zbarvení</p> <p>Bílé zbarvení; megacolon</p>	<p><i>SCN4A</i> <i>DNA-PK</i> <i>MC1R</i> <i>ASIP</i> <i>MATP</i> <i>EDNRB</i></p>
Kur	<p>Albinismus Zbarvení peří Dominantní bílé zbarvení</p>	<p><i>TYR</i> <i>MC1R</i> <i>PMEL17</i></p>



ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS (OMIA)

compiled by **F.W. Nicholas**

Reprogen, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, NSW 2006, Australia. email: frankn@vetsci.usyd.edu.au

Latest update: 16th October 2003

[SEARCH THE ENTIRE DATABASE](#)

SUMMARY OF DATABASE CONTENTS FOR MAJOR SPECIES

	Cat	Cattle	Chicken	Dog	Emu	Fox	Goat	Horse	Pig	Quail	Rabbit	Sheep	Turkey	TOTAL
Disorders/traits	263	357	174	451	4	5	66	184	203	34	48	179	28	1996
Single-locus disorders/traits	38	56	63	100	2	3	8	26	33	19	12	59	8	427
Disorders/traits for which the causative mutation has been identified at the DNA level	7	27	11	38	1	2	5	9	11	2	3	9	1	126
Potential animal models for a human disorder	123	117	34	207	2	3	24	86	65	9	27	62	3	762

[List of all 206 species in the database](#) [Genetic map references \(by species\)](#)

Examples of how to format search queries for items on these lists are available [here](#).

[Disorders/traits with a known gene/peptide](#) [Inborn errors of metabolism](#) [Lysosomal storage diseases](#) [Inherited bleeding disorders](#)

[Congenital heart diseases](#) [Dwarfism](#)

SEARCH THE ENTIRE DATABASE:

Enter your query into the input boxes below. Terms in boxes are joined by **AND** or **OR**. You may narrow your search by [Field Restrictions](#).

Additional help is available [here](#).

Gen *RYR1* (*HAL*; *CRC1*) prasete

(kanál uvolňující vápník v sarkoplazmatickém retikulu - *CRC*)

SSC6; bodová mutace – záměna jedné báze (1843C>T)
autozomální recesivní dědičnost citlivosti k halotanu

1966 – objev maligní hypertermie u prasat (Hall et al.)

citlivost k halotanu

asociace Hal s kvalitou masa a PSS

dědičnost citlivosti k halotanu

průkaz genetické vazby lokusu *HAL* s geny *PHI*, *EAH*, *EAS*, *PGD*
a *AIBG*

haplotypování – stanovení genotypu v *HAL* lokusu pomocí
vázaných genů

lokalizace na chromozómu 6 prasete

průkaz homologie mezi segmentem chromozómu 19 člověka, kde
je lokalizovaný gen *RYR1*, a segmentem chromozómu 6 prasete
rozdíly v peptidových mapách proteinu RYR1 mezi prasaty
náchylných k maligní hypertermii a normálními

1991 – identifikace mutace (C – T) v genu *RYR1* prasete, v poloze

1843 (CC – homozygot *NN*; TT – homozygot *nn* =
citlivost ke stresu)

záměna aminokyseliny (argininu – cysteinem) (Fujii et al.)

Testování: PCR-RFLP (134 bp fragment se štěpí *HhaI*: alela *C* (*N*) – 84+50 bp;
alela *T* (*n*) – 134 bp

Pleiotropní efekt na komplexní znaky – zvířata *nn* mají
vyšší podíl libového masa

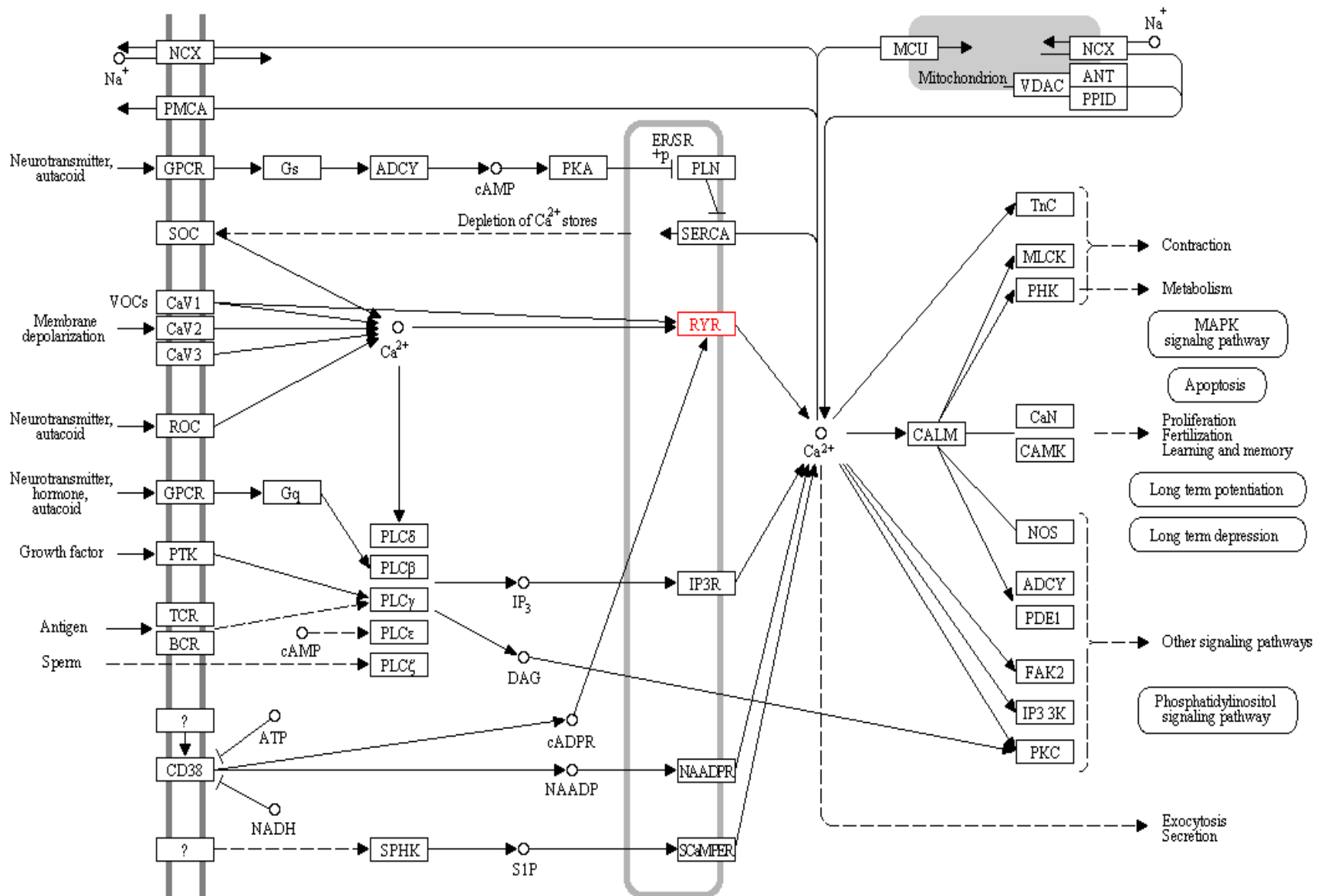
Vliv genotypů v genu *RYR1* (*HAL*) na znaky masné užitkovosti a kvality masa u prasat

Table 1.11. Lean growth and meat quality characteristics (mean \pm SD) in Piétrain crossbreds of different halothane genotypes (Giesel, 1997).

Trait	Genotype		
	NN	Nn	nn
Lean meat (%)	49.9 ^a \pm 3.3	52.8 ^b \pm 3.3	57.0 ^c \pm 4.5
Loin area (cm ²)	32.2 ^a \pm 2.9	34.4 ^b \pm 2.8	36.5 ^c \pm 2.6
Intramuscular fat (%)	2.1 ^a \pm 0.8	2.0 ^a \pm 0.9	1.6 ^b \pm 0.5
Reflectance (%) [*]	28.4 ^a \pm 5.3	29.1 ^{ab} \pm 10.6	35.0 ^b \pm 10.2
pH 45 min post mortem [*]	6.43 ^a \pm 0.43	5.91 ^b \pm 0.39	5.58 ^c \pm 0.32
Conductivity (mS/cm) [*]	3.37 ^a \pm 0.62	4.29 ^{ab} \pm 2.29	15.49 ^b \pm 9.61
Fibre diameter (μ m) [*]	74.2 ^a \pm 8.7	85.8 ^b \pm 10.3	86.3 ^b \pm 10.2
Fibre number index ($\times 10^{-3}$) [*]	699.9 ^a \pm 172.1	563.0 ^b \pm 130.7	591.0 ^b \pm 131.1

NN, halothane-free ($n = 22$); Nn, halothane heterozygous ($n = 64$); nn, halothane homozygous ($n = 49$). ^{*}Longissimus muscle.

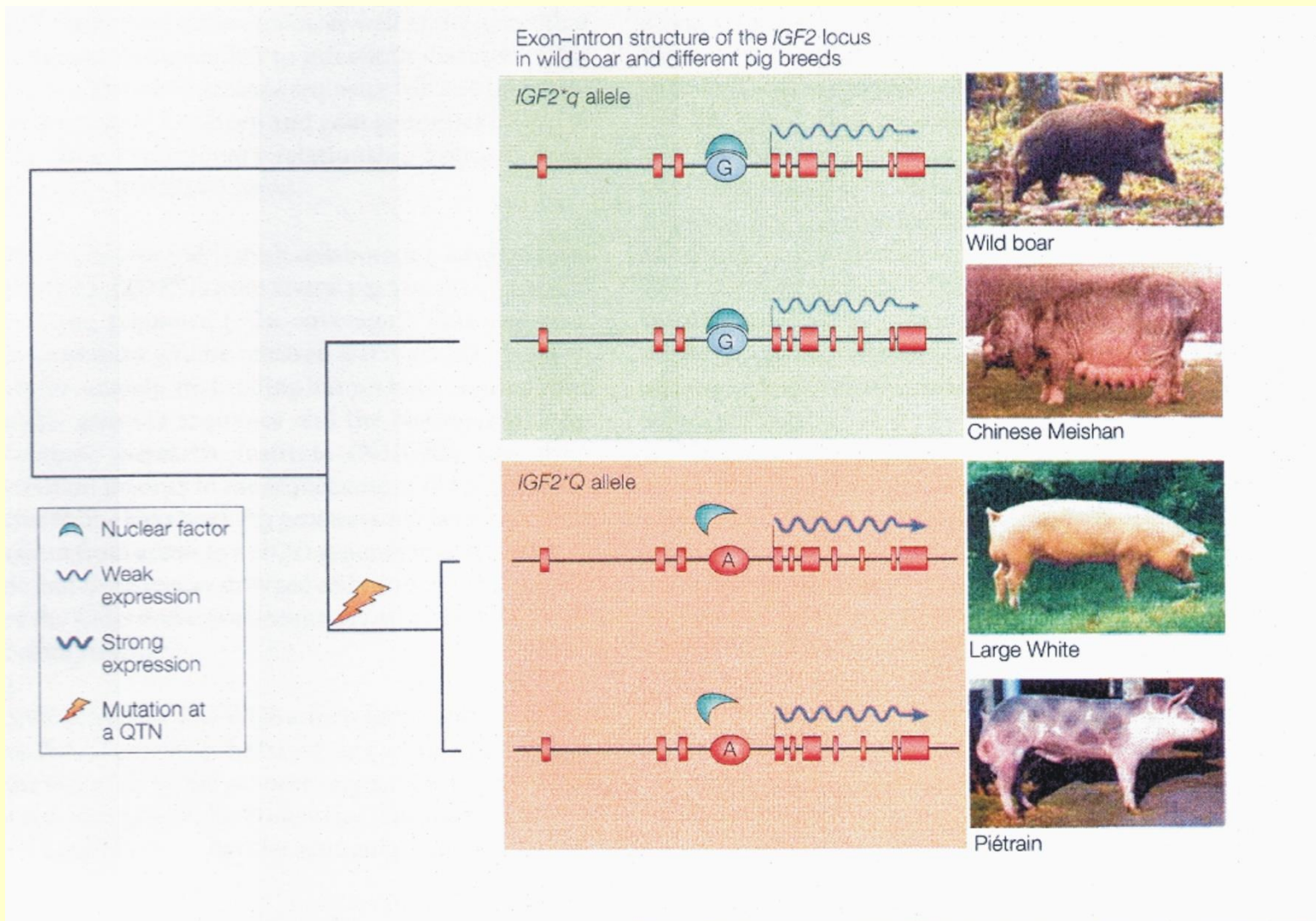
CALCIUM SIGNALING PATHWAY



Gen *IGF2* prasete

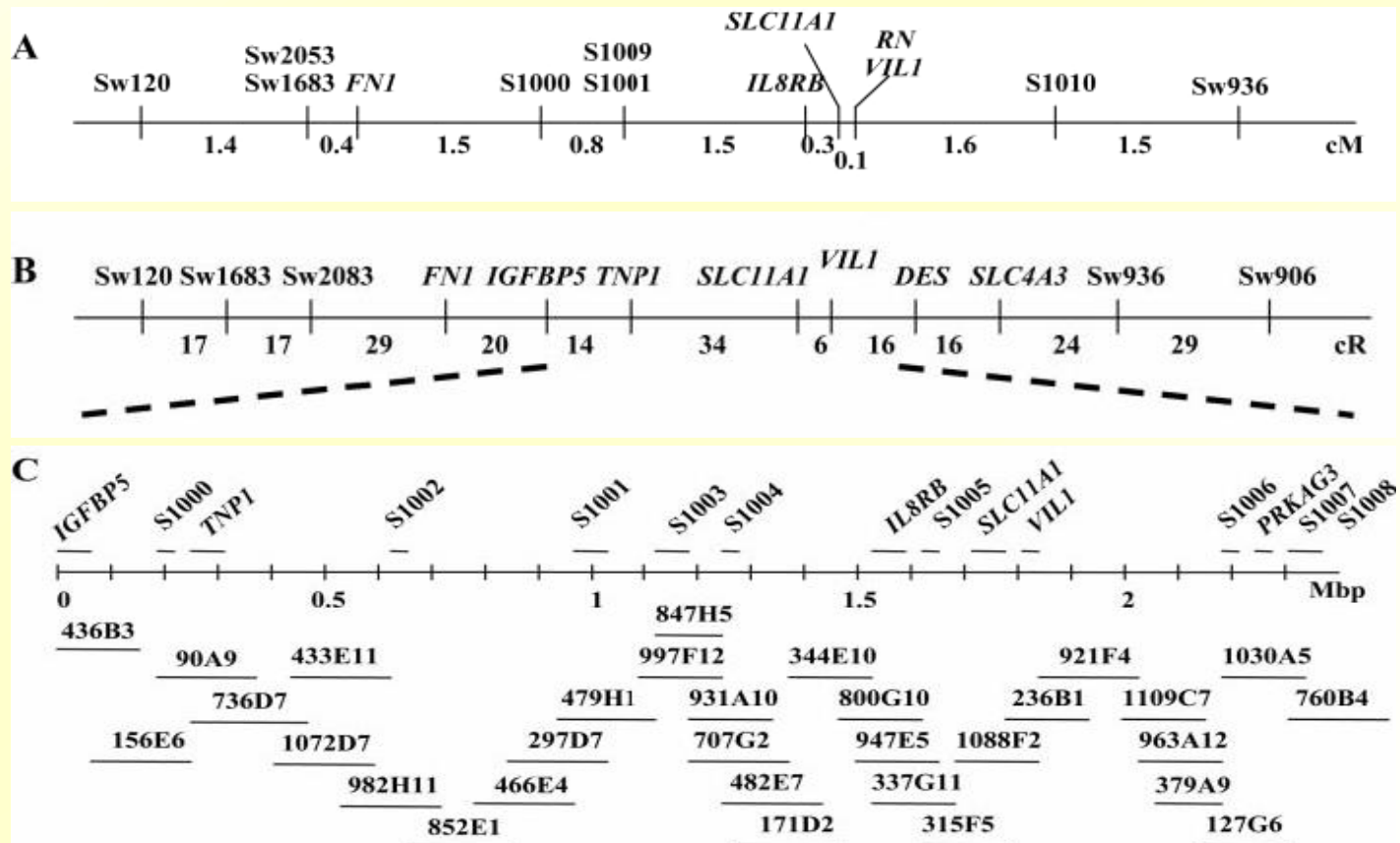
(Inzulin-like growth factor 2)

Paternálně exprimovaný QTL na p raménku chromozómu 2; 15 – 30% fenotypové variability podílu masitých částí a 10 – 20% fenotypové variability výšky hřbetního tuku. Příčina: mutace v intronu 3 genu *IGF2* (3072G>A); regulační oblast



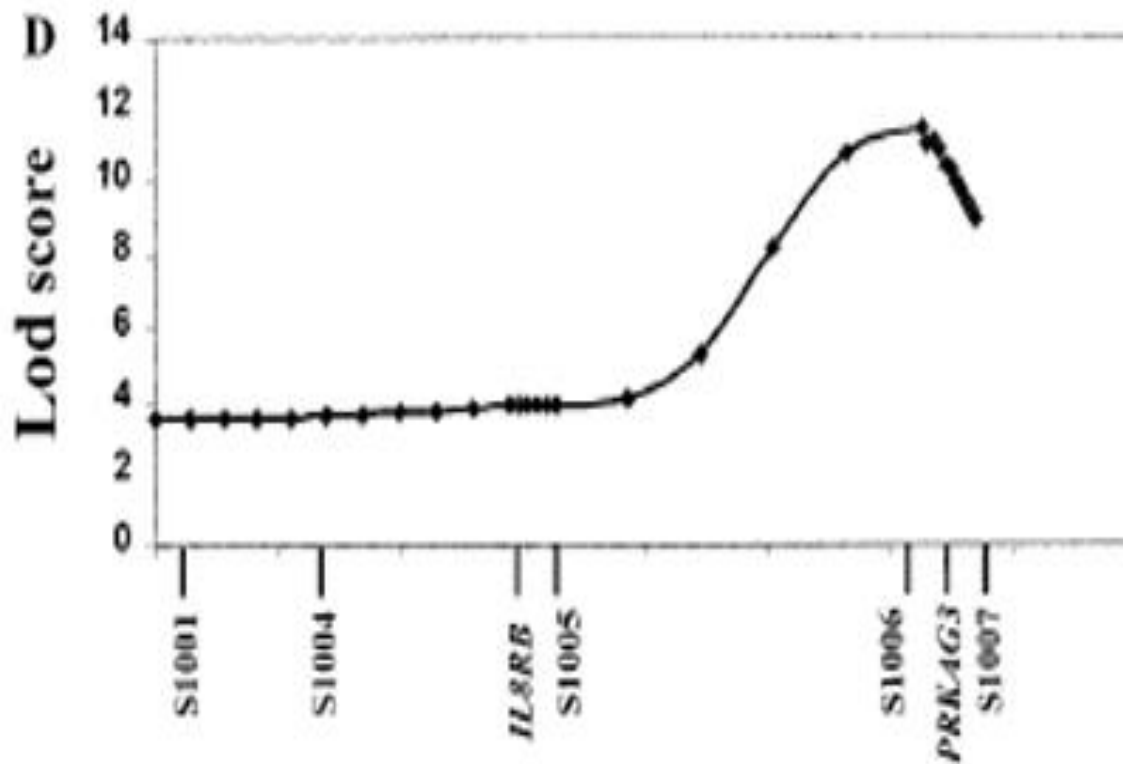
Genetická a fyzická mapa oblasti SSC15 vedoucí k identifikaci genu *PRKAG3* (ovlivňuje obsah svalového glykogenu; **autozomální dominantní dědičnost vysokého obsahu**; vysoký obsah – zhoršená výtěžnost a kvalita masa) (PRKAG3 - gama podjednotka AMP-aktivované proteinkinázy) (1. část)

- (A) Vazbová mapa se vzdálenostmi v centiMorganech (cM)
- (B) Radiační hybridní mapa se vzdálenostmi v centiRayích; je ukázáno pořadí orientačních markerů a je naznačena poloha dalších lokusů.
- (C) Vybrané klony z ~2,5 Mbp BAC kontigu na prasečím chromozómu 15 ukazující lokalizaci genů a genetických markerů.



Genetická a fyzická mapa oblasti chromozómu SSC15 vedoucí k identifikaci genu *PRKAG3* (2. část)

Vazbová nerovnováha mezi RN^- (vysoký obsah glykogenu) a alelami markerů zjišťovaná pomocí programu DISMULT na náhodném vzorku 91 prasat plemene švédský hampshire



Porovnání sekvencí v různých genotypech *PRKAG3*

Dominantní mutace *RN*⁻ = vysoký obsah svalového glykogenu
(kodon 200R>Q; báze G>A)

Table 1. Comparison of *PRKAG3* sequences with associated *m*⁺ and *RN*⁻ alleles in parentheses for different pig populations (37). D, Duroc; H, Hampshire; L, Landrace; LW, Large White; M, Meishan; WB, Wild Boar. The numbering of codons differs slightly from the one in Fig. 2A, which is based on a multiple sequence alignment. Dash indicates identity to the top sequence.

<i>PRKAG3</i> allele	Codon							Population
	30	53	193	194	199	200	372	
1 (<i>RN</i> ⁻)	ACC	CTC	GCC	CTG	GTC	CAA	TCT	H
	T	L	A	L	V	Q	S	
2 (<i>rn</i> ⁺)	---	---	---	---	---	-G-	---	L, LW, WB
	-	-	-	-	-	R	-	
3 (<i>rn</i> ⁺)	---	-C-	-T	T--	---	-G-	--C	H, L, LW, M, WB
	-	P	-	-	-	R	-	
4 (<i>rn</i> ⁺)	-A-	-C-	-T	T--	---	-G-	--C	D, H
	N	P	-	-	-	R	-	
5 (<i>rn</i> ⁺)	---	-C-	-T	T--	A--	-G-	--C	H, LW, WB
	-	P	-	-	I	R	-	

Gen *MSTN* u skotu

Myostatin; growth and differentiation factor 8; *GDF8*

(negativní regulátor růstu svalů)

delece 11 bp v exonu

chromozóm 2; autozomální recesivní dědičnost dvojitého osvalení
heterozygoti mají zvětšený m. longissimus dorsi a snížené množství podkožního a intramuskulárního tuku, a porody probíhají normálně

1997 – identifikována delece 11 bp v exonu 3 u plemene belgické modrobílé

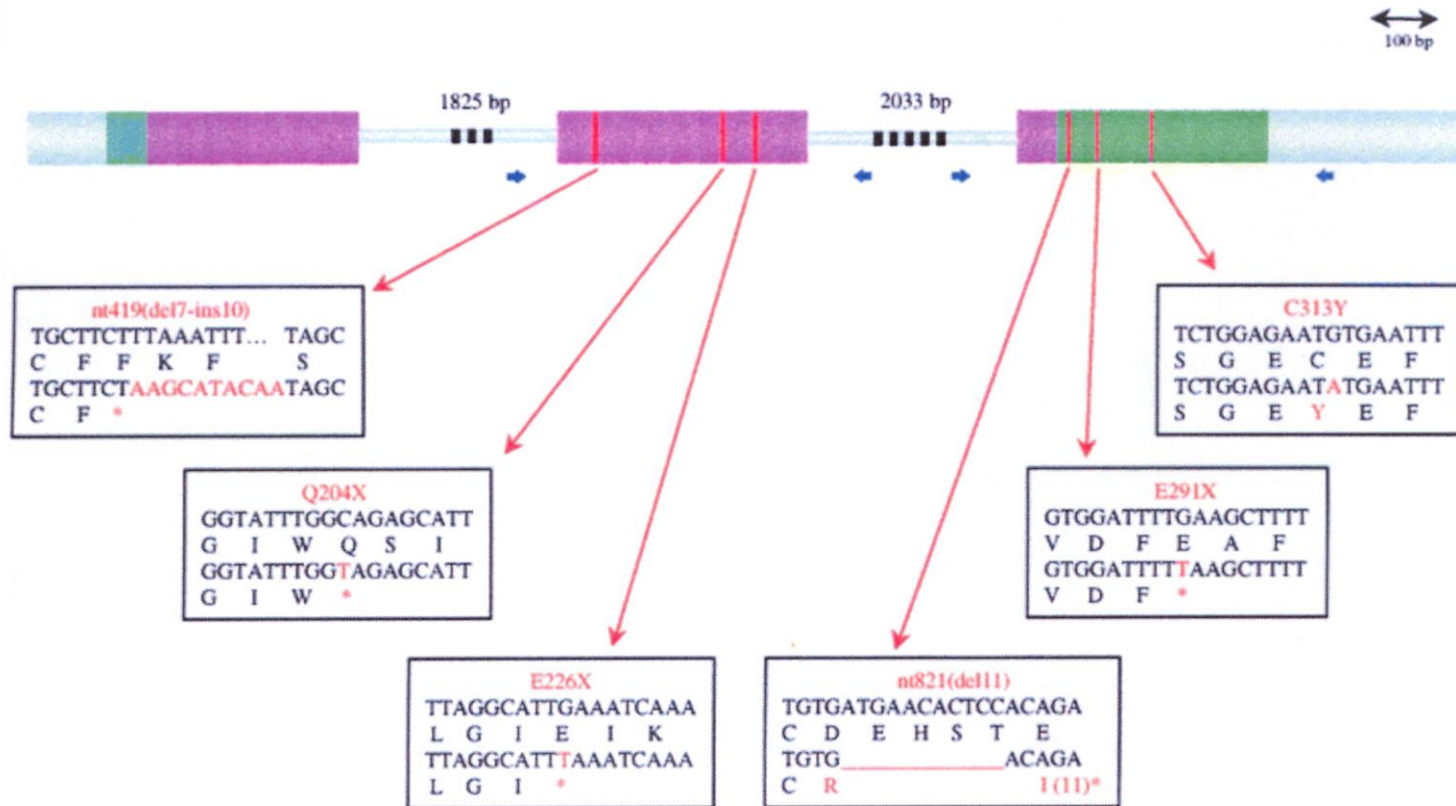
důsledek: posun fáze translace, předčasné ukončení a eliminace celé aktivní oblasti molekuly proteinu

důsledek pro fenotyp: výskyt dvojitého osvalení – vyšší masná produkce (o 20%) (hyperplazie i hypertrofie)

problémy: obtížné porody (dystocie; většinou císařským řezem), snížená plodnost, vyšší úhyn telat, zvýšená citlivost ke stresu

Mutace v genu *MSTN* (myostatin) skotu způsobující dvojité osvalení

Fig. 1 Schematic representation of the bovine myostatin gene. The grey boxes correspond to the untranslated leader and trailer sequences (large diameter), and the intronic sequences (small diameter). The blue, pink and green boxes correspond to the sequences coding for the leader peptide, N-terminal latency-associated peptide, and bioactive C-terminal domain of the protein, respectively. The blue arrows represent the two primer pairs used for multiplex amplification of exons II and III, respectively. The corresponding primer sequences are reported in Table 1. The positions of the six bovine loss-of-function mutations are shown as red lines on the myostatin gene. Each mutation is connected via an arrow with a box reporting the details of the corresponding DNA sequence and encoded peptide sequence. In each box the mutation is compared with the wild-type sequence, and differences highlighted in red.



Mutace v *MSTN* genu způsobující dvojité osvalení byly nalezeny u následujících plemen skotu: Belgian Blue (belgické modrobílé), Limousine, Parthenaise, Asturiana, Rubea Gallega, Gasconne, Piedmontese, Maine-Anjou, Charolais, Limousine a Marchigiana.

Blonde d'Aquitane typicky nemají mutace v *MSTN* – neidentifikované faktory pro hypertrofii?

Plemeno belgické modrobílé



Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) **(porucha adheze leukocytů skotu)**

u plemene holštýn

Gen: *ITGB2 (CD18)* (chromozóm 1)

produkt: beta-2 subjednotka integrinu

Příčinná mutace: 383A>G (v proteinu 128D>G)

BLAD je **autozomální recesivní genetická choroba**. Neutrofilly ztratily schopnost přilnout k endotelu a prostupovat do tkáně.

Projev onemocnění: Opakované bakteriální infekce, špatné hojení ran a mnoho dalších klinických příznaků (zápal plic, průjmová onemocnění, zakrslý vzrůst, zvýšený počet neutrofilů aj.)
Telata obvykle hynou během 2-4 měsíců po narození. Heterozygoti jsou klinicky normální; postižení jsou recesivní homozygoti.

BLAD byl identifikován v 80. letech. Příčinná mutace byla odhalena v roce 1992 (Schuster et al.). Původ defektu sahá k býkovi **Osborndale Ivanhoe** (otec holštýnského plemene), který byl široce využíván. Jedním z potomků je i **Carlin-M Ivanhoe Bell**, který je přenašečem defektní alely BLAD, a rovněž defektní alely pro CVM.

(v USA byl výskyt nositelů mutace 15% u býků v AI a 8% u krav)

Testování: PCR-RFLP

Podobný defekt se vyskytuje i u člověka (LAD) a u psů (CLAD)

PCR-RFLP BLAD

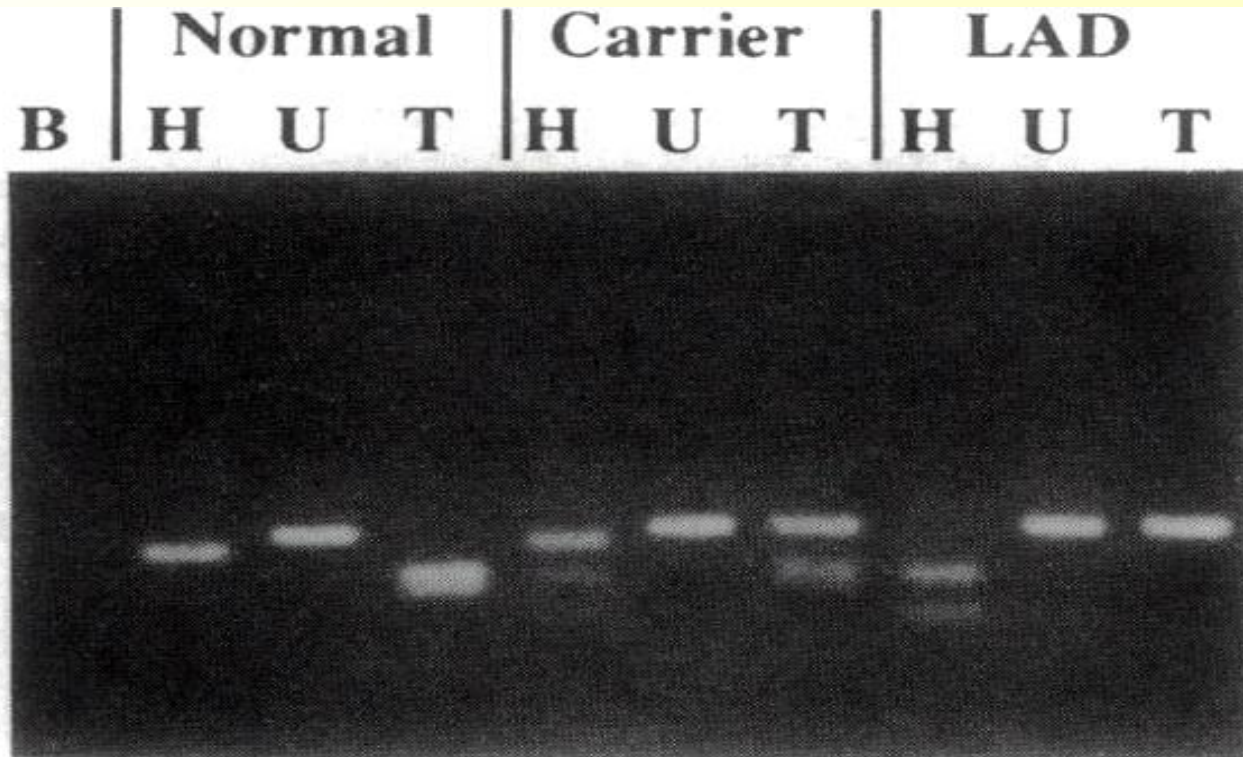


FIG. 3. Agarose gel electrophoresis of amplified DNA from normal, carrier, and LAD cattle following restriction enzyme digestion (B, amplification blank; H, *Hae* III; U, undigested; T, *Taq* I). DNA from normal cattle is digested by *Hae* III (at a position distinct from nucleotide 383) to generate 9- and 49-base-pair (bp) fragments and by *Taq* I to generate 26- and 32-bp fragments. DNA from LAD cattle is digested by *Hae* III to generate 9-, 19-, and 30-bp fragments but is not digested by *Taq* I. DNA from carrier cattle is digested by *Hae* III to generate 9-, 19-, 30-, and 49-bp fragments and by *Taq* I to generate 26-, 32-, and 58-bp fragments.

Komplexní vertebrální malformace (CVM) holštýnského skotu

Gen: SLC35A3 (chromozóm 3)
(solute carrier family 35, member A3)
produkt: UDP-N-acetylglukosamin transporter

Substituce: G → T (v proteinu V180F)

Autozomální defekt s recesivní dědičností.

Mnohočetné malformace u telat – proporcionální dwarfismus, symetrická artrogryposa předních, někdy i zadních končetin, znetvoření obratlů krční a hrudní části páteře, případně i malformace srdce. Mutace (v homozygotním stavu) způsobuje prenatální úhyn telat nebo se telata rodí předčasně a často mrtvá. Zvířata s jednou defektní alelou jsou zcela normální, jsou však přenašeči. Postižení jsou recesivní homozygoti.

Býk **Carlin-M Ivanhoe Bell** – přenašeč CVM i BLAD.

DNA testy se provádějí v mnoha laboratořích.

V ČR k 31.5. 2004 mezi plemennými býky odhaleno 9,2% přenašečů.

Telata postižená CVM (komplexní vertebrální malformace)



Deficiency of uridine monophosphate synthase (DUMPS)

u plemene holštýn

Gen: UMPS (chromozóm 1)

produkt: uridine monophosphate synthase)

bodová mutace v kodonu 405 C – T

Autozomální recesivní dědičnost.

Nepravidelná syntéza DNA a RNA. Úhyn plodu kolem 40. dne embryonálního vývoje.

Test: PCR-RFLP; *Ava*I

Citrullinemie

Gen: ASS

Produkt: argininosuccinate synthetase deficiency

bodová mutace v exonu 5

Autozomální recesivní dědičnost.

Nedostatek enzymu, který se uplatňuje při tvorbě močoviny. Projevuje se vyšší tvorbou čpavku, který vede k nepravidelnostem v centrálním nervovém systému novorozenečků (úhyn během 3 – 5 dnů po narození).

Test: PCR-RFLP (*Ava*I)

Ceník služeb poskytovaných Laboratoří imunogenetiky

Název služby	Cena za jednotku v Kč
1. Stanovení genotypu krevních skupin skotu	800,00
2. Stanovení genotypu mikrosatelitů skotu	800,00
4. Stanovení genotypu mikrosatelitů koní	900,00
5. Stanovení genotypu mikrosatelitů prasat	600,00
6. Stanovení genotypu mikrosatelitů koz	650,00
7. Stanovení genotypu mikrosatelitů ovcí	650,00
8. Stanovení genotypu mikrosatelitů psů	800,00
9. Stanovení genotypu BLAD	900,00
10. Stanovení genotypu RYR1 (MHS – stres)	400,00
11. Stanovení genotypu CAS (kappa kasein)	400,00
12. Stanovení genotypu RED	900,00
13. Stanovení genotypu CVM	1500,00
14. Stanovení genotypu SCID	350,00
14. Stanovení genotypu dvojího osvalení	550,00
16. Ověření správnosti původu* - použití genotypu již testovaného zvířete skot krevní skupiny	60,00
skot mikrosatelity	85,00
koně mikrosatelity	100,00
prasata mikrosatelity	65,00
kozy a ovce mikrosatelity	50,00
psi mikrosatelity	100,00
17. Výpis stanoveného genetického typu z databáze	500,00
18. Vydání mezinárodní karty genetického typu z databáze	150,00
19. Vystavení kopie protokolu	500,00
20. Fragmentová analýza z produktu PCR dodaného zákazníkem	400,00
21. Stanovení genotypu exotických zvířat	950,00

Lokus *CLPG* u ovcí

(kontrolní element na velkou vzdálenost)

(long-range control element – LRCE)

záměna A - G

1983 – (farmář v Oklahomě) beran s výrazně vyvinutým svalstvem (Solid Gold)

dědičnost: maternální imprinting*, jmenovitě paternální polární superdominance

(hypertrofie jen u heterozygotů, kteří zdělili mutovanou alelu od otce)

maso má horší kvalitu – je tuhé

lokus *CLPG* (**callipyge** – pěkný zadek)

mapován na distální konec chromozómu 18

2002 – identifikace mutace

sekvenováním 210 kb oblasti mezi dvěma pozičními kandidátními geny *DLK1* a *GTL2* u inbredního berana, heterozygota v *CLPG* lokusu (Freking et al.)

***CLPG* mutace je záměna jedné báze (A → G) v předpokládaném LRCE (kontrolní element na velkou vzdálenost)**

* imprinting – alely určitého genu od otce a matky se liší v expresi. Může to být způsobeno rozdíly v metylaci DNA.

Lokus *CLPG* u ovcí

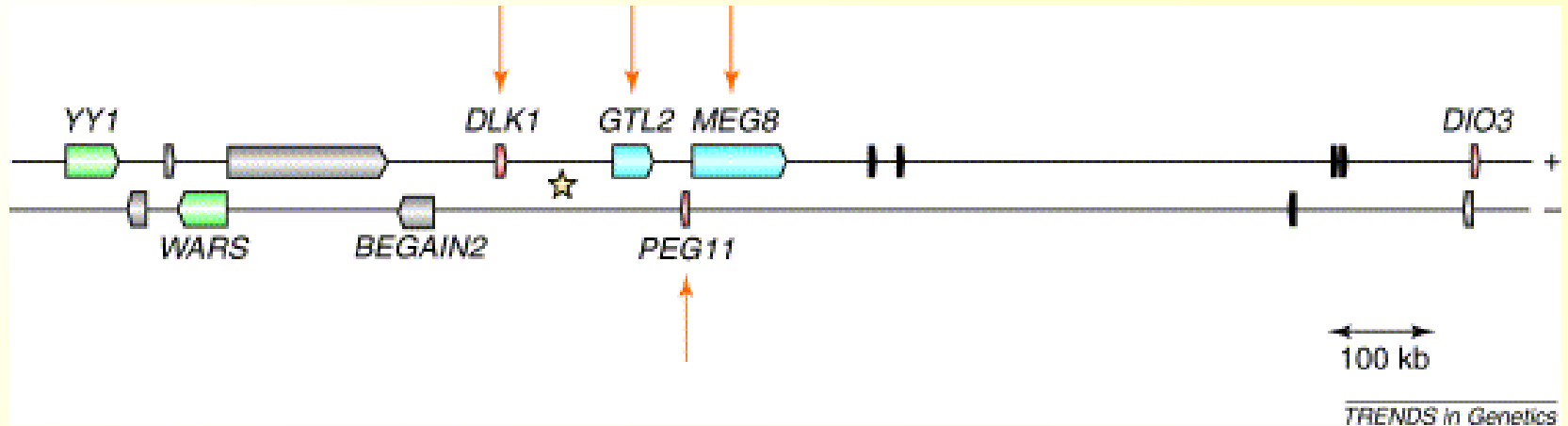


Fig. 2. The gene content in the vicinity of the HSA14q32 imprinted domain (from data in [21]). Bi-allelically expressed genes are represented in green, genes expressed from the paternal allele in red, and genes expressed from the maternal allele in blue. Genes whose imprinting status is unknown are shown in gray. Putative genes reported by [21] are shown in black. The genes are sorted according to the direction of transcription ('+' versus '-' strand). The approximate position of the *CLPG* mutation is marked by the yellow asterisk. Genes whose expression is known to be influenced by the *CLPG* mutation are marked by the orange arrows [25]. The effect of the *CLPG* mutation on the expression of the other genes in the region is being tested.

Gen DGAT1 u skotu

(Acy1-CoA:diacylglycerolacyltransferáza 1)

Enzym katalyzuje poslední stupeň v syntéze triglyceridů

Gen je lokalizován na centromerickém konci bovinního chromozómu 14

- v DNA - záměna AA→GC v exonu 8

- v proteinu - záměna lyzinu (K) alaninem (A) v pozici 232

Nositelé alely K (dojnice holštýnsko-fríského skotu, Nový Zéland) mají o 5,76 kg více tuku v mléce, o 2,45 kg méně proteinu a o 134 l méně mléka než nositelé alely A.

1998; 1999 - zjištěn QTL pro obsah mléčného tuku v centromerické oblasti bovinního chromozómu 14

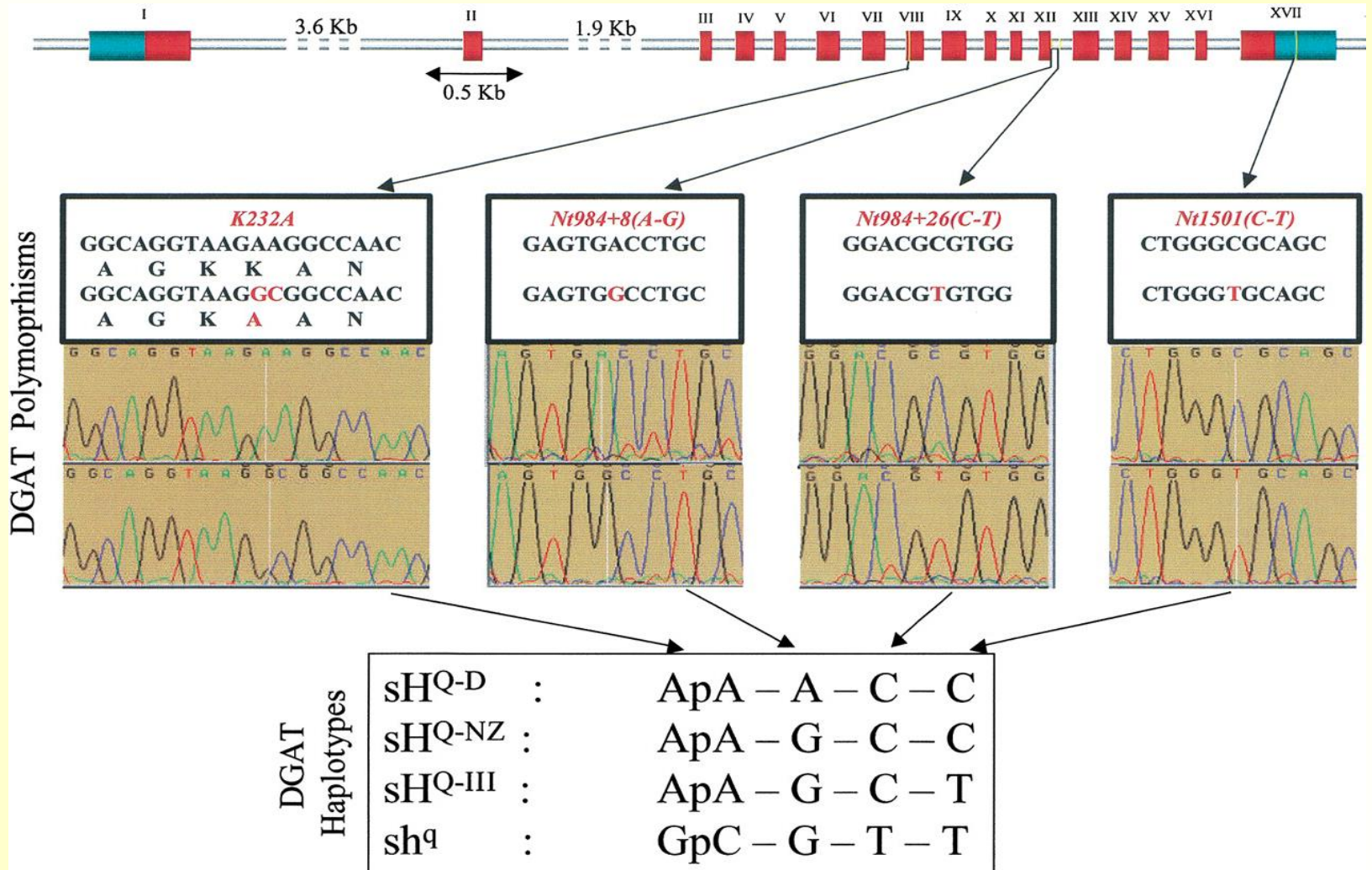
1999; 2002 - interval zúžen na 3,8 cM

2002 - identifikace mutace 232K>A a zjištěn rozdíl v efektu alel

2004 - použitím expresního vektoru, do kterého byla ligována cDNA DGAT1 a měřením enzymatické aktivity syntetizovaného rekombinantního DGAT1 byla prokázána vyšší aktivita u alely 232K

Gen DGAT1 skotu

Mutace AA→GC v exonu 8
(v proteinu je K232A)



Efekty genotypů mléčných proteinů

Criteria

Superior genotype

a) performance traits

- milk protein yield
- casein content
- β - lactoglobulin content

κ - Cn BB

β - Lg AA

κ - Cn BB

β - Lg BB

κ - Cn AA

β - Lg AA

b) milk protein processing criteria

- coagulation time
- consistency of lab coagulate
- cheese yield

κ - Cn BB

β - Cn BB

β - Lg BB

κ - Cn BB

α_{s1} - Cn BC

β - Cn BB

β - Lg BB

κ - Cn BB

Gen NHEJ1 psa

(nonhomologous end-joining factor 1)

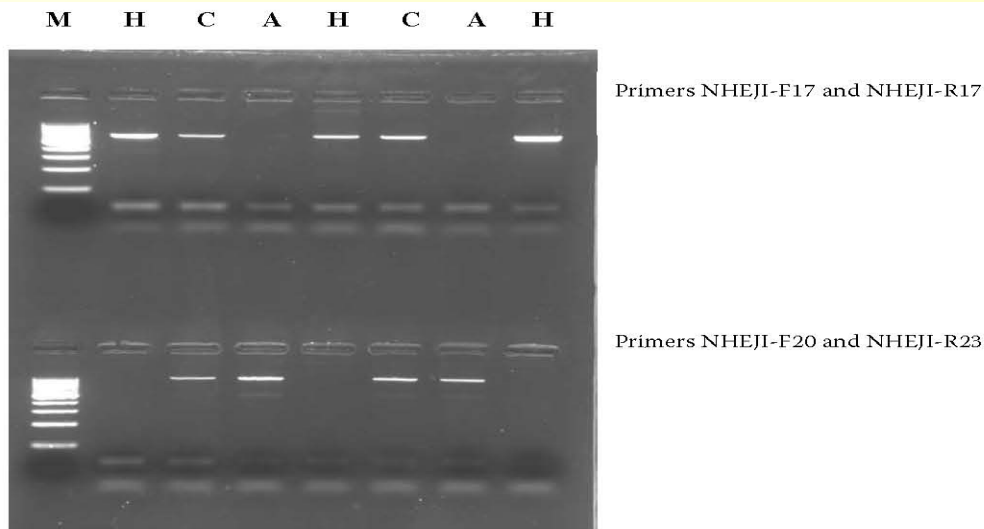
Mutace v tomto genu způsobuje chorobu **anomálie oka kolií (Collie eye anomaly; CEA)**.

Dědičné onemocnění – nedostatečný vývoj cévnatky (vrstva v zadní části oka). Projevuje se v lehčí a těžší formě. V těžší formě dojde až k úplnému oslepnutí.

CEA se dědí autozomálně recesívně – nemoc se projeví u jedinců, kteří mají mutované obě alely (recesivní homozygoti).

U heterozygotů (jedna alela normální, druhá mutovaná) se nemoc neprojeví.

Příčinná mutace: Delece 7 799 bp v NHEJ1 genu v intronu 5 (podle Ensembl); Tento intron má celkovou velikost ~67 kb. Delece je blíže exonu 6 (460 bází od exonu 6). Sekvence inzerce obsahuje vysoce konzervovanou doménu, na kterou se váže několik proteinů důležitých pro vývoj.



Testování: PCR pomocí dvou párů primerů (dvoustupňová PCR):

1. pár primerů (F17 a R17) je navržený ze sekvence inzerce; tato sekvence u postižených (A) psů chybí, a fragment se neamplifikuje.
2. pár primerů (F20 a R23) je navržený ze sekvencí před delecí a za delecí. Amplifikuje fragment, který má delecí, a neamplifikuje fragment s inzercí (je příliš dlouhý na PCR amplifikaci).

Figure 1. The 1.5% agarose gel electrophoresis showing the results of two-step PCR analysis of the dog *NHEJ1* gene; the same dogs were analysed in the upper and the lower parts of the gel; in the upper part the results using primers NHEJ1-F17 and NHEJ1-R17 are shown; in the lower part the results are obtained with primers NHEJ1-F20 and NHEJ1-R23; M – marker 100-1 000 bp; H – healthy dogs; C – carriers; A – affected

An example of (comprehensive) survey of DNA polymorphisms and associations with production traits

Table 1 DNA variants and relationships with fatness traits in cattle, goat, pig and sheep

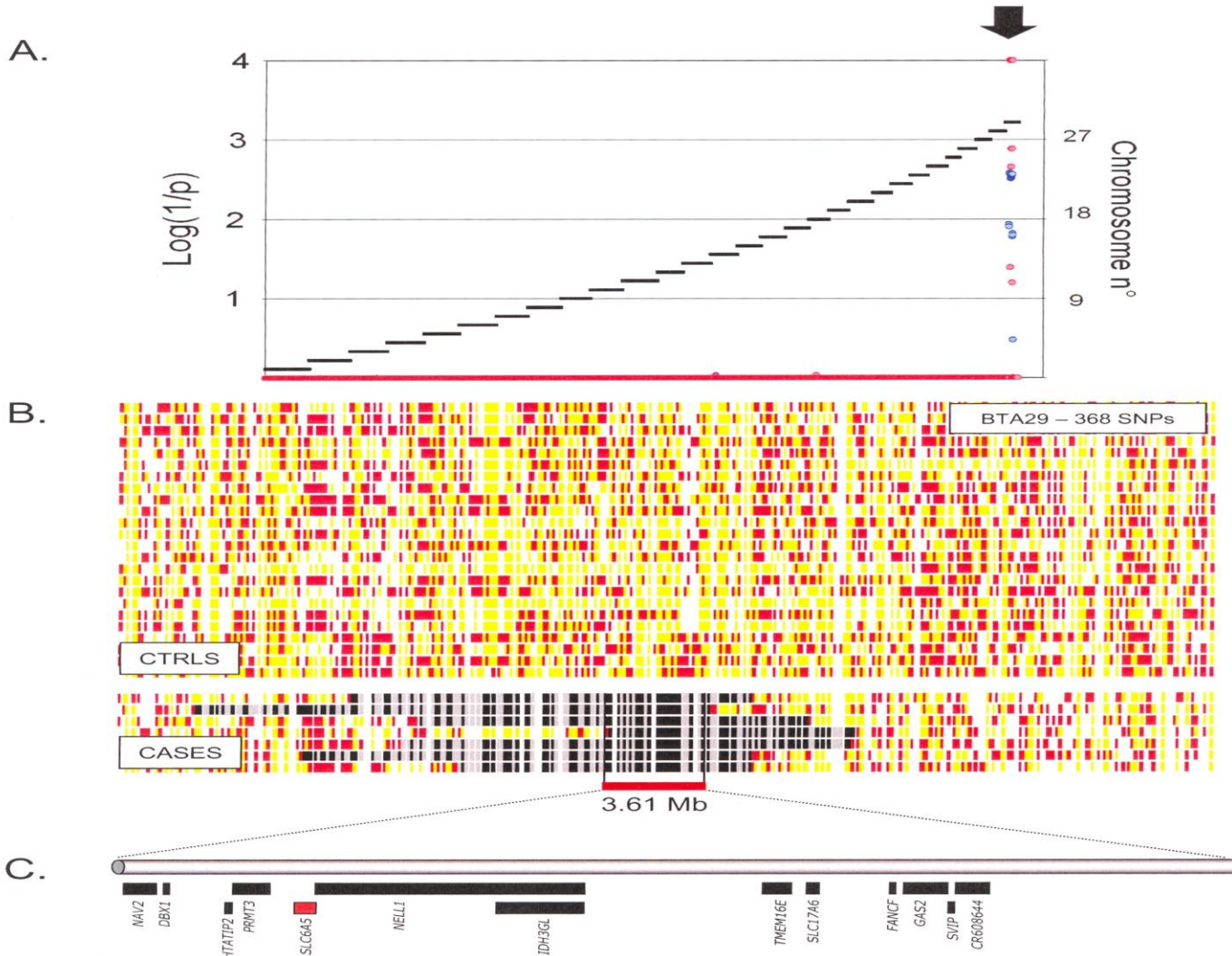
Gene name	Gene symbol	Species	DNA variant ^a	Effect on trait	Reference
Acetyl coenzyme A carboxylase α	ACACA	Goat	C5493T in exon 45	Suggestively associated with fat yield, lactose content, and somatic cell count	Badaoui et al.(2007a)
		Pig	c.5634T > C in exon 46, c.6681G > T in exon 54	Highly significant associations with stearic, palmitoleic, and vaccenic fatty acid concentrations. Effect of c.5634C negative on the percentage of C18:0 and positive on C16:1 (n-9) and C18:1 (n-7). Effect of c.6681G allele positive on C18:0	Muñoz et al. (2007a)
Diacylglycerol acyltransferase 1	DGATI	Cattle	AA to GC dinucleotide substitution in exon 8 (Lys232Ala)	The lysine variant is associated with increased milk fat, fat percentage, and protein percentage yield, and decreased milk and protein yield, and the alanine variant with increased milk and protein yields	Grisart et al. (2002), Spelman et al. (2002), Winter et al. (2002), Kamiński et al. (2006)
				Lysine variant is associated with higher intramuscular fat content	Thaller et al. (2003)
				Lysine variant showed significant effects for most milk production traits	Sanders et al. (2006)
				Lysine variant associated with more saturated fat, a larger fraction of C16:0, and smaller fractions of C14:0, unsaturated C18, and conjugated linoleic acid	Schennink et al. (2007)
Fatty acid-binding protein 4	FABP4	Cattle	7516G > C	Allele 5 or E showed significant effect on milk fat percentage and direction effect identical to that of the lysine variant	Kühn et al. (2004)
				Allele E has significant effects on lactose yield, lactose content, milk energy content, and somatic cell score	Sanders et al. (2006)
				Significant associations with marbling scores and subcutaneous fat depth. GG genotype had highest marbling scores while GC genotype had the greatest subcutaneous fat depth	Michal et al. (2006)
Fatty acid synthase	FASN	Cattle	c.220A > G (174 V) (exon 2), c.348T > C (intron 3), c.303T > C (intron 3) 763G → C in exon 1, 16009A → G in exon 34	Positively associated with back fat thickness	Cho et al. (2008)
				Significant influence on milk fat content of Holstein-Friesian animals divergently selected for milk fat content. Genotype 763CC and 16009GG produced milk with the highest fat content	Roy et al. (2006)
				g.17924A > to G (Thr → Ala)	Associated with variation in the fatty acid composition of adipose fat and milk fat. SNP in linkage disequilibrium with four other SNPs

E. M. Ibeagha-Awemu et al.: Production-associated DNA polymorphisms in farm animals

Association mapping (using SNPs) and identification of causative gene (*SLC6A5*) for CMD2 in cattle

Celogenomové asociační mapování

Supplementary Fig. 2: Congenital muscular dystonia 2 (CMD2): (A) Results of genome-wide association mapping of the CMD2 mutation with 7 affected animals and 24 controls using ASSHOM (red) and ASSIST (blue). The black horizontal bars mark the limits between the 29 autosomes. Evidence for linkage (Y-axis) is measured as $\log_{10}(1/p)$, p being determined by 10,000 locus (ASSHOM) or phenotype (ASSIST) permutations (see Methods). (B) Genotypes of cases and controls for 368 chromosome 29 SNPs. Homozygous genotypes are shown in yellow or white, heterozygous genotypes in red. Overlapping blocks of extended homozygosity in the cases are marked in black and gray. The limits and size of the haplotype shared homozygous and identical-by-state amongst all cases is highlighted in red. (C) Gene content of the shared chromosome segment, highlighting the position of the *SLC6A5* gene (red box).



Příčinné geny u ovcí

BMP1B -

bone morphogenetic protein receptor 1B (gen je na chromozómu 6)

Mutace v genu mění aminokyselinu (Gln249Arg).

Důsledek – vyšší počet folikulů a vyšší počet ovulovaných oocytů = vyšší počet jehňat ve vrhu u plemene Booroola (až 10 jehňat).

(gen se rovněž označuje Booroola gen nebo FecB).

(Mulsant *et al.*, 2001)

BMP15 -

bone morphogenetic protein 15 (také FecX nebo Inverdale)

je lokalizovaný na X chromozómu.

Mutace zvyšuje počet ovulovaných oocytů o jeden u heterozygotních ovcí, ale u homozygotů s mutovanou alelou způsobuje sterilitu.

(Galloway *et al.*, 2000)

Genetické aspekty produkce masa

- **Prenatální myogeneze**
- **Postnatální růst svalů (hypertrofie)**
- **Inverzní vztah mezi počtem svalových vláken a jejich velikostí**
- **Regulační systémy:**
 - * **polygenní dědičnost**
 - * **transkripční faktory pro vývoj svalů (MRF): MYOD1, MYF5, MYOG, MEF2**
 - * **ostatní transkripční faktory: NFAT proteiny (aktivace řízená kalcineurinem), buněčné onkogeny**
 - * **četné další růstové faktory, steroidní hormony, další hormony ovlivňující metabolismus**
 - * **výživa**

Faktory ovlivňující počet svalových vláken, jejich velikost a složení

- **Druh**
- **Pohlaví**
- **Selekce (genetická variabilita/heritabilita)**
- **Plemeno**
- **Výživa**
 - * prenatální výživa
 - * postnatální výživa
- **Fyzická aktivita**
- **Látky stimulující růst**
 - * růstový hormon
 - * beta adrenergní agonisté (např. clenbuterol)
 - * estrogeny a androgeny
- **Vliv genů velkého účinku:**
 - * Gen RYR1 (HAL) (u prasete)
 - * Gen MSTN (u skotu)
 - * Gen CLPG (u ovce)
 - * Gen IGF2 (u prasete)
 - * Gen PRKAG3 (u prasete)

Genomický imprinting

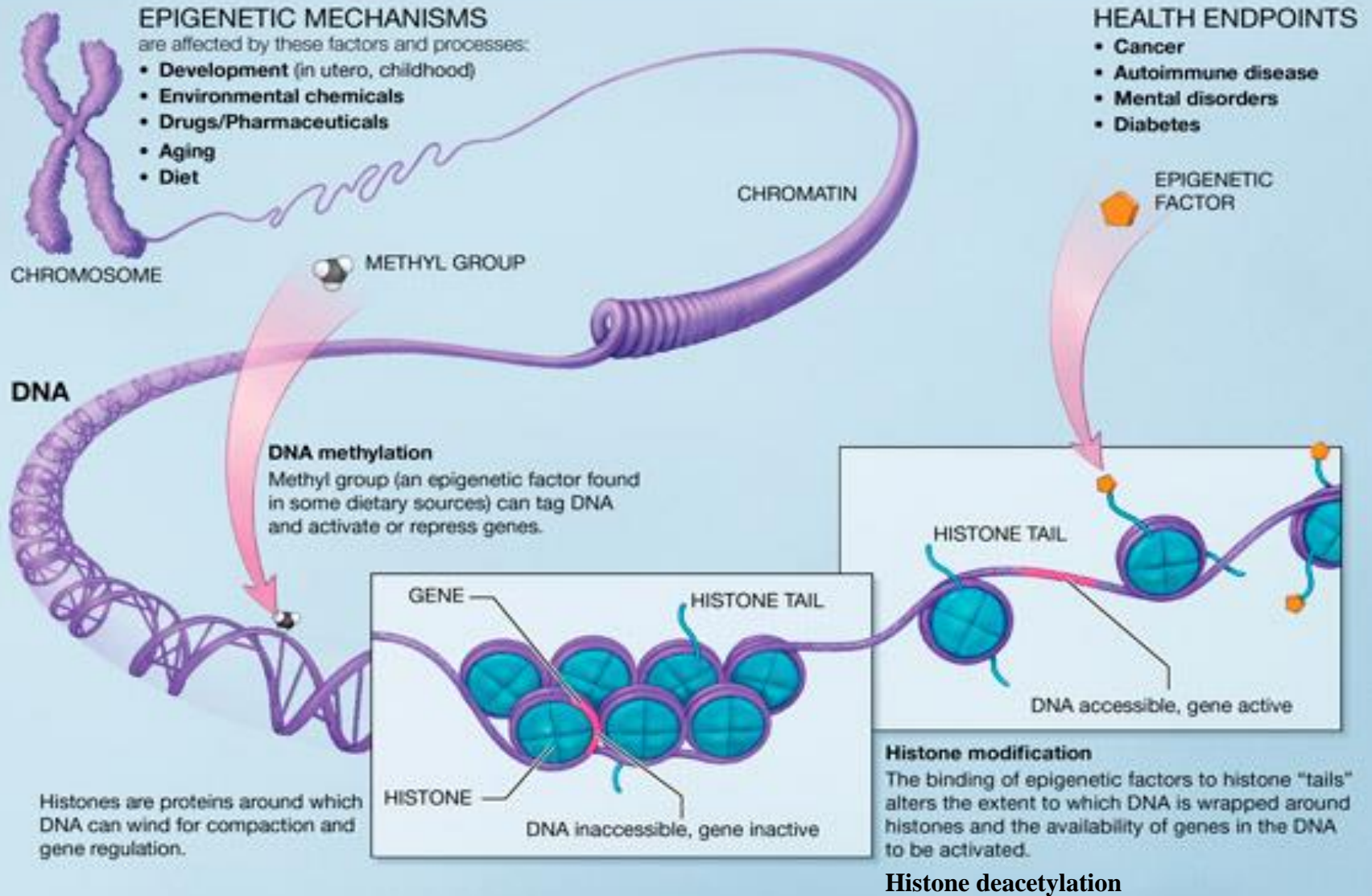
Genomický imprinting představuje **epigenetickou*** modifikaci genů, jejímž důsledkem je monoalelická exprese. U savců je tento termín používán pro monoalelickou expresi nebo inaktivaci buď mateřské nebo otcovské alely určitého lokusu. Imprintovaná mutovaná alela se bude jevit jako recesivní, když bude zděděna od jednoho z rodičů, protože bude inaktivní (a tudíž bez projevu), zatímco druhá aktivní alela, zděděná od druhého rodiče, se bude jevit jako dominantní.

Jedním z typů epigenetických modifikací u savců je **metylace cytosinu v poloze 5**, která se nejčastěji objevuje v CpG dinukleotidech. Tento typ DNA modifikace je velmi významný, neboť metylované sekvence DNA jsou transkripčně inaktivní.

Odhady počtů imprintovaných genů u savců se pohybují v rozmezí od 100 do více než 200. Některé z nich jsou ukázány v tabulce. Imprinting se vyskytuje také u hmyzu a vyšších rostlin.

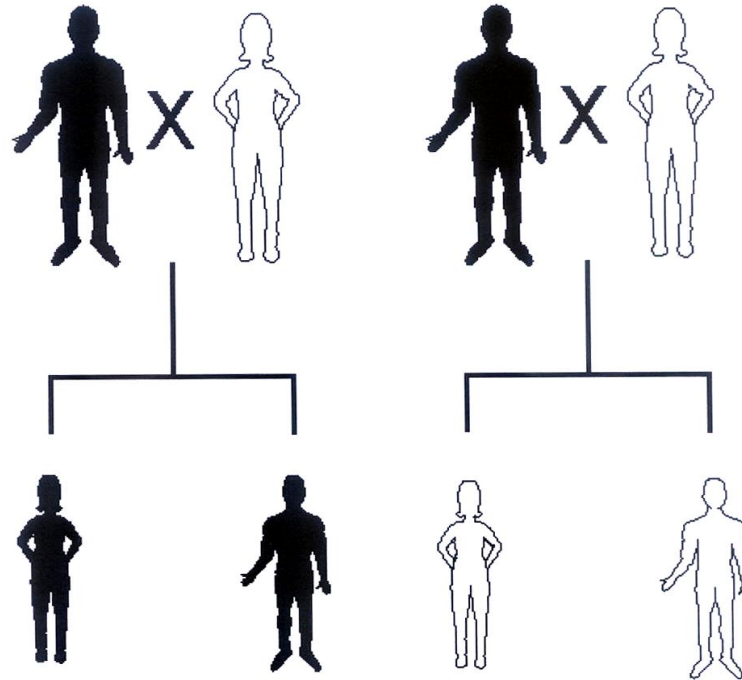
***Epigenetické modifikace** ovlivňují fenotyp aniž by měnily genotyp. Zahrnují změny ve vlastnostech buňky, které jsou děděny, ale nedochází ke změně genetické informace. Příklady: **imprinting, inaktivace X chromozómu, poziční efekt, reprogramování, maternální efekty, modifikace histonů a heterochromatinu, aj.**

Schéma znázorňující podstatu a účinek epigenetických mechanismů



Genomický imprinting

Dva příklady hypotetického imprintovaného genu zodpovědného za barvu pokožky



(VLEVO) V tomto příkladu je gen pro pigment maternálně imprintovaný (mateřská alela je inaktivována). Spojením pohlavních buněk muže, který má alelu pro pigment, a ženy, která má alelu pro nevytváření pigmentu se narodí děti, které mají pouze fenotyp s pigmentem. V tomto příkladu je mateřská alela imprintována a inaktivována u potomků. Tudiž jedinou aktivně exprimovanou alelou je otcova alela pro pigment, která není imprintována u potomků.

(VPRAVO) V tomto příkladu je gen pro pigment paternálně imprintovaný (otcovská alela je inaktivována). Spojením pohlavních buněk muže, který má alelu pro pigment a ženy, která má alelu pro nevytváření pigmentu se narodí děti, které mají fenotyp bez pigmentu. V tomto příkladu je imprintována otcovská alela a je inaktivována u potomků. Tudiž jedinou exprimovanou alelou je mateřská alela pro nevytváření pigmentu, která není imprintována u potomků.

Některé imprintované geny savců (celkem je imprintovaných asi 150 genů)

Imprintované geny	Aktivní alela (P= otcovská; M = mateřská)
<i>Igf2</i>	P
<i>Igf2r</i>	M
<i>H19</i>	M
<i>Snrpn</i>	P
<i>Ins1 and 2</i>	P
<i>U2afbp-rs</i>	P
<i>Znf127</i>	P
<i>Par1</i>	P
<i>Par5</i>	P
<i>Xisf</i>	P
<i>Mas</i>	P
<i>IPW</i>	P
<i>WT1</i>	M
<i>Mash-2</i>	M
<i>p57(KIP2)</i>	M
<i>Peg1/MEST</i>	P
<i>ApoE</i>	P
<i>Pk3</i>	P
<i>Pp/cγ</i>	P

Inaktivace X chromozómu

U samic je jeden z X chromozómů (získaný buď od matky nebo od otce) (náhodně) inaktivován v časném embryonálním vývoji, s inaktivovaným stejným chromozómem v buňkách, které vzniknou dělením této buňky. Jedná se o **epigenetickou modifikaci** - je to dědičná změna v genové funkci, aniž by došlo ke změně DNA. Tento jev se také označuje jako **lyonizace** (podle anglické genetičky Mary Lyon).

Barrovo tělísko – kondenzovaný heterochromatin v procesu lyonizace

hemizygot – gen u diploidního organismu jen v jednom exempláři

kompence dávky genu – mechanismus, který upravuje aktivitu genů lokalizovaných na X chromozómu u samců a samic tak, aby se vyrovnal rozdíl mezi haploidním stavem u samců a diploidním stavem u samic

Zjišťování pohlaví u zvířat

- u embryí
- v kriminalistice
- rutinní genotypování
- **PCR amplifikace DNA fragmentu specifického pro Y chromozóm (gen SRY)**

Na Y chromozómu savců je gen SRY (sex determining region on chromosome Y), který je zodpovědný za zahájení vývoje samčího pohlaví. Gen SRY je lokalizován na p raménku Y chromozómu, směrem 3' od **pseudoautozomální oblasti 1 (PAR1)**. PCR amplifikací fragmentu genu SRY je možno identifikovat samce. Jestliže je výsledek amplifikace negativní, jedinec je samice, ale nevylučuje to možnost chyby v experimentálním postupu, která způsobí stejný negativní výsledek. Pro spolehlivé stanovení je nutno do experimentu zahrnout i nějaký další gen, který je přítomen jak u samců, tak u samic, a ten musí být amplifikován ve stejné zkumavce jako pozitivní kontrola.
- **PCR amplifikace fragmentu genu AMEL (amelogenin), který je na X i Y chromozómu,** ale tyto dvě formy se liší četnými inzercemi/delecemi, takže je možno rozlišit fragmenty specifické pro X a Y chromozóm, na základě rozdílné velikosti fragmentů, použitím elektroforézy v agarózovém gelu. (např. u člověka, skotu, ovce, jelena).

Srovnání sekvencí DNA fragmentů genu amelogeninu (AMEL) z X a Y chromozómu ovce a jelena. (.) ins/del

		1				50
Ovis aries	X	CCCTTCCAGC	CCCAGTCCAT	CCAGCCGCAG	CCTCACCAGC	CCCTGCAGCC
Cervus elaphus	X	CCCTTCCAGC	CCCAGTCCAT	CCAGCCGCAG	CCTCACCAGC	CCCTGCAGCC
Ovis aries	Y	CCCTTCCAGC	CCCAGCCCAT	CCAGCCACAG	CCTCACCAGC	CCCTACAGCC
Cervus elaphus	Y	CTC....AGG	CCCAGCCCAT	CCAGCCACAG	CCTCACCAAC	CCCTACAGCC
		51				100
Ovis aries	X	CCTGCAGCCC	CTGCAGCCCT	TGCAGCCCCT	GCAGCCCCTG	CAGCCCCAGT
Cervus elaphus	X	CCTGCAGCCC	CTGCAGCCCT	TGCAGCCCCT	GCAGCCCCTG	CAGCCCCAGC
Ovis aries	Y	CCATGTCAGC	CTG.....
Cervus elaphus	Y	CCAGTAGCAC	CTG.....
		101				150
Ovis aries	X	CACCCG..TG	CACCCCATCC	AGCCCCTTGC	CGCCGCAGCC	ACCTCTGCCT
Cervus elaphus	X	CGCCCAGTTG	CACCCCATCC	AGCCCCTTGC	CGCCACAGCC	ACCTCTGCCT
Ovis aries	YTG	CACCCCATCC	AGCCCTT...GCC	ACCTCTGCCT
Cervus elaphus	YTG	CACCCCATCC	AGCCCTT...GCC	ACCTCTGCCT
		151				200
Ovis aries	X	CCGATATTCC	CCATGCAGCC	TTTGCCCCC	.ATGCTTCCT	GACCTGCCT
Cervus elaphus	X	CCTATATTCC	CCATGCAGCC	TTTGCCCCC	.ATGCTTCCT	GACCTGCCT
Ovis aries	Y	CCGATATTCC	CCATGCAGCC	TTTGCCCCC	TGTGCTTCCT	GAGCTGCCT
Cervus elaphus	Y	CCGATATTCC	CCATGCAGCC	TTTGCCCCCT	.GTGCTTCCT	GACCTGCCT

Rozdíly ve fragmentech genu AMEL u samců a samic ovce a jelena

(gen AMEL je přítomen jak na X, tak na Y chromozómu, ale liší se ve velikosti – to je způsobeno mnoha insercemi/delecemi)

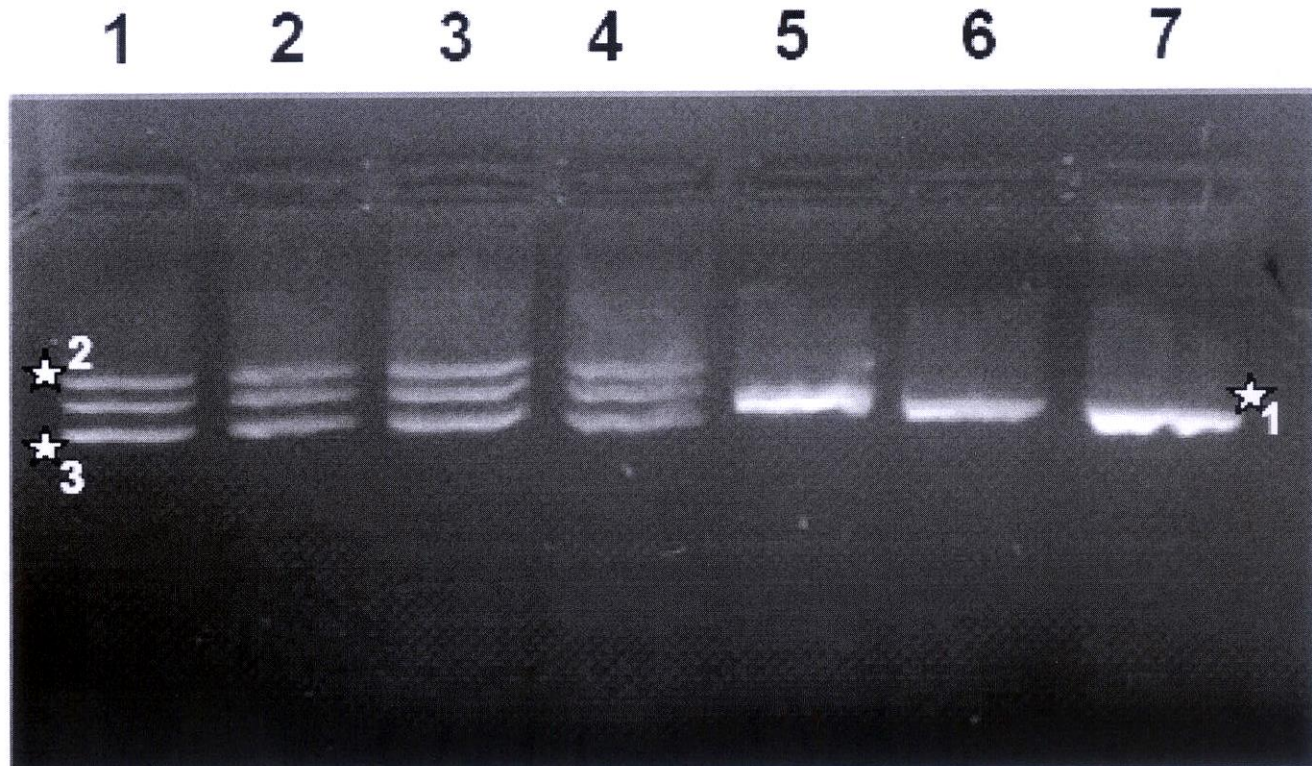


Figure 2

Detail of an ethidium bromide stained agarose gel showing amplicons of the amelogenin gene fragments of sheep and European red deer. Lane 1–2 samples from male red deer, lane 3–4 samples from male sheep, lane 5 sample from female sheep and lane 6–7 samples from female red deer. The star 1 indicates the AMELX band, the star 2 indicates a non specific band in male sheep and male red deer and the star 3 indicates the AMELY band.

Priony (S.B. Prusiner, 1982)

Základ prionové teorie

Nervové buňky savců obsahují tzv. prionové bílkoviny (v angl. literatuře je častá zkratka PrP, případně PrP^C pro zdravou buněčnou bílkovinu). Má se zato, že tyto prionové bílkoviny hrají významnou úlohu při odpočinku a spánku. Prion (PrP^{Sc}) představuje vadnou formu této normální bílkoviny, od které se odlišuje rozdílnou konformací (prostorovým uspořádáním). Důsledkem této změny konformace je mimořádná odolnost vůči různým fyzikálním vlivům, prakticky absolutní odolnost proti štěpným enzymům odklízejícím vadné bílkoviny a schopnost navazovat se na zdravé formy prionových bílkovin a konvertovat je na svoji vadnou formu. Následkem je, že se v buňce hromadí rostoucí shluky propojených vadných molekul prionové bílkoviny, kterých se buňka nedokáže zbavit, posléze je zcela zaplněna a uhyne.

Předchozí část teorie je obecně přijímána. Navazující část je sice přijímána většinou odborníků, nicméně ne absolutně. Ta předpokládá možnost přenosu prionových onemocnění potravou nejen mezi jedinci jednoho druhu (což je též obecně přijímáno – v případě nemoci kuru se to má za dostatečně podložené), ale i mezi jedinci různých druhů, zejména pak se zdůrazňuje přenos ovce (scrapie) – kráva (bovinní spongiformní encefalopatie) a kráva (BSE) – člověk (nová varianta CJD). Zde mají někteří vědci výhrady a nepovažují tuto část teorie za dostatečně prokázanou.

K přenosům mezi druhy existuje několik předpokládaných obecností:

- šance na přenos mezi druhy je přímo úměrná podobnosti prionových bílkovin obou druhů
- největší šance na přenos skýtá konzumace mozku či jiných vysoce inervovaných tkání
- masožravci jsou obecně odolnější proti přenosu než býložravci.

Bovinní spongiformní encefalopatie

Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE, lidově nemoc šílených krav) je prionové onemocnění postihující skot, které se objevilo na konci 20. století. Předpokládá se, že by mohlo být bovinní variantou scrapie ovcí (svrbivka) a že požití tkání obsahující priony by mohlo u člověka vyvolávat tzv. novou variantu Creutzfeldt-Jacobovy choroby (nvCJD = New variant of Creutzfeldt-Jacob Disease). Jméno nemoc šílených krav získalo toto onemocnění proto, že v pozdních stadiích vyvolává u krav neobvyklé chování. Odborné jméno poukazuje na to, že jde o onemocnění skotu (bovinní), které se projevuje pórovatěním mozku, který pak připomíná v pozdějších stadiích houbu (spongiformní = houbovité; encefalopatie = nezářlivé onemocnění mozku).

Nemoc má velmi dlouhou inkubační dobu u krav a inkubační doba nové varianty CJD u člověka se odhaduje ještě delší (až přes deset let), z pochopitelných důvodů se tedy nepodařilo dokázat na základě nějakého konkrétního případu, že přenos na člověka je možný.

Zatímco o přenosu nemoci mezi dobytčaty jednoho druhu (skrmováním nedostatečně tepelně zpracované masokostní moučky) se příliš nepochybuje, myšlenka mezidruhového přenosu: ovce (scrapie ovcí) → skot (BSE) → člověk (nvCJD) je předmětem kontroverzí, byť ji většina vědců i vlád bere v rámci předběžné opatrnosti v potaz. Vychází se přitom z různých logických úvah a ze statistických analýz, z nichž některé ukazují na pozitivní korelaci mezi počtem nemocných kusů dobytka a počtem lidí trpících CJD. Kvůli této nemoci byla na přelomu 20. a 21. století zavedena rozsáhlá restriktivní opatření a byl vybit nespočet krav. V ČR bylo jen několik případů a to hlavně proto, že české kafilerie upravovaly masokostní moučku při 400 °C. Při těchto teplotách se prion BSE ničí. Předpisy EU ale požadovaly nižší teploty, při kterých nedocházelo k destrukci bílkovinných prionů.

Normální a abnormální konformace prionů

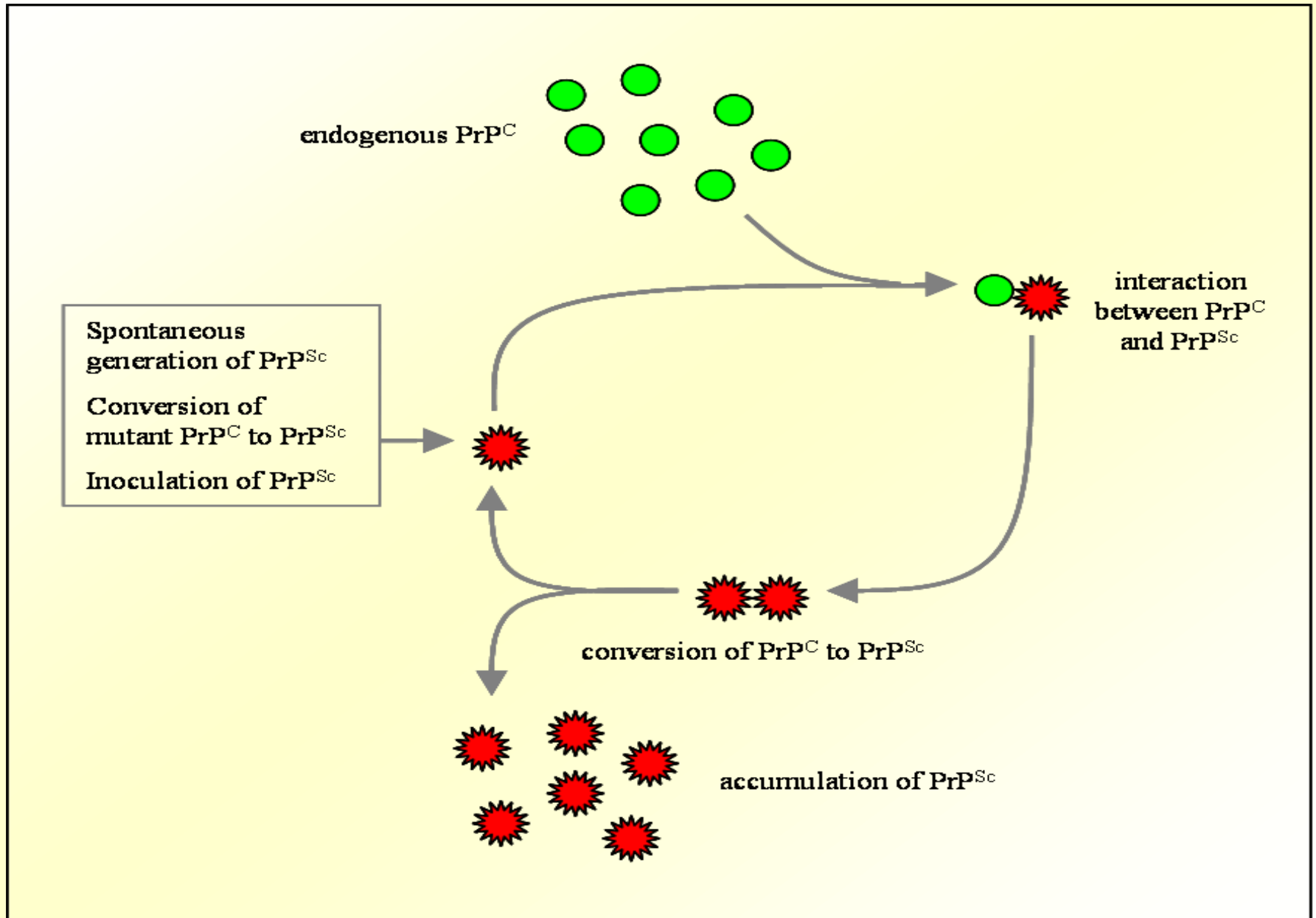
(vlevo – normální, vpravo – abnormální)

The figure at right shows a model of two conformations of prion; on the left is the known, normal conformation of the structured C-terminal region of PrP^C. The N-terminal region is not shown here for having a flexible structure in aqueous solution. The structured domain shown is mainly made of three spirals called alpha helices (pink), with two short 'flat' regions of beta sheet (β sheet) structure (green). On the right is a proposed model of how the abnormal prion might look. Although the exact 3D structure of PrP^{Sc} is not known, there is increased β sheet content (green arrows) in the diseased form of the molecule. These β sheets are thought to lead to amyloid aggregation.



Many prion protein transformations are characterized by increased β -sheet content (depicted by green arrows). In this picture, the left image is the normal Prnp protein. After isomerization, note that the right-side image contains considerably more β -sheet content. These β -sheets often constitute an electric dipole and can lead to amyloid aggregation.

Předpokládaný mechanismus vzniku a množení abnormálních prionů



Imunogenetika

Vědní oblast zabývající se genetickou podstatou imunity se nazývá **imunogenetika**.

Imunita je schopnost organismu rozpoznat vlastní molekuly, buňky a tkáně od cizorodých látek (antigenů, patogenů).

Rozeznáváme imunitu: - nespecifickou (přírozenou; vrozenou)
- specifickou

Na **nespecifické imunitě** se podílejí kůže a slizniční povrchy, enzymy (např. lysozym, pepsin aj.) komplement, proteiny akutní fáze, interferony, fagocytující buňky (neutrofilní a eozinofilní granulocyty, monocyty a makrofágy), NK buňky (přírození zabíječi) a některé další mechanismy. Jedná se o nespecifické reakce a nevytváří se imunologická paměť.

Specifická imunita se vytváří až po setkání s antigenem.

Antigen je chemická látka, která je schopna vyvolat tvorbu protilátek nebo jinou reakci imunitních buněk. Antigeny jsou makromolekulární látky, převážně proteiny, dále polysacharidy, a slabší antigenní aktivitu mají lipidy. Antigenem mohou být také nízkomolekulární látky navázané na vysokomolekulární nosič.

Schopnost antigenu vyvolat imunitní reakci je podmíněna řadou vlastností, mezi které patří přítomnost **antigenních determinant**, neboli **epitopů**. **Epitop** je malá oblast antigenu, kterou rozpoznávají receptory buněk imunitního systému. Jeden antigen může obsahovat více epitopů.

Imunitní odpověď na antigenní podnět je komplexní reakce buněk imunitního systému a cytokinů. **Cytokiny** jsou proteiny vytvářené leukocyty a některými dalšími typy buněk (např. fibroblasty). Cytokiny produkované lymfocyty se označují **interleukiny**. Regulují aktivitu jiných buněk a hrají významnou roli v imunitních reakcích.

Rozeznáváme dva mechanismy specifické imunitní reakce: - humorální (zahrnuje zejména tvorbu protilátek, tj. imunoglobulinů);
- buněčně zprostředkované

Humorální imunitu zajišťují **B lymfocyty** (označení mají podle ptačího orgánu bursa Fabricii, kde byly původně zjištěny). U savců se vyvíjejí v kostní dřeni a vývoj se dokončuje po kontaktu s antigenem v mizních uzlinách, slezině a Peyerových placích (to jsou okrsky lymforetikulární tkáně ve stěně tenkého střeva). V membráně B lymfocytů se nacházejí **membránové imunoglobuliny**, které jsou označovány

jako B buněčné receptory (BCR). Po kontaktu BCR se specifickým antigenem vznikne z lymfocytu **plazmatická buňka**, která produkuje **protilátky (imunoglobuliny)**. Tento klon buněk se namnoží. Část těchto namnožených buněk se neúčastní reakce proti antigenu a zůstává dlouhodobě v organismu jako **paměťové buňky**. Ty se uplatňují při opakovaném setkání organismu se stejným antigenem, kdy imunitní odpověď nastupuje rychleji a s vyšší intenzitou. To je principem preventivního očkování.

Na **specifické buněčné imunitě** se podílejí **T lymfocyty** (označení od thymu /brzlík/, kde probíhá hlavní část jejich vývoje). Vznikají v kostní dřeni, ale vývoj probíhá v brzlíku. Rozlišují se dva typy T lymfocytů: T_h (helper) a T_c (cytotoxické). Na povrchu jejich membrány se nacházejí receptory pro rozpoznávání antigenu a další diferenciací molekuly (CD molekuly – cluster of differentiation). Prekursor T lymfocytů se po setkání s antigenem diferencují na zralé T lymfocyty. T_c lymfocyty se uplatňují při likvidaci buněk postižených virovou infekcí, buněk nádorových a při reakci organismu proti transplantátu. Mají schopnost buňky cytotoxicky zabít. T_h lymfocyty vytvářejí cytokiny.

Pro vysvětlení imunitních reakcí byla vypracována **teorie klonální selekce**, která je široce akceptovaná. Populace lymfocytů obsahující B a T lymfocyty vytváří mnoho různých imunoglobulinů nebo T buněčných receptorů (TCR). Avšak každý jednotlivý lymfocyt vytváří jeden typ imunoglobulinu, který je schopen rozeznat pouze jeden antigen. Podobně, každý T lymfocyt vytváří pouze jeden specifický T buněčný receptor.

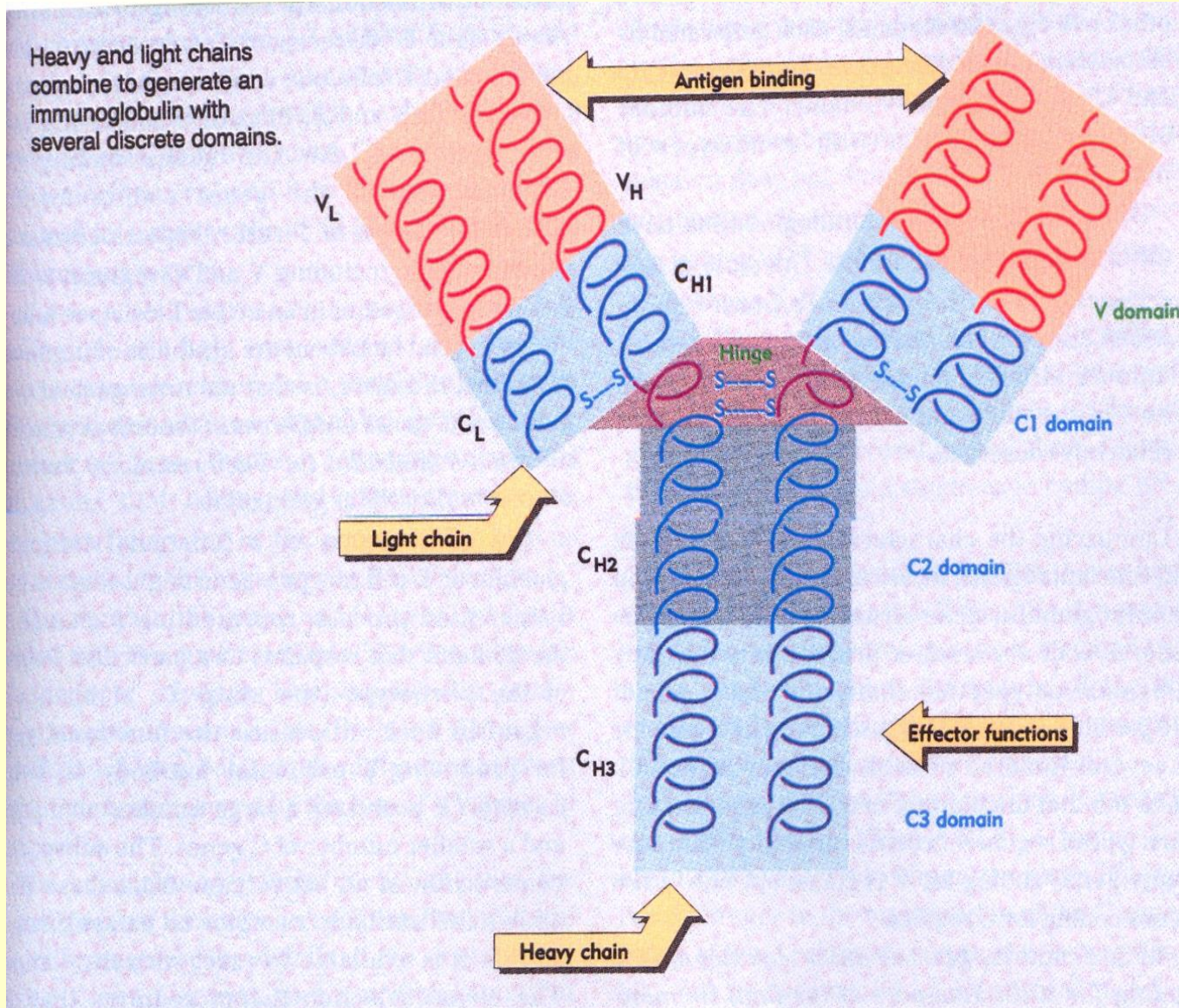
Imunoglobuliny

Protilátky jsou imunoglobuliny. Každá molekula protilátky má specifickou strukturu pro rozpoznání určitého antigenu. Předpokládá se, že savci mají schopnost vytvářet $10^6 - 10^8$ různých typů protilátek. **Každá molekula protilátky je imunoglobulinový tetramer vytvářený dvěma identickými lehkými (L) řetězci a dvěma identickými těžkými (H) řetězci, které jsou spojeny pomocí disulfidových můstků.** Lehké řetězce mají více než 200 aminokyselin, těžké řetězce obsahují více než 400 aminokyselin. Imunoglobuliny jsou glykoproteiny. Struktura tetrameru imunoglobulinu je ukázána na obraze.

Každý proteinový řetězec obsahuje dvě oblasti: N-terminální **variabilní (V) oblast** a C-terminální **konstantní (C) oblast**. Jak naznačuje označení, variabilní oblasti se vyznačují značnými rozdíly v sekvencích u různých molekul proteinu, zatímco konstantní oblasti vykazují vysokou homologii.

Schéma molekuly imunoglobulinu

(tetramer sestávající ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců)



Existují **dva typy lehkých řetězců, lambda (IgL_λ) a kapa (IgL_κ)**. Oba sestávají přibližně z 211 až 217 aminokyselin ($M_r = 23\ 000$). Jsou si velmi podobné, přesto se v jedné molekule imunoglobulinu nikdy nevyskytují oba typy.

Existuje pět typů těžkých řetězců, které se liší strukturou konstantní oblasti. Jsou označovány γ , α , μ , δ , a ϵ . Těžký řetězec γ a α obsahuje přibližně 450 aminokyselin, řetězce μ , δ , a ϵ tvoří asi 550 aminokyselin.

Podle typu těžkého řetězce rozdělujeme imunoglobuliny do 5 tříd: IgG, IgA, IgM, IgD a IgE.

V protilátkách, které produkuje jedna plazmatická buňka (a namnožený klon), se mohou lišit typy těžkého řetězce, buňka může vytvářet více tříd imunoglobulinů najednou, ale všechny imunoglobuliny produkované jednou plazmatickou buňkou jsou specifické pro určitý antigen a mají stejnou variabilní oblast.

Aby se organismus dokázal ubránit velkému množství možných antigenů, musí tvořit milióny B lymfocytů. Je třeba si uvědomit, že kdyby všechny možné variabilní oblasti specifické pro všechny možné antigeny byly kódovány geny, imunitní systém by potřeboval pro svou funkci více genů, než obsahuje celý genom. Ve skutečnosti, B lymfocyt dokáže rekombinovat části genomu a tak vytvořit všechny variace struktur protilátek (Tonegawa, 1976 – v roce 1987 Nobelova cena).

- IgG – nejčastěji se vyskytující imunoglobulin (asi 80% sérových imunoglobulinů). Je přítomen v krvi a tkáňovém moku. Vyskytuje se jako monomer (jeden tetramer složený ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců).
- IgA – tvoří 15 – 20% sérových imunoglobulinů. Nachází se také v mléce, slzách, slinách a tělních sekretech Pomáhá chránit proti patogenům, které se dostaly na vnější nebo vnitřní povrch těla. Je to dimer – dva monomery spojené polypeptidovým J řetězcem a sekreční složkou, polypeptidem syntetizovaným epitelii.
- IgM – zpravidla se vyskytuje jako pentamer, někdy hexamer. Pentamery obsahují J řetězec. Tvoří buněčný receptor (BCR) na povrchu B lymfocytů. Vyskytuje se také v krvi, někdy v tělních sekretech. Je to první typ cirkulujících protilátek, které se tvoří po setkání s antigenem.
- IgD – rovněž se nachází na povrchu B lymfocytů (BCR). V malém množství je v séru. Je to monomer.
- IgE – je přítomen na membráně bazofilních granulocytů a žírných buněk. Ochrana proti parazitům. Je to monomer

Domény imunoglobulinových řetězců

Souvislá aminokyselinová sekvence jakéhokoliv proteinu, která se vyznačuje specifickou funkcí, se označuje jako **doména proteinu**. U imunoglobulinů je každá doména stabilizována disulfidovou vazbou. Přilehlé oblasti lehkých a těžkých řetězců vytvářejí charakteristické domény:

- Variabilní (V) doména je vytvořena asociací variabilních oblastí lehkého a těžkého řetězce (V_L a V_H). **V doména je zodpovědná za rozpoznání antigenu.** Imunoglobulin má strukturu ve tvaru Y, ve které ramena Y jsou identická a každé rameno má jednu kopii V domény. Vytváření domén s rozdílnými specifitami generuje schopnost reagovat na různé antigeny. Celkový počet variabilních oblastí jak pro lehké tak pro těžké řetězce je odhadován ve stovkách. *Tak se protein vyznačuje maximální přizpůsobivostí v oblasti zodpovědné za vazbu antigenu.*
- Asociace konstantních oblastí vytváří v molekule několik specifických C domén. První doména (C_1) vzniká z asociace konstantní oblasti lehkého řetězce (C_L) s částí C_{H1} konstantní oblasti těžkého řetězce. Dvě kopie této domény kompletují ramena Y tvaru molekuly.
- Závěs (hinge) mezi rameny a nožičkou Y je vytvářený interakcí částí těžkých řetězců. Existuje asi 10 typů těžkých řetězců. Na obraze je ukázána molekula, ve které krátká oblast „závěsu“ spojuje první konstantní doménu s dvěma dalšími konstantními doménami, které jsou vytvářeny paralelními oblastmi těžkých řetězců C_{H2} – doména C_2 , a C_{H3} – doména C_3 .
- (imunoglobuliny IgD, IgG a IgA mají těžké řetězce δ , γ , α , a mají tři domény - C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} ; imunoglobuliny IgM a IgE mají těžké řetězce μ a ϵ , a mají čtyři domény - C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} a C_{H4})

Komplexní geny (supergeny; genové klastry – gene clusters)

Dalo by se předpokládat, že se po rodičích dědí geny, které kódují jako i jiné strukturální geny polypeptidové řetězce, jež tvoří molekulu imunoglobulinu. Ale není tomu tak. Dědí se jen **segmenty těchto genů**, které budeme označovat jako **subgeny**. **Teprve spojováním těchto subgenů se pak podle vývojového programu organismu vytváří během diferenciacce lymfocytů geny, jejichž informace je překládána do**

primární struktury lehkého nebo těžkého řetězce. Geny, které se vytváří spojováním subgenů v různých kombinacích podle vývojového programu mnohobuněčného organismu, budeme nazývat jako **komplexní geny**. Proces spojování subgenů v různých kombinacích se označuje jako **přeskupování subgenů**. Používá se také označení **somatické rekombinace** (na rozlišení od meiotických rekombinací, které probíhají při tvorbě gamet). Tento proces probíhá při diferenciaci kmenových buněk na lymfocyty. Je základním zdrojem rozmanitosti protilátek, jelikož zodpovídá za vznik různých kombinací subgenů. Tyto kombinace představují geny pro lehké a těžké imunoglobulinové řetězce.

Níže jsou uvedena pravidla, podle kterých se řídí proces přeskupování subgenů:

1. Geny, které kódují lehké a těžké řetězce imunoglobulinů se nedědí hotové, ale ve formě svých segmentů, které označujeme jako subgeny.
2. Geny kódující lehké a těžké řetězce imunoglobulinů se tvoří podle vývojového programu organismu v kmenových buňkách spojováním subgenů do různých kombinací procesem přeskupování subgenů.
3. Každá doména lehkého i těžkého řetězce je kódována specifickým subgenem.
4. Kromě subgenů kódujících domény lehkých a těžkých řetězců se na výstavbě imunoglobulinového genu podílejí ještě:
 - a) J-subgeny, z nichž každý kóduje 13 až 17 koncových aminokyselin variabilní oblasti jak u lehkých tak i těžkých řetězců. Úseky kódované J-subgeny sousedí s konstantní oblastí. Existují celkem čtyři až pět J-subgenů.
 - b) D-subgeny, z nichž každý kóduje 1 až 15 aminokyselin třetího hypervariabilního úseku těžkých řetězců. Existuje asi 30 D-subgenů. Podílejí se na kódování jen těžkých řetězců. Na chromozómové DNA sousedí skupina subgenů ze strany levé s posledním V subgenem a z pravé strany s prvním J-subgenem.
 - c) L-subgeny, což jsou genové segmenty, které kódují signální peptid lehkých i těžkých řetězců. Každému V-subgenu předchází L-subgen, který je od V subgenu oddělen nekódující sekvencí: Existuje tolik L subgenů, kolik je V-subgenů.
 - d) Před každým L-subgenem se nachází promotor, který je aktivní až po vytvoření genu kódujícího lehký nebo těžký řetězec.
5. Přeskupování, které vede k tvorbě genů pro lehké řetězce se děje tak, že se V-subgen spojí s J-subgenem za vyloučení (delece) celého úseku mezi nimi, včetně všech V-subgenů a J-subgenů, které do tohoto konkrétního spojení nevcházejí. Zůstává zachována jen sekvence mezi L a V, V a C. Takto se vytvoří gen pro lehký řetězec, který má následující strukturu:

L – VJ – C,

kde L, VJ a C jsou exony, pomlčky jsou introny.

6. Přeskupování, které vede k tvorbě genů pro těžké řetězce, se děje podobně. Rozdíl je jen v tom, že se V-subgen spojí nejdříve s D-subgenem a ten pak s J-subgenem za vyloučení (delece) celého úseku mezi nimi včetně všech V-subgenů, D-subgenů a J-subgenů, které do tohoto konkrétního spojení nevstupují.. Zůstává zachována jen sekvence mezi L a V, V a C. Takto se vytvoří gen pro těžký řetězec, který má následující strukturu:

L – VDJ – C,

kde L, VDJ a C jsou exony, pomlčky jsou introny

7. Každý B-lymfocyt obsahuje jeden komplexní gen pro lehký řetězec a jeden gen pro řetězec těžký. Oba geny jsou opatřeny aktivním promotorem, odkud se přepisují do hnRNA, která podléhá posttranskripčním úpravám na 5' - a 3'-konci a nakonec sestřihu. Výsledná mRNA se překládá do jedné molekuly imunoglobulinového řetězce, který se signálním peptidem váže k endoplazmatickému retikulu. Po uskutečnění tohoto děje se peptid rozloží.

Přeskupování VDJC-subgenů je hlavním zdrojem úžasné rozmanitosti protilátek. (U myši se potenciálně může vytvořit 576 000 000 kombinací představující kompletní molekuly různých imunoglobulinů.) Tento počet se ještě dramaticky zvyšuje tím, že spojování subgenů neprobíhá často přesně, takže se ve spojích nacházejí kodony pro jiné aminokyseliny, než jaké by tam měly být, kdyby spojení proběhlo přesně. A konečně, dalším zdrojem rozmanitosti protilátek jsou mutace (**somatické hypermutace**), které probíhají ve VJ-exonech, po stimulaci B lymfocytů antigenem.

Tato protilátková rozmanitost se tedy jeví jako výsledek čtyřstupňového procesu:

- (i) existuje mnoho různých subgenů (genových segmentů), které vytvářejí variabilní oblast imunoglobulinu, a při přeskupování subgenů se uplatňují různé kombinace. Tento mechanismus je podstatnou složkou diversifikace variabilních oblastí těžkých a lehkých řetězců.
- (ii) Dalším zdrojem kombinační diversity je párování různých kombinací variabilních oblastí těžkých a lehkých řetězců, které vytvářejí vazebné místo pro antigen.
- (iii) Další diversifikace se vytváří při spojování různých genových segmentů jako výsledek rekombinačního procesu.

- (iv) Somatické hypermutace vnášejí do vytvořených genů pro variabilní oblast bodové mutace. To je jediný způsob, kterým může být měněna specifita imunoglobulinu po rekombinačním vytvoření funkčních genů pro těžké a lehké řetězce.

Genový klastr pro IgH (těžký řetězec) je u člověka lokalizován na **chromozómu 14q32** (viz obrázky).

Genový klastr pro IgLκ (lehký řetězec kapa) je u člověka lokalizován na **chromozómu 2p12**.

Genový klastr pro IgLλ (lehký řetězec lambda) je u člověka lokalizován na **chromozómu 22q11**.

Hlavní histokompatibilitní komplex (MHC)

Je známo, že při transplantaci orgánů, tkání a kožních štěpů obvykle dochází k odhojení transplantátu. Rovněž je známo, že úspěšnost transplantace je větší, jestliže dárce je blízkým příbuzným příjemce. Tato tkáňová slučitelnost má genetický základ. Odhojení je výsledkem imunitní odpovědi určované přirozeně se vyskytujícími antigeny na povrchu buněk.

V tkáňové slučitelnosti (**histokompatibilitě**) se uplatňuje mnoho genových produktů, ale pro specifickou reakci buněk imunitního systému s antigenem má zásadní význam **hlavní histokompatibilitní komplex (MHC – main histocompatibility complex)**. Nachází se pouze u vyšších živočichů. U savců má délku asi 3 500 kb (přibližně 3,5 cM) a obsahuje velký počet genů. Hlavní histokompatibilitní komplex člověka se označuje **HLA komplex** (podle human leukocyte antigens), skotu **BoLA**, prasete **SLA**, koně **ELA**, ovce **OLA**, atp. **Molekuly kódované geny MHC jsou lokalizovány v buněčných membránách všech jaderných buněk** (tj. nejsou přítomny na erytrocytech savců). Uplatňují se při předkládání antigenů (peptidových fragmentů) buňkám imunitního systému a při rozpoznávání cizích a vlastních komponent organismu.

MHC komplex se skládá ze tří podoblastí – třída I, třída III a třída II. Geny třídy III se nepodílejí na kódování histokompatibilitních antigenů, ale mnoho genů se uplatňuje v důležitých mechanismech nespecifické imunity, jako jsou komponenty komplementu, genová rodina TNF, genová rodina HSP70, a další.

T lymfocyty mohou detekovat přítomnost intracelulárních patogenů, protože infikované buňky vylučují na povrch peptidové fragmenty z rozložených proteinů patogenů. **Peptidy vázané na molekuly třídy I jsou rozpoznávány T lymfocyty CD8, a peptidy vázané na molekuly**

třídy II jsou rozpoznávány T lymfocyty CD4. Infekční agens se může množit v buňce buď v cytosolu a propojeném jaderném prostoru, nebo mnoho patogeních bakterií a někteří eukaryotní paraziti se množí v endozómech a lyzozómech. Buňky infikované baktériemi a viry množícími se v cytosolu jsou ničeny cytotoxickými T buňkami CD8. Funkcí T lymfocytů CD8 je ničit infikované buňky, čímž se zlikviduje zdroj nových virových částic a bakterií a hostitel se zbaví infekce.

CD8 a CD4 (CD = cluster of differentiation) jsou molekuly glykoproteinů na povrchu T lymfocytů. Jsou charakteristické pro příslušné třídy MHC komplexu (CD8 lymfocyty = exprese genů MHC třídy I; CD4 lymfocyty = exprese genů MHC třídy II).

Molekuly MHC třídy I a MHC třídy II člověka jsou glykoproteiny na povrchu buňky, které jsou podobné ve struktuře a funkci, ale liší se ve struktuře podjednotek. Molekuly třídy I jsou vytvářeny dvěma polypeptidovými řetězci, α , neboli těžkým řetězcem, kódovaným v MHC komplexu, a menším, nekovalentně asociovaným řetězcem, β_2 -mikroglobulinem, který není kódovaný z MHC komplexu. Pouze α řetězec je spojen s membránou. Molekula má čtyři domény; tři jsou vytvářeny α řetězcem a jedna β_2 -mikroglobulinem. Význačným rysem MHC molekul je struktura α_1 a α_2 domén, které vytvářejí žlábek, a to je vazebné místo pro vazbu peptidových antigenů (obraz).

Molekuly MHC třídy II jsou vytvářeny nekovalentním komplexem dvou řetězců α (α_1 a α_2) a dvou řetězců β (β_1 a β_2). Jak α , tak β řetězec je spojen s membránou. Struktura molekuly je podobná jako u molekul třídy I (obraz). Žlábek pro vazbu peptidu vytvářejí subjednotky α_1 a β_1 .

Bude dostatečné upozornit na tři funkční geny v MHC třídě I, a to A, B a C (u prasete jsou to SLA3, SLA 2 a SLA1).

V MHC třídě II jsou podoblasti DP, DQ a DR. Každá z těchto podoblastí obsahuje dva funkční geny; jeden z nich kóduje α řetězec (geny DPA, DQA a DRA) a druhý kóduje β řetězec (geny DPB, DQB a DRB)(u prasete gen DPB ještě nebyl identifikován). Ve třídě II jsou ještě nejméně tři další podoblasti (DM, DN a DO). DM podoblast (DMA a DMB) kóduje α a β řetězce, které vytvářejí molekulu podobnou proteinu třídy II (a class II-like molecule), která se podílí na modifikaci antigenu. DN podoblast obsahuje gen pro α řetězec (gen DNA – pozor! symbol genu; u prasete neidentifikován). DO podoblast obsahuje gen pro β řetězec (DOB).

Genomická organizace MHC komplexu prasete (SLA komplex) a člověka je ukázána na obrazech.

Význačným rysem MHC systémů všech studovaných druhů je **extrémní polymorfismus** (např. u člověka je 41 alel v A lokusu, 61 v B lokusu, 18 v C lokusu a 60 v jednom z DRB lokusů). Důsledkem tohoto polymorfismu je, že téměř každý jedinec má unikátní MHC genotyp, a prakticky je zanedbatelná šance, že dva náhodně vybraní jedinci budou mít stejnou sadu MHC alel. To je důvodem, proč je obtížné najít

vhodného dárce pro transplantace orgánů. Kombinace alel jednotlivých genů se dědí jako **haplotyp**, protože MHC lokusy se nacházejí v těsné vazbě.

MHC komplex se uplatňuje, kromě tkáňové inkompatibility, také v řízení imunitní odpovědi, v rezistenci k některým chorobám (např. Markova choroba u drůbeže), v reprodukci a ve vztahu k užitkovosti. U prasat byl prokázán efekt SLA oblasti na značný počet vlastností, jako hladina androstenonu (kančí pach), kvalita masa, růst, tloušťka hřbetního špeku, obsah intramuskulárního tuku, aktivita některých enzymů, vývoj reprodukčních orgánů u kanců a prasniček a některé další.

Krevněskupinové antigeny

Krevněskupinové antigeny (erytrocytární antigeny) jsou antigeny, které se nacházejí na povrchu červených krvinek. U hospodářských zvířat byly intenzívně studovány několik desetiletí. Většina těchto antigenů jsou glykoproteiny, které existují v různých formách lišících se v sekvencích sacharidových komponent vázaných na polypeptidový řetězec. Jelikož připojování sacharidových komponent je výsledkem enzymatického procesu, přičemž tyto enzymy jsou produkty genů, vyplývá z toho, že různé erytrocytární antigeny se dědí jako by samy byly skutečnými produkty genů. Všechny erytrocytární antigeny, které jsou výsledkem exprese alel jednoho genu, patří k jednomu **krevněskupinovému systému**. Obvykle jsou označovány různými písmeny nebo kombinacemi písmen.

U hospodářských zvířat ve většině případů nejsou v krvi přítomny přirozené protilátky proti erytrocytárním antigenům (vyjímkou je J systém u skotu a A systém u prasat). Proto je třeba protilátky získat **imunizací erytrocyty v rámci druhu (izoimunizace)**. Testování **krevních skupin** je pak založeno na využití specifických antisér (připravených vysycováním erytrocyty různých zvířat). Tak se získají specifická antiséra proti jednotlivým **krevním faktorům**, a jejich použitím je možno identifikovat jednotlivé alely v krevněskupinových systémech.

Příklad krevněskupinových systémů u prasat je ukázán na obraze.

Krevní skupiny nacházely donedávna významné uplatnění při ověřování původů hospodářských zvířat (u skotu, prasat a koní) a při četných genetických aplikacích. V současné době byly prakticky nahrazeny DNA markery, zejména mikrosatelity a některými jinými DNA polymorfizmy.

ERYTHROCYTE ANTIGENS IN PIGS

Systems	Blood factors	Alleles
A	A (A, Aw), 0 (0, -)	A ^A , A ⁰
B	Ba, Bb	B ^a , B ^b
C	Ca	C ^a , C ⁻
D	Da, Db	D ^a , D ^b
E	Ea, Eb, Ed, Ee, Ef, Eg, Eh, Ei, Ej, Ek, El, Em, En, Eo, Ep, Er, Es, Et	Ebdgkmps, Edegghkmnps, Eaeglms, Edefhkmnps, Ebdfkmps, Eaeflms, Edegklmps, Eaegils, Edegghjmnt, Eabgklps, Eabgkmps, Eaegmnops, Ebdgklps, Edegghjmnr, Eabgkmops, Ebdgjmt, Ebdgjmr
F	Fa, Fb, Fc, Fd	F ^{ac} , F ^{ad} , F ^{bc} , F ^{bd}
G	Ga, Gb	G ^a , G ^b
H	Ha, Hb, Hc, Hd, He	H ^a , H ^b , H ^{ab} , H ^{cd} , H ^{bd} , H ^{be} , H ⁻
I	Ia, Ib,	I ^a , I ^b
J	Ja, Jb	J ^a , J ^b , J ⁻
K	Ka, Kb, Kc, Kd, Ke, Kf, Kg	K ^{acf} , K ^{bf} , K ^{acef} , K ^{ade} , K ^{adeg} , K ⁻
L	La, Lb, Lc, Ld, Lf, Lg, Lh, Li, Lj, Lk, Ll, Lm	L ^{adhi} , L ^{begi} , L ^{bdfi} , L ^{agim} , L ^{adhjk} , L ^{adhjl}
M	Ma, Mb, Mc, Md, Me, Mf, Mg, Mh, Mi, Mj, Mk, Mm	M ^{ab(e)} , M ^{aem} , M ^{aejm} , M ^{ade(m)} , M ^b , M ^{bcd} , M ^{bedi} , M ^{bd} , M ^{bdg} , M ^{be(f)m} , M ^{cd} , M ^{cdi} , (M ^{cdk}), M ^d , M ^{djk} , M ^{dk} , M ^{ef} , M ^{efm} , M ^h , M ⁻
N	Na, Nb, Nc	N ^a , N ^b , N ^{bc}
O	Oa, Ob	O ^a , O ^b
P	Pa	P ^a , P ⁻

Konstrukce variabilních oblastí lehkého a těžkého řetězce z genových segmentů (subgenů)

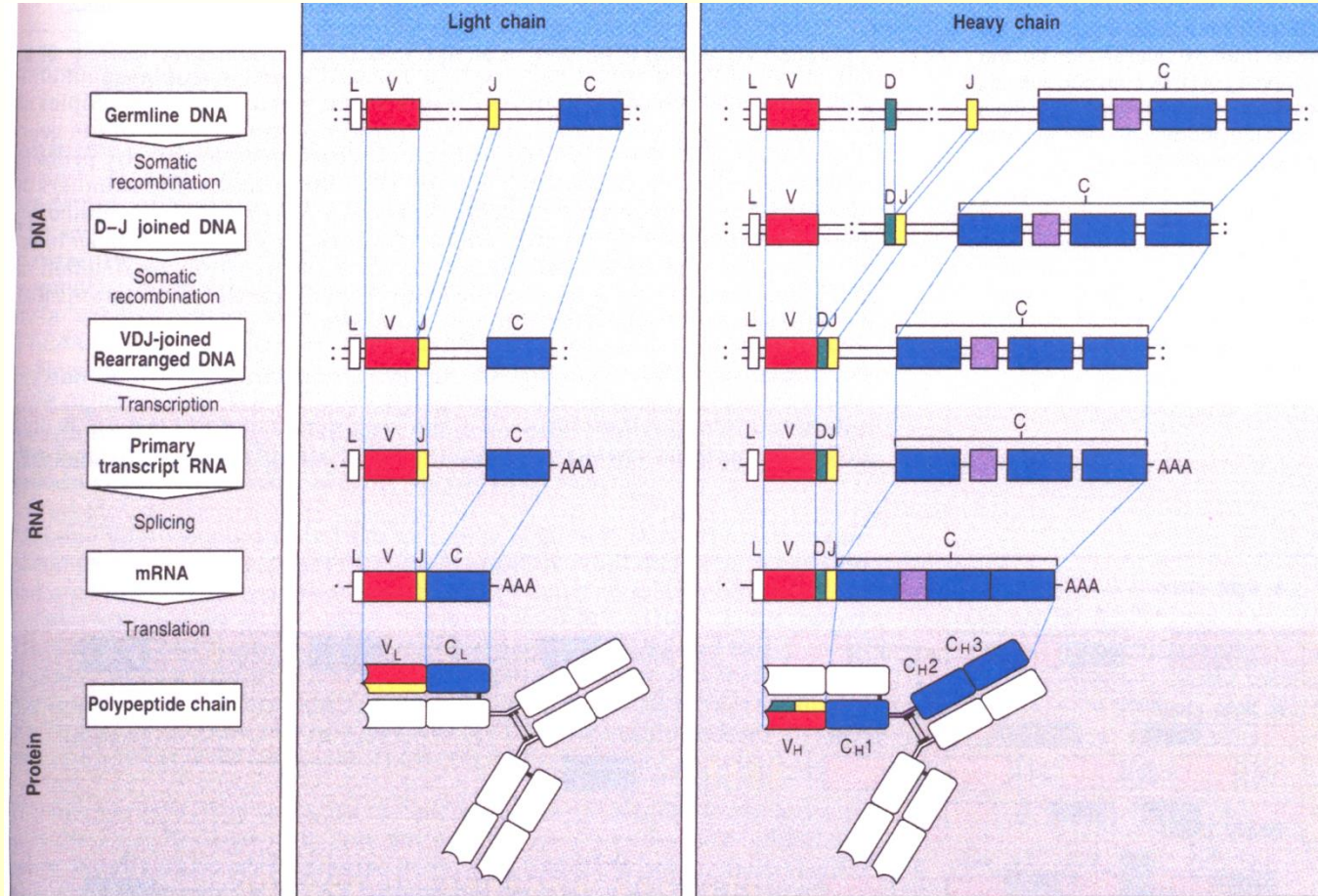


Fig. 3.13 Variable region genes are constructed from gene segments. Light-chain variable region genes are constructed from two segments (center panel). A variable (V) and a joining (J) gene segment in the genomic DNA are joined to form a complete light-chain variable-region gene. The constant region is encoded in a separate exon and is joined to the variable-region gene by RNA splicing of the light-chain message to remove the L to V and the J to C introns. Immunoglobulin chains are extracellular proteins and the V gene segment is preceded by an exon encoding a leader peptide (L), which directs the protein into the cell's secretory pathways and is then cleaved.

Heavy-chain variable regions are constructed from three gene segments (right panel). First the diversity (D) and J gene segments join, then the V gene segment joins to the combined DJ sequence, all at the genomic DNA level. The heavy-chain constant-region sequences are encoded in several exons: note the separate exon encoding the hinge domain (purple). The constant-region exons, together with the leader (L) sequence, are spliced to the variable-domain sequence during processing of the heavy-chain gene RNA transcript. Post-translational alterations remove the L sequence and attach carbohydrate moieties.

Počty funkčních genových segmentů (subgenů) pro variabilní oblasti těžkých a lehkých řetězců lidského imunoglobulinu

Number of segments in human immunoglobulin genes			
Segment	Light chains		Heavy chain
	κ	λ	H
Variable (V)	40	29	51
Diversity (D)	0	0	27
Joining (J)	5	4	6

Fig. 3.14 The numbers of functional gene segments for the variable regions of heavy- and light-chain in human DNA. These numbers are derived from exhaustive cloning and sequencing of DNA from one individual, excluding 44 pseudogenes. Owing to genetic polymorphism, they will not be the same for all humans.

Genomická organizace genových segmentů pro těžké a lehké řetězce imunoglobulinů člověka

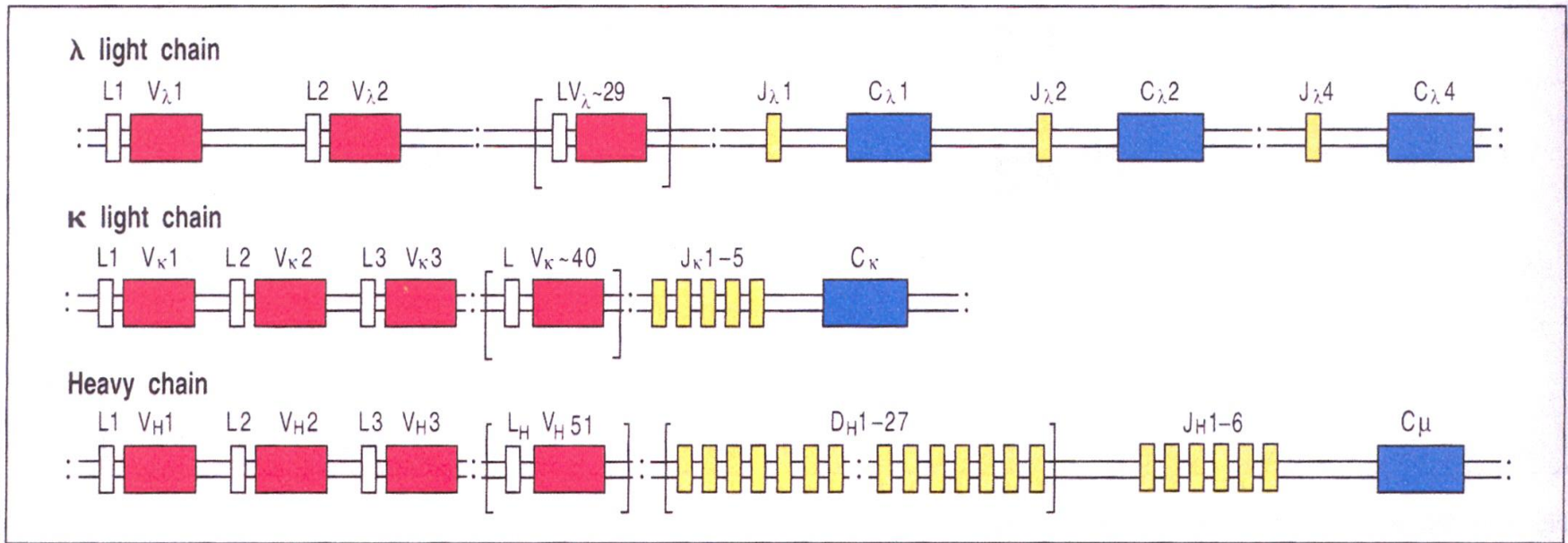


Fig. 3.15 The genomic organization of the heavy- and light-chain gene segments in humans. The upper row shows the gene locus for the λ light chain which has 29 functional V_{λ} gene segments and four pairs of functional J_{λ} segments and C_{λ} genes. The κ locus (middle row) is organized in a similar way, with 40 functional V_{κ} gene segments accompanied by a cluster of five J_{κ} segments but with a single C_{κ} gene. The heavy-chain gene locus (bottom row) has 51 functional V_H gene segments but, in addition, there is a cluster of around 27 D_H segments

lying between the 51 V_H gene segments and the 6 J_H gene segments. The heavy-chain locus also contains a large cluster of C_H genes that will be described in Fig. 3.24. For simplicity we have shown only a single C_H gene in this diagram without illustrating its separate exons, and have omitted pseudogenes. This diagram is not to scale: the total length of the heavy chain cluster is over 2 Megabases, while some of the D segments are only six bases long. L, leader sequence.

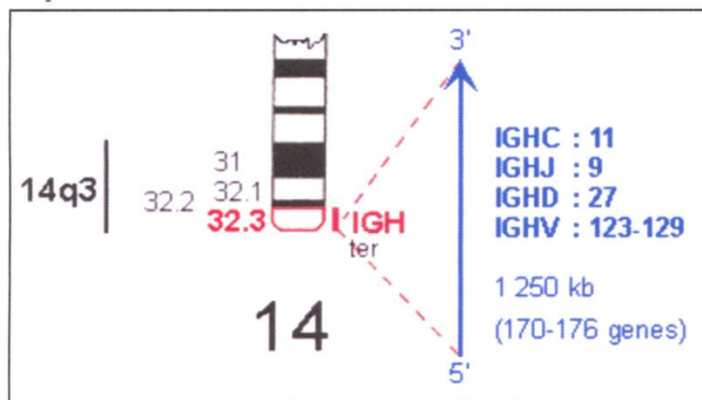
Lokalizace genového klastru IGH na lidském chromozómu 14q32.3

IGH (Immunoglobulin Heavy)

Identity

Note The human IGH locus is located on the chromosome 14 at band 14q32.33, at the telomeric extremity of the long arm; the orientation of the locus has been determined by the analysis of translocations, involving the IGH locus, in leukemia and lymphoma

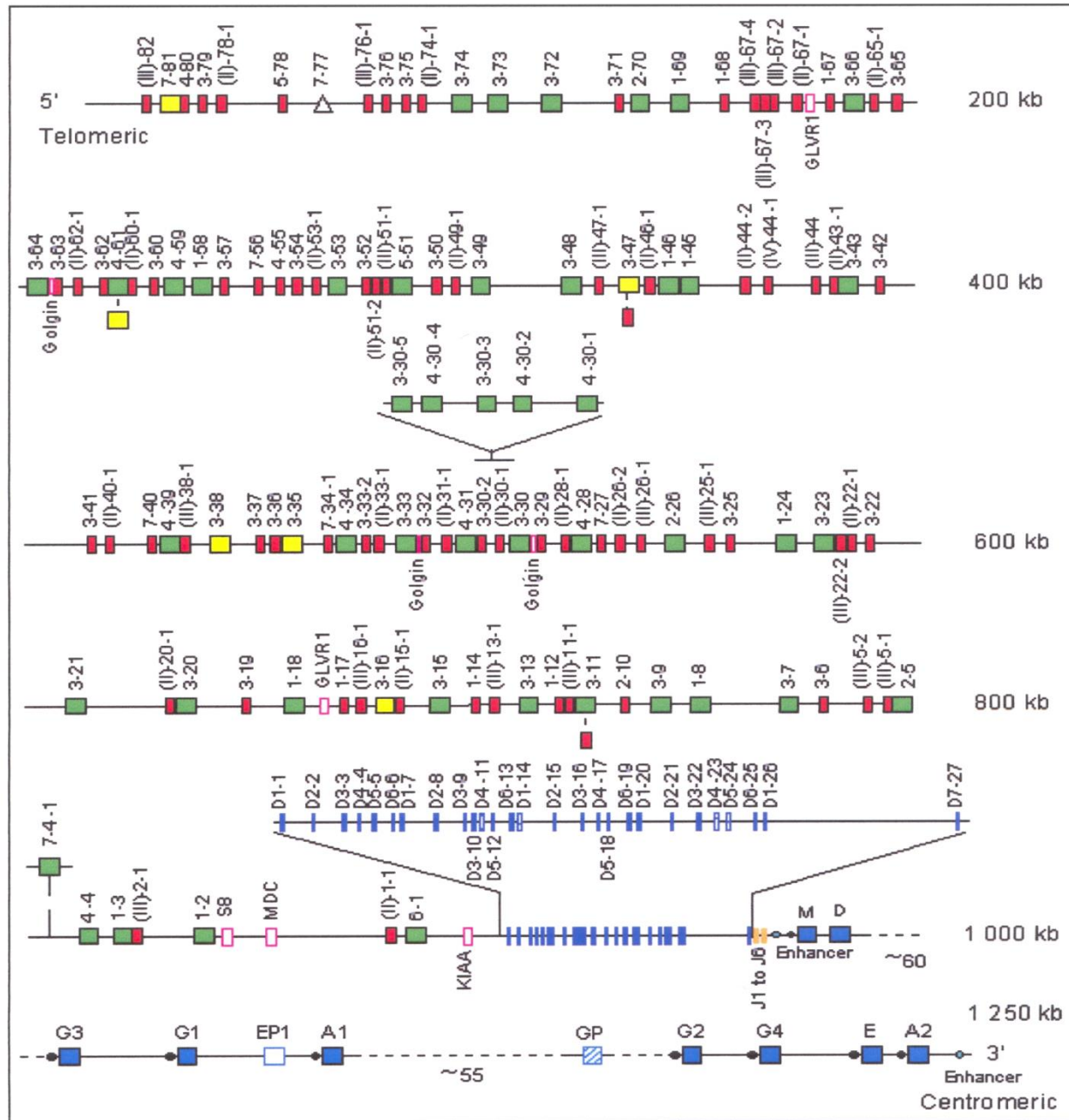
Hugo [IGH@](#)
Location 14q32.33



for complete Figure, see: [chromosome 14, IMGT \(The International ImMunoGeneTics information system ®\)](#) © Copyright 1995-2003 IMGT, IMGT is a CNRS trademark

Note The human IGH locus is located on the chromosome 14 at band 14q32.33, at the telomeric extremity of the long arm; the orientation of the locus has been determined by the analysis of translocations, involving the IGH locus, in leukemia and lymphoma

Organizace genového klastru IGH na lidském chromozómu 14q32.33 (1. část)



Organizace genového klastru IGH na lidském chromozómu 14q32.33 (2. část)

IGH

V-GENE: Green box: Functional; Yellow box: Open reading frame; Red: Pseudogene; Grey triangle: Not sequenced, not found.

D-GENE: Blue: Functional; Blue open box: Open reading frame.

J-GENE: Grey: Functional .

C-GENE: Blue: Functional; Blue dashed box: Open reading frame; Blue open box: Pseudogene.

GENES NOT RELATED: Purple open box: Pseudogene.

for complete Figure, see: [locus IGH, IMGT \(The International ImMunoGeneTics information system ®\)](#) © Copyright 1995-2003

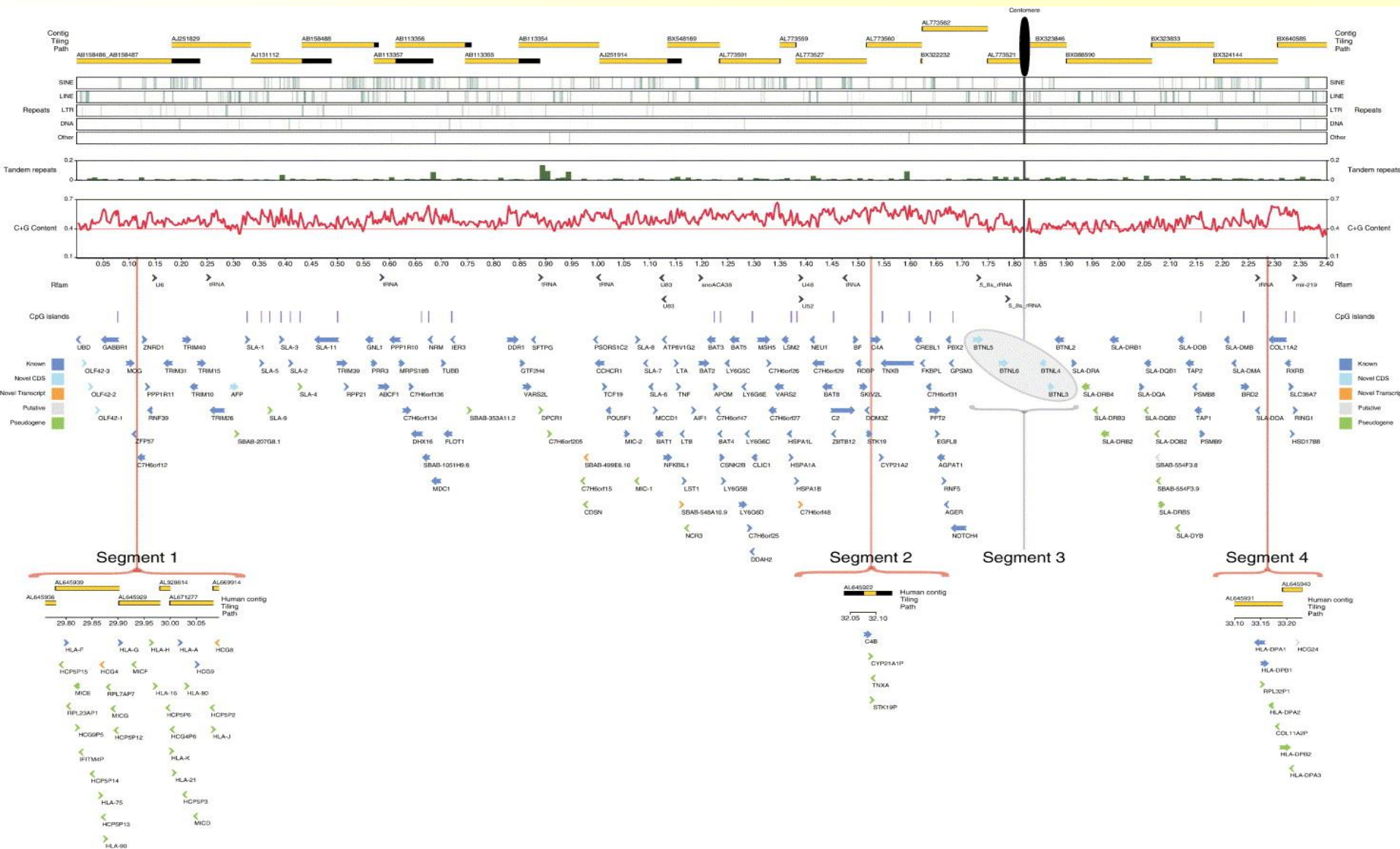
IMGT, IMGT is a CNRS trademark

Description

- The human IGH locus at 14q32.33 spans 1250 kilobases (kb). It consists of 123 to 129 IGHV genes, depending from the haplotypes, 27 IGHD segments belonging to 7 subgroups, 9 IGJ segments, and 11 IGHC genes.
- Eighty-two to 88 IGHV genes belong to 7 subgroups, whereas 41 pseudogenes, which are too divergent to be assigned to subgroups, have been assigned to 4 clans. Seven non-mapped IGHV genes have been described as insertion/deletion polymorphism but have not yet been precisely located.
- The most 5' IGHV genes occupy a position very close to the chromosome 14q telomere whereas the IGHC genes are in a more centromeric position.
- The potential genomic IGH repertoire is more limited since it comprises 38-46 functional IGHV genes belonging to 6 or 7 subgroups depending from the haplotypes 23 IGHD, 6 IGJ, and 9 IGHC genes.
- Thirty-five IGH genes have been found outside the main locus in other chromosomal localizations. These genes designated as orphans cannot contribute to the synthesis of the immunoglobulin chains, even if they have an Open Reading Frame (ORF). 9 IGHV orphans and 10 IGHD orphans have been described on chromosome 15 (15q11.2), and 16 IGHV orphans on chromosome 16 (16p11.2). In addition, one IGHC processed gene, IGHEP2 is localised on chromosome 9 (9p24.2-p24.1)
- This is so far the only processed Ig gene described. The total number of human IGH genes per haploid genome is 170 to 176 (206 to 212 genes, if the orphans and the processed gene are included) of which 77 to 84 genes are

Genomická mapa SLA komplexu (MHC komplex prasete)

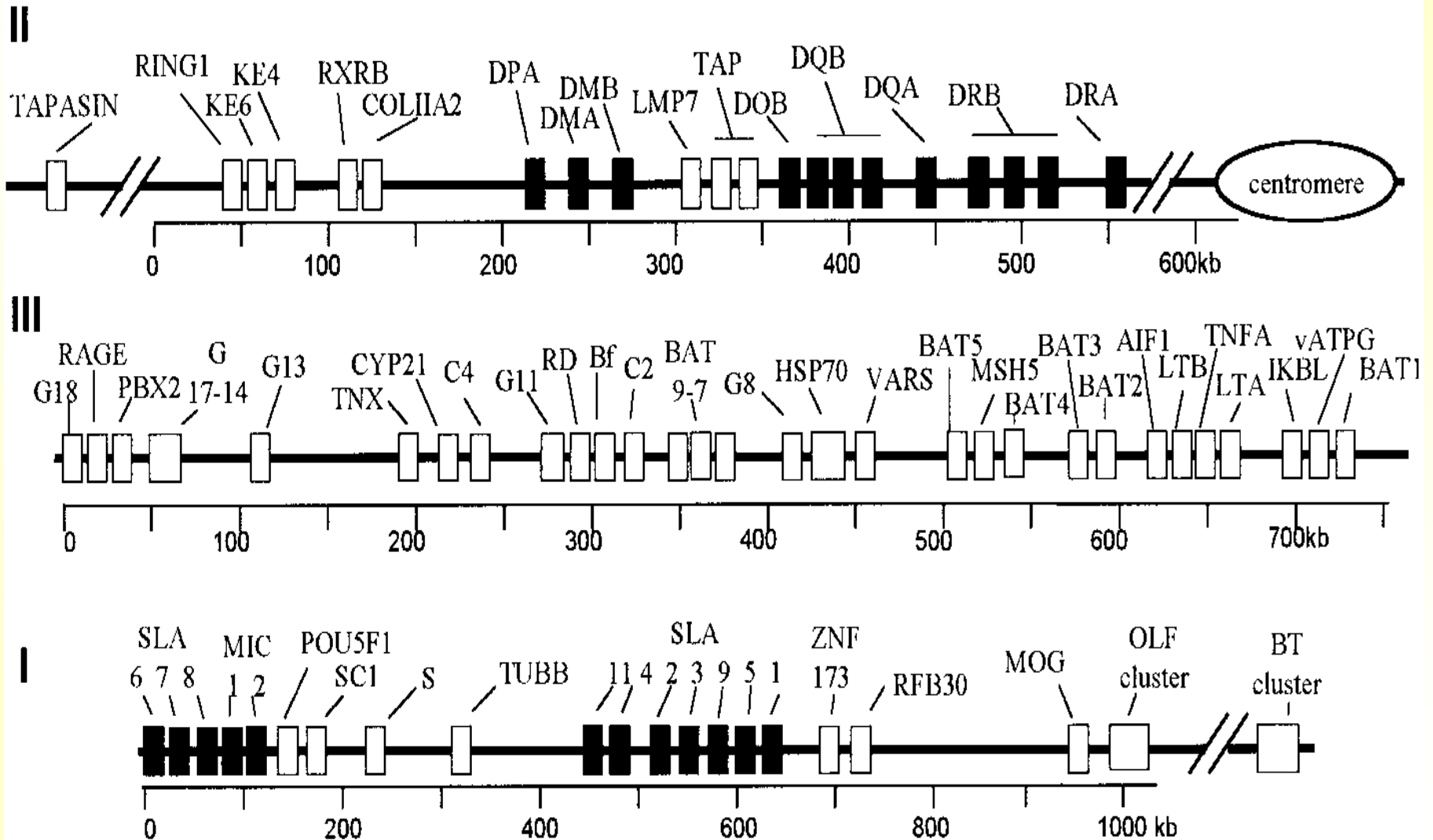
Each locus is annotated according to type, orientation, and position within the SLA. The tiling path of the sequenced BACs is shown on the top with overlaps shown in black. Below this, the distribution of repeats and C + G content across the region is shown. RNA genes identified using Rfam and CpG islands are also depicted. Segment 1 illustrates the section of the HLA class I region that is absent in pig. Segment 2 illustrates the HLA class III RCCX module absent in pig. Segment 3 highlights the porcine-specific *BTNL* cluster surrounding the centromere. Segment 4 illustrates the section of the HLA class II region containing the *DP* loci that is absent from pig.



Fyzická mapa SLA komplexu (prase)

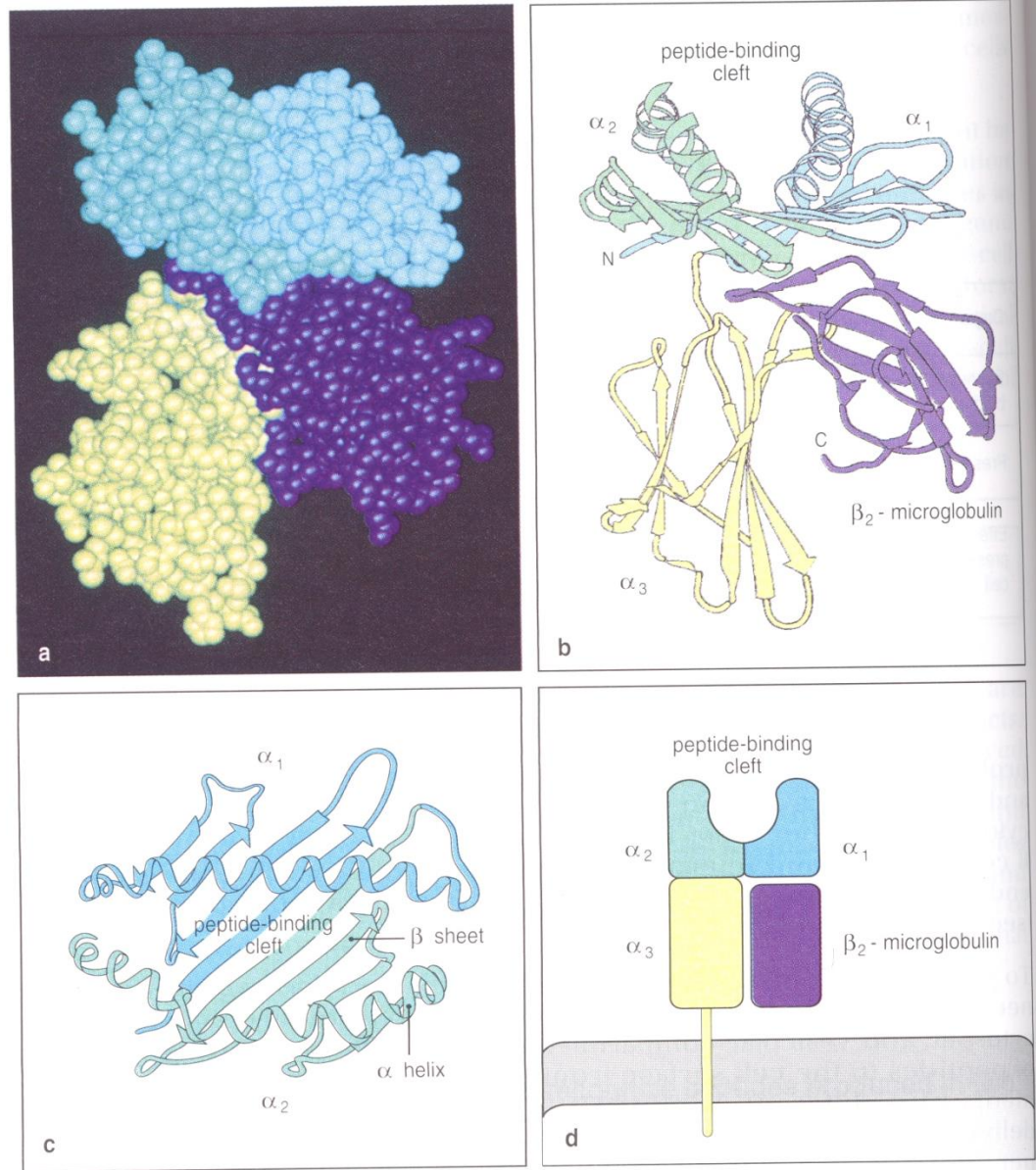
Black boxes: loci containing MHC-related sequences. White boxes: loci without MHC-related sequences. From the long arm to the short arm of chromosome 7, the order of the regions is class II (II), class III (III) and class I (I).

From the long arm to the short arm of chromosome 7, the order of the regions is class II (II), class III (III) and class I (I).



Struktura molekuly MHC třídy I člověka

Fig. 4.3 The structure of an MHC class I molecule, determined by X-ray crystallography. Panel a shows a computer graphic representation of a human MHC class I molecule, HLA-A2, which has been cleaved from the cell surface by the enzyme papain. Panel b shows a ribbon diagram of that structure. Shown schematically in panel d, the MHC class I molecule is a heterodimer of a membrane-spanning α chain (43 000 Da), non-covalently associated with β_2 -microglobulin (12 000 Da), which does not span the membrane. The α chain folds into three domains, α_1 , α_2 , and α_3 . The α_3 domain and β_2 -microglobulin show similarities in amino acid sequence to immunoglobulin constant domains and have a similar folded structure, while the α_1 and α_2 domains fold together into a single structure consisting of two segmented α helices lying on a sheet of eight antiparallel β -strands. The folding of the α_1 and α_2 domains creates a long cleft or groove, which is the site at which peptide antigens bind to the MHC molecules. The transmembrane region and the short stretch of peptide that connects the external domains to the cell surface are not seen in panels a and b as they have been removed by the papain digestion. As can be seen in panel c, looking down on the molecule from above, the sides of the cleft are formed from the inner faces of the two α helices, while the β -pleated sheet formed by the pairing of the α_1 and α_2 domains creates the floor of the cleft. We shall use the schematic representation in panel d throughout this text. Photograph courtesy of C Thorpe.



Struktura molekuly MHC třídy II člověka

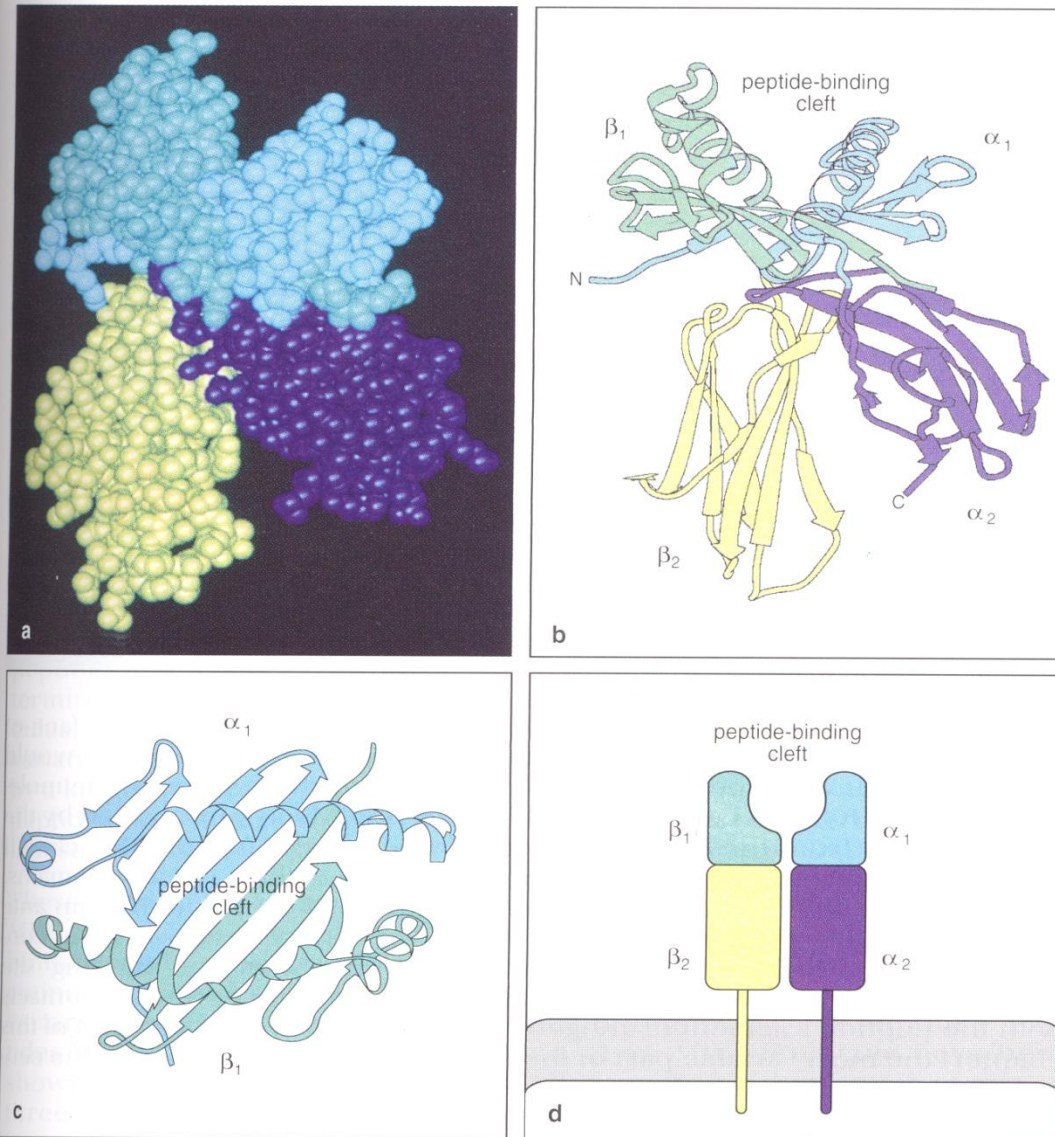


Fig. 4.4 MHC class II molecules resemble MHC class I molecules in structure. The MHC class II molecule is composed of two transmembrane glycoprotein chains, α (34 000 Da) and β (29 000 Da), as shown schematically in panel d. Each chain has two domains, and the two chains together form a compact four-domain structure similar to that of the class I molecule (compare with panel d of Fig. 4.3). Panel a shows a computer graphic representation of the MHC class II molecule, in this case, the human protein HLA-DR1; panel b shows the equivalent ribbon diagram. The α_2 and β_2 domains, like the α_3 and β_2 -microglobulin domains of the MHC class I molecule, have amino acid sequence and structural similarities to immunoglobulin constant domains; in the MHC class II molecule, the two domains forming the peptide-binding cleft are contributed by different chains, and are therefore not joined by a covalent bond (see panels c and d). Another important difference, not apparent in this diagram, is that the peptide-binding groove of the MHC class II molecule is open at both ends. Photograph courtesy of C Thorpe.

GMO

Geneticky modifikovaný organismus (GMO) je takový organismus, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací, t. j. cílenou změnou dědičného materiálu způsobem, kterého se nedosáhne přirozeně – např. křížením, šlechtěním. Patří sem např. mutace, produkce transgenních zvířat, aj.

GMO, do kterého byl metodami genového inženýrství vnesen gen jiného druhu, se označuje jako **transgenní organismus**.

Přenos genů do živočišných buněk

Živočišné somatické buňky mají omezený vývojový potenciál a za normálních okolností nemohou být využity pro produkci transgenních zvířat.

Transformace zárodečných buněk vyžaduje přenos do pluripotentních nebo totipotentních buněk, jako vajíčka, časná embrya nebo izolované zárodečné buňky (vyjíměčně transformace embryonální kmenové buňky nebo přenos somatických jader do enukleovaných oocytů). Změna genotypu vneseným transgenem může být přechodná nebo stálá, v závislosti na typu vektoru a osudu vneseného genetického materiálu.

Čtyři strategie přenosu genů do živočišných buněk:

- přímý přenos fyzikální transfekcí (mikroinjekce, elektroporace, ultrazvuk nebo bombardování částicemi). **Mikroinjekce** – injekce DNA do několika buněk v buněčné kultuře, do oocytů nebo buněk časného embrya. DNA může být injikována přímo do tkáně nebo do krve (kde je rychle degradována). **Elektroporace**: Po vystavení buněk krátkému elektrickému pulzu se v buněčné membráně vytvoří póry velikosti nanometrů. Těmito póry vstupuje do buněk DNA, která je transportována do jádra. Podobný mechanismus se uplatňuje při **ultrazvukové transfekci**. **Bombardování částicemi**: Malé kovové částice, na jejichž povrchu je DNA, se „vystřelují“ (např. vysokým tlakem plynu nebo elektrickým nábojem) do cílové tkáně.
- chemicky zprostředkovaná transfekce. **Koprecipitát DNA/fosforečnan vápenatý** přilne k buňce a následně je internalizován (endocytózou). DNA se pak uvolní a část pronikne do jádra a může se exprimovat. Nízká účinnost. **Transfekce při použití rozpustných komplexů polykationových sloučenin (polyplexy)**, které vytvářejí spontánní elektrostatické interakce s DNA (např. polyaminy – pozitivní náboj). **Lipofekce**: Použití směsi kationtových a neutrálních lipidů, které mohou vytvářet stabilní komplexy s DNA. Ty interagují s buněčnou membránou a následně se DNA dostává do buňky endocytózou.
- přenos genů pomocí virů (adenoviry, baculoviry, herpesvirus, retroviry aj.)
- přenos genů pomocí bakterií (bactofection): (zejména u rostlin – *Agrobacterium tumefaciens*). Tato bakterie byla použita pro přenos DNA i u člověka. Bakterie pronikne do hostitelské živočišné buňky, podlehne lýze a uvolní se plazmidová DNA. Plazmidová DNA se pak dostane do jádra, kde se inkorporuje do hostitelského genomu a je exprimována.

Dvě stádia transfekce:

- *vnesení DNA do buňky*
- *inkorporace do jádra a integrace do hostitelského chromozómu*

Většina transfektovaných buněk neintegruje cizí DNA. DNA se nachází v jádře v extrachromozómovém stavu, a když neobsahuje začátek replikace, který je funkční v hostitelské buňce, přežívá jen krátkodobě a je postupně degradována (přechodná, dočasná transformace; transient transformation). Jen v malé části transfektovaných buněk se DNA zabuduje do genomu a vytvoří nový genetický lokus, který se bude dědit (stabilní transformace).

Vytváření a vlastnosti konstruktů (pro vysokou expresi transgenu)

- kromě kódující sekvence je nutno připojit:
- silný konstitutivní promotor
- někdy je nutné včlenit intron (zejména při vytváření transgenních zvířat)
- včlenit polyadenylační signál a připojit několik set adenosinových zbytků (poly(A)konec)
- odstranit zbytečné nekódující sekvence (5' a 3'UTR)
- optimalizovat sekvenci v blízkosti iniciačního místa pro translaci
- inkorporovat signál pro cílovou organelu (např. sekvenci pro signální peptid)

Selekční marker – poskytuje vlastnost, která umožňuje transformovaným buňkám přežít v selekčních podmínkách.

Reportérový gen – je součástí konstruktů. Kóduje produkt, který může být prokázán při použití jednoduchého a levného testu. Testy pro zjištění aktivity reportérového genu jsou kvantitativní, takže mohou být použity pro zjištění účinnosti transformace (např. bioluminiscenční markery – luciferáza nebo zelený fluoreskující protein).

