Seminář o SNP genetických profilech psů

21.11.2023

Mgr. Markéta Dajbychová

Genomia s.r.o.
Republikánská 6
31200 Plzeň
laborator@genomia.cz
+420 3737 49999, www.genomia.cz

GENOMIA
genetic laboratory

Co je genetický profil

Genetický profil = DNA profil = genetický typ = genetický otisk prstu (DNA fingerprint)

Genetický profil je soubor DNA znaků, charakteristický výhradně pro daného jedince.

Je to jednoznačná celoživotní identifikace každého jedince.

GENOMIA genetic laboratory

K čemu slouží genetický profil

1) Nejspolehlivější celoživotní identifikace

- DNA profil změřený v okamžiku čipování slouží po celý život – pokud pes o čip přijde nebo se čip stane nefunkčním, ověří se identita pomocí DNA profilu

2) Ověření rodičovství a dalších rodinných vztahů

- běžná kontrola
- ověření po úmyslném nebo náhodném překrytí (více otců ve vrhu)
- ověření otce po inseminaci
- clear po rodičích

3) populační studie

- diverzita, heterozygozita, inbreeding

GENOMIA genetic laboratory

K čemu genetický profil neslouží

- neslouží k posouzení zdravotních a vizuálních dispozic nebo schopnostních předpokladů, nelze z něj vyčíst informaci o přítomnosti či nepřítomností kauzálních mutací

GENOMIA genetic laboratory

Dva technologické přístupy DNA profilování

STR (short tandem repeats), mikrosatelity
- objeveny 1984, od 90. let využívány pro identifikaci osob, po roce 2000 komerčně využíváno pro psy
- STR profil psa má 21 markerů (+12 markerů)

SNP (single-nucleotide polymorphism)
- profilování pomocí SNP umožnila metoda masivně paralelního sekvenování (publikováno 2000) = Next Generation Sequencing
- od 2004 komerčně využíváno v genetice osob, od 2020 komerčně využíváno v genetice psů
- SNP profil psa má 114 markerů (+117 markerů) → lépe se využívá pro diverzitu

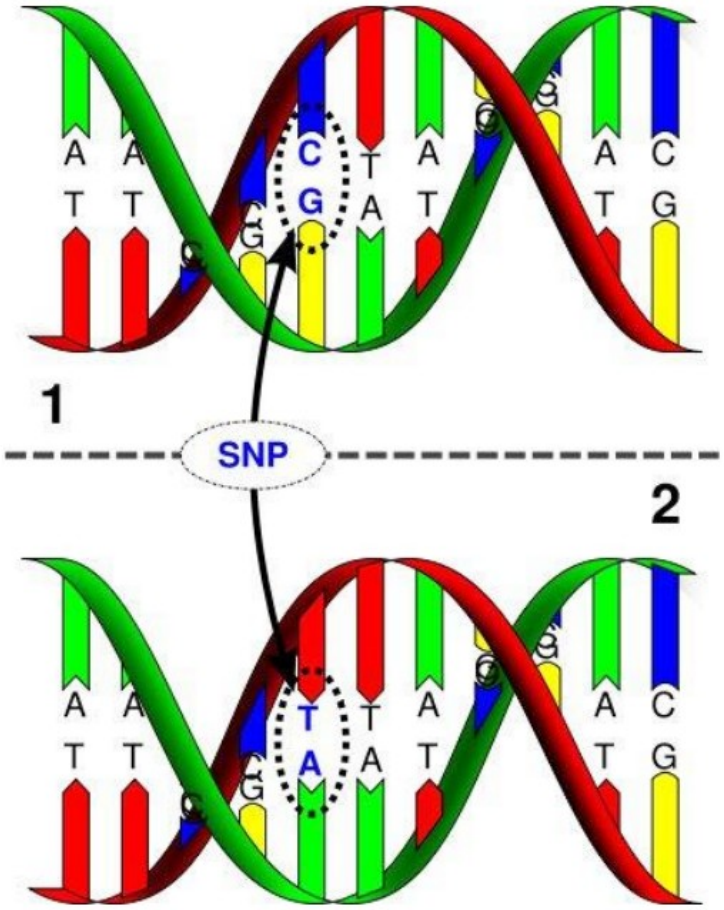
GENOMIA genetic laboratory

SNP genetický profil

Jednobodová záměna

Na jednom vlákně se náhodnou mutací zařadí např. místo C > T.

SNP C>T (nebo také G>A)



GENOMIA
genetic laboratory

SNP profil

Velký počet markerů (stovky), ale vždy jen tři možné varianty jednoho markeru:

- homozygot reference
- heterozygot
- homozygot varianta

Z technických důvodů jsou voleny bodové záměny jen A>G nebo C>T.

Je zaveden jednotný reportovací úzus TOP formát vztažený k jednotnému vláknu určené referenční sekvence.

V reportovaném SNP profilu obvykle chybí některé markery – je to běžné kvůli povaze metody. Počty reportovaných markerů jsou ale stále dostatečné pro vyhodnocení parentity. (guideline v ISAG2012)

Na každém chromozomu leží několik markerů → kompletní pokrytí, reprezentativní zastoupení pro posouzení heterozygotnosti a diverzity.

Náhled části výsledku SNP profilu

Marker	Genotyp	Marker	Genotyp	Marker	Genotyp
AH0JFQR	AA	AH0JFQS	AA	AH1SDW1	AA
AH1SDWZ	AG	AH21B26	AA	AH21B29	AA
AH3999C	CC	AH5I8FN	AA	AH5I8FO	AG
AH5I8FP	AG	AH704R2	AA	AH704R4	AG
AH892YB	AA	AHABH35	AG	AHBKF99	AG
AHBKGAB	AG	AHBKGAE	AA	AHCTEGK	AG
AHD2CMU	AA	AHFBAS1	GG	AHFBASY	AG
AHGJ8Y9	AA	AHGJ8ZA	AA	AHHS65D	AA
AHHS65F	GG	AHHS65H	AA	AHI15BO	CC
AHKA3HV	AA	AHLJ1N3	AG	AHMSZUB	GG
AHMSZUD	AA	AHN1X0K	AG	AHN1X0L	AG
AHPAV6S	---	AHPAV6U	AA	AHQJUC0	---
AHQJUC2	GG	AHRSSI9	AA	AHS1QPG	AA
AHS1QPH	AA	AHUAOVN	AA	AHVJM1W	AG
AHVJM1X	AA	AHVJM1Y	GG	AHWSK74	AG
AHWSK76	AA	AHX1JD9	GG	AHZAHKM	AA
Amelogenin	---	BICF2G630102146	AA	BICF2G630111735	AA
BICF2G630122583	AG	BICF2G630133028	AG	BICF2G630133994	AG
BICF2G630149030	AG	BICF2G630159183	AA	BICF2G630187658	AG
BICF2G630200354	AG	BICF2G630209373	GG	BICF2G630220326	AA
BICF2G630221287	GG	BICF2G630264994	GG	BICF2G630271966	AA
BICF2G630274628	AG	BICF2G630276039	AA	BICF2G630276136	AG
BICF2G630306265	GG	BICF2G630307199	AA	BICF2G630326688	GG
BICF2G630328323	AA	BICF2G630340940	GG	BICF2G630340944	GG
BICF2G630365778	CC	BICF2G630409193	AA	BICF2G630437783	AC

GENOMIA
genetic laboratory

Jak je to s parentitou

Určení rodičovství je možné díky porovnání jednotlivých genetických profilů matky, otce a potomka. Profily musí být měřeny ve shodném standardu – vše ISAG2006 nebo vše ISAG2020.

Potomek má ve svém genetickém profilu ve všech markerech jednu alelu od otce a jednu od matky. Vždy se tedy s jedním rodičem musí shodnout v jedné hodnotě daného markeru a s druhým rodičem v druhé hodnotě daného markeru a to ve všech markerech.

GENOMIA
genetic laboratory

Jak je to s parentitou ze SNP profilů

Marker Přepni zobrazení	Potomek 23-42609		Matka 23-42612		Otec 23-42608	
AH0JFQR	A	G	A	A	A	A
AH0JFQS	A	A	A	A	A	G
AH1SDW1	A	G	A	G	A	A
AH1SDWZ	A	G	A	A	A	G
AH21B26	A	A	A	G	A	A
AH21B29	A	A	A	A	A	A

Okometrické porovnání je velmi náročné, až nemožné, vzhledem velkému k množství markerů
→ pro porovnání se využívá se software

GENOMIA genetic laboratory

Parentita, když každý profil pochází z jiné laboratoře?

Laboratoře pracující dle ISAG pravidelně absolvují mezilaboratorní kontrolu kvality, což ověřuje, že všechny vyhodnocují DNA profily shodně → jejich výsledky lze vzájemně porovnávat

→ pro ověření rodičovství lze dodat DNA profil naměřený v jiné laboratoři (je doporučeníhodné, aby laboratoř uspěla v ranku 1 v ISAG kontrolách kvality)

- STR profily z jiných laboratoří lze dodat tištěně nebo pdf
- SNP profily je třeba dodat tištěně nebo v pdf a současně i v csv (datový formát umožňující import/export do softwarů používaných k porovnávání DNA profilů). Csv laboratoře vydávají na požádání.

GENOMIA genetic laboratory

Populační studie

SNP profily lze dobře využívat pro populační studie, protože obsahují velké množství markerů rovnoměrně rozložených napříč všemi chromozomy. Mám-li databázi SNP profilů plemene, mohu zjišťovat jeho diverzitu (česky rozmanitost) a heterozygotnost.

To jsou nástroje, které odpovědní chovatelé mohou využívat k udržování a zvyšování genetické rozmanitosti a zajištění dlouhodobého zdraví budoucích generací. Snahou by mělo být vybrat chovný pár tak, aby se pokud možno minimalizoval inbreeding (česky páření mezi geneticky podobnými jedinci).

Diverzita

Genetická rozmanitost odráží stupeň inbreedingu v plemeni.
Čím je genetická rozmanitost nižší, tím více jsou zvířata plemene geneticky příbuzná.
Čím je vyšší stupeň inbreedingu v populaci (tj. dochází k inbreeding depresi), tím více se v plemeni akumulují recesivní dědičné znaky, které velmi často způsobují onemocnění.

Aktuální stav diverzity jednotlivých plemen psů odráží míru inbreedingu, kterému bylo plemeno v minulosti vystaveno. Pokud k inbreedingu nedocházelo, je populace plemene geneticky rozmanitá, má větší diverzitu. K rozšíření inbreedingu mohlo docházet například nadměrným používání „oblíbených“ samců ke krytí.

GENOMIA genetic laboratory

Inbreedingová deprese

Inbreedingová deprese znamená, že dojde ke snížení biologické kondice jedince (biological fitness). Biologická fitness je schopnost organismu zajistit své přežití a udržet tak svůj genetický materiál.

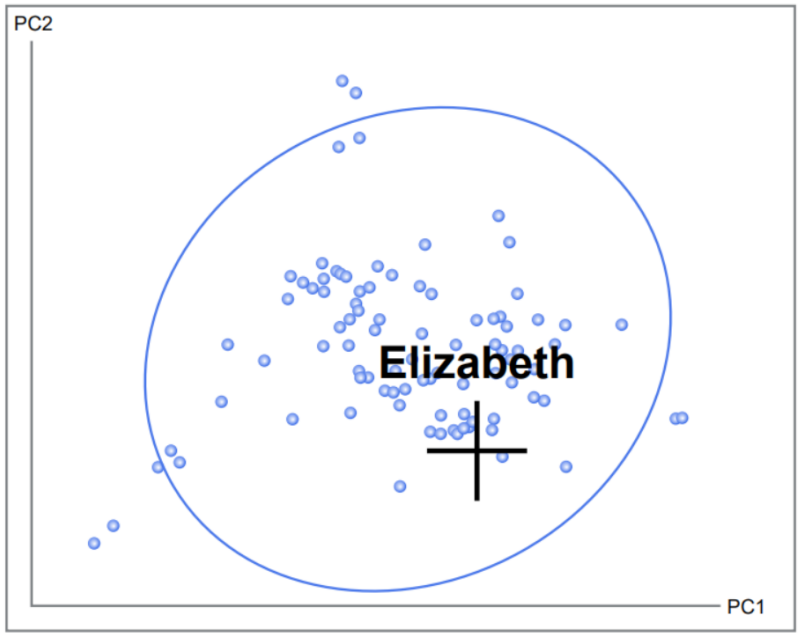
→ Typický projev inbreedingu je zvýšení recesivních vloh v populaci (genotyp a/a), což vede k projevení různých zdravotních problémů případně až k omezení přežitelnosti.

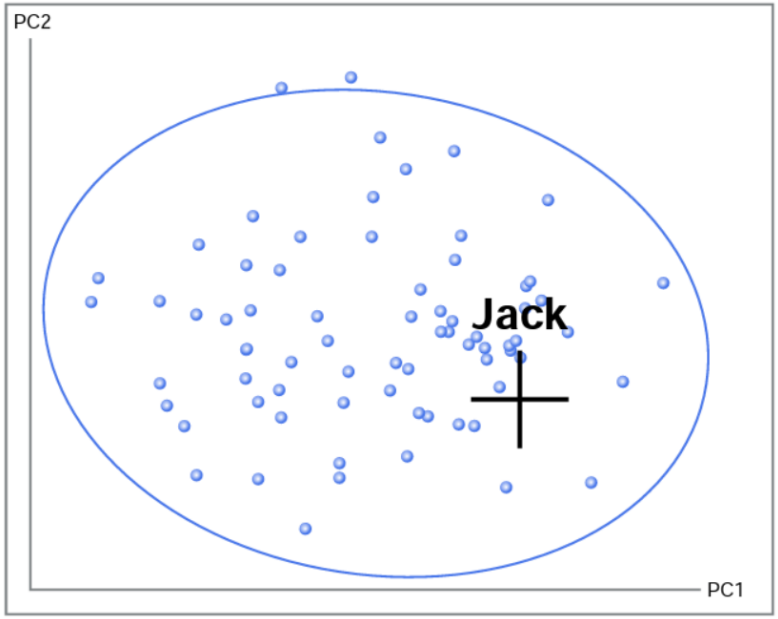
→ K inbreedingové depresi může dojít i mechanizmem overdominance, což znamená upřednostňování dominantních alel (genotyp A/A). To nevede k omezení přežitelnosti, ale jen ke snížení biologické kondice (projev na úrovní imunologické odolnosti jedinců a rozvoje autoimunitních problémů).

→ Nejvhodnější strategií je udržování vysoké heterozygotnosti populace (genotyp A/a).

SNP profily – nástroj kontroly diverzity

Graficky se diverzita znázorňuje PCA diagramy (metoda analýzy hlavních komponent – každá tečka odpovídá jednomu jedinci v populaci plemene, křížek označuje posuzovaného psa). Čím geneticky podobnější si jedinci jsou, tím jsou jejich tečky v grafu blíže u sebe.

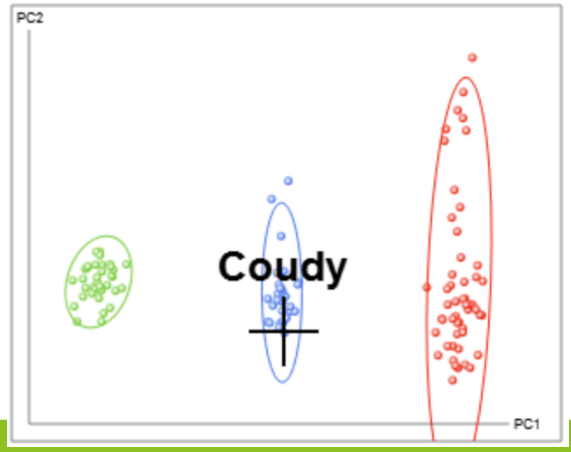




GENOMIA genetic laboratory

SNP profily – nástroj kontroly diverzity

PCA diagram se neustále vyvíjí, jak je testováno více a více jedinců daného plemene. Vzniká tak dynamický model, který aktuálně popisuje genetickou rozmanitost plemene.
Grafická modelace diverzity může být chovatelům nápomocna i při výběru chovného páru – optimální je hledat partnery ležící v grafu dál od sebe. Jejich potomstvo poté vytvoří další tečky v grafu, které se budou nacházet na spojnici teček rodičů a budou oscilovat přibližně v polovině spojnice (zelené tečky popisují znaky jednoho rodiče, červené tečky popisují znaky druhého rodiče, modré tečky popisují znaky potomstva).



GENOMIA genetic laboratory

SNP profily – nástroj kontroly heterozygotnosti

Míra heterozygotnosti ukazuje na genetickou variabilitu jednotlivce. Každý jedinec zdědí polovinu DNA od matky a polovinu od otce. Čím méně příbuzní rodiče jsou, tím vyšší může být heterozygotnost potomků.

Heterozygotnost udává kolik procent SNP markerů má jedinec v heterozygotním stavu (např. A/G), tj. zdědil jinou hodnotu od matky a jinou od otce.

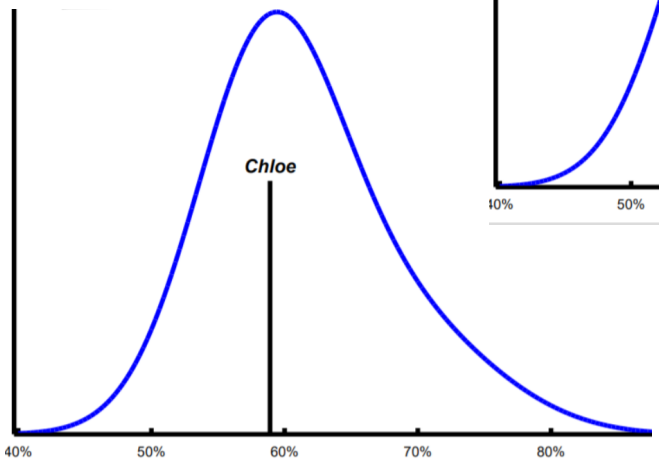
Psi s vysokým stupněm heterozygotnosti uvnitř plemene jsou obvykle méně ovlivněni inbreedingem než psi s nízkým stupněm heterozygotnosti.

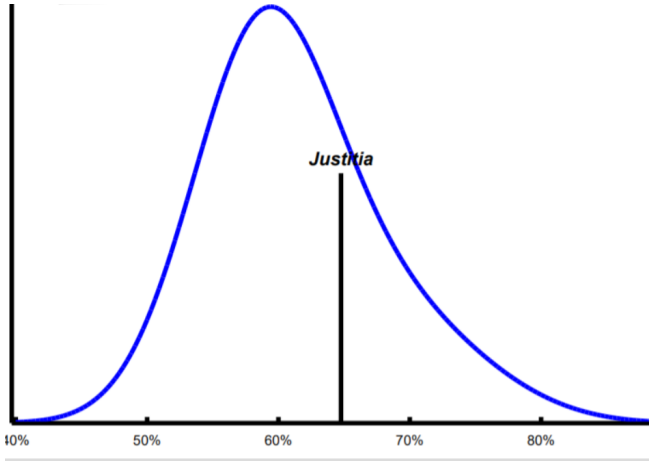
Logicky, mnohem vyšší stupně heterozygotnosti mají psí kříženci než čistokrevná plemena.

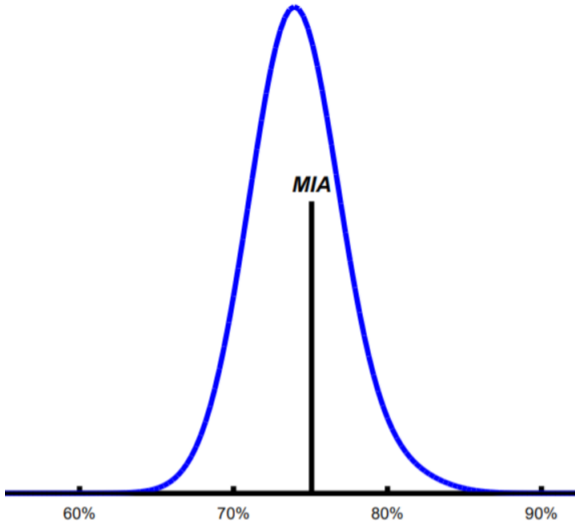
GENOMIA genetic laboratory

SNP profily – nástroj kontroly heterozygotnosti

V rámci plemen mívá znázornění heterozygozity tvar Gaussova rozdělení, přičemž nejvyšší bod grafu odpovídá průměrné heterozygotnosti plemene. Každý jedinec je pak zakreslen do grafu u hodnoty odpovídající jeho individuální heterozygotnosti.







GENOMIA genetic laboratory

SNP profily – nástroj kontroly heterozygotnosti

Z míry heterozygotnosti jedince nelze vyvodit závěr o jeho zdraví ani vzhledu (méně heterozygotní pes neznamená více nemocný pes).

Udržování vyšší genetické variability je součástí odpovědné chovatelské strategie, ale nelze jej posuzovat izolovaně. Výběr chovného páru je výsledek zvážení mnoha faktorů.

GENOMIA genetic laboratory

Srovnání ISAG2006 a ISAG2020

ISAG2006	ISAG2020
21 markerů (+ 12)	114 markerů (+ 117)
STR	SNP
3x rychleji mutující	
nepokrývá všechny chromozomy	rovnoměrnější pokrytí chromozomů
lze použít pro ověřování rodičovství i jiných rodinných vazeb	lze použít pro ověřování rodičovství i jiných rodinných vazeb
vyhodnocení paternity zvládne znalý laik	k vyhodnocení paternity je třeba software

GENOMIA genetic laboratory

ISAG2006	ISAG2020
horší použití pro populační studie	lze lépe použít pro populační studie s cílem kontrolovat inbreeding plemene (kvůli velkému množství markerů a lepšímu pokrytí genomu):
	genetická diverzita plemene – jak moc jsou si jedinci v rámci plemene podobní, kteří jsou si podobnější a kteří jsou geneticky rozdílnější
	zjištění heterozygotnosti plemene a individuální heterozygotnost jedince (menší hetrozygotnost je často výsledkem většího inbreedingu)

GENOMIA genetic laboratory

ISAG2006	ISAG2020
levnější metoda	dražší metoda
cena analýzy se s množstvím vzorků nemění, naopak roste pracnost	cena analýzy klesá s počtem testovaných vzorků při stejné pracnosti
v jednom čase se změří 4-16 vzorků (dle velikosti analyzátoru)	velká výkonnost – v jednom čase změří mnoho markerů (231 markerů SNP profilu) u mnoho vzorků (stovky)
lze změřit STR profil vzorku za jeden den	sekvenování jednoho až stovek vzorků probíhá tři dny
analýza probíhá častěji (zatím)	vzorky se do analýzy sbírají, analýzy probíhají v delších časových intervalech (zatím)

GENOMIA genetic laboratory

ISAG2006	ISAG2020
vysoká náročnost na odbornost personálu pro vyhodnocení naměřených dat	automatizace vyhodnocování naměřených dat
vyhodnocení dat a vydání výsledku dat dobré kvality trvá cca 20 min	vyhodnocení dat a vydání výsledku dat dobré kvality trvá cca 3 min
dostačuje běžná kancelářská počítačová vybavenost	nutné výkonné počítače a velká úložiště dat
servis sekvenátoru stojí deseti tisíce ročně (do 50tis Kč)	servis sekvenátoru MPS stojí sta tisíce ročně (kolem 250tis Kč)

GENOMIA genetic laboratory

ISAG2006	ISAG2020
	trend měřit hodně znaků u hodně vzorků najednou za málo hand-on času s potřebou menšího množství vysoce školených odborníků
	přístup preferují velké laboratoře, investují do automatizace
omezení dostupnosti přístrojů, které umí analyzovat mikrosatelity	přístup podporují biotechnologické firmy
VÝHLED	
vzhledem k ruční pracnosti a odborné náročnosti lze očekávat nárůst ceny, aby byla metoda znevýhodněna	postupně přechod klubů na plošné SNP profilování → výhody populačních dat, které pomohou omezovat inbreeding
	více vzorků a více laboratoří, které SNP měří → zlevnění metody

GENOMIA genetic laboratory

Přechod z ISAG2006 na ISAG2020

Metody poběží dlouhou dobu paralelně vedle sebe (jistě 5 let, možná až 10 let).

Bohužel, někteří psi budou mít změřené oba profily → vícenáklad :-(

Vzorky testované na STR jsou téměř vždy archivovány → v budoucnu bude možné rodiče porovnat s potomkem, který bude mít SNP → dotestuje se rodiči SNP z uloženého vzorku.

Existující databáze STR profilů není k ničemu – lze kontrolovat existující linie, ale hlavně již existuje databáze DNA vzorků, se kterou lze pracovat → podklad pro výzkum nemocí plemene, podklad pro převod na ISAG2020 a populační studie.

Doporučujeme zjistit pravidla klubu v zemi původu plemene – jak profilují, jaké mají plány…, aby postupy byly synchronizované.

GENOMIA genetic laboratory

Přechod z ISAG2006 na ISAG2020

Uvažuje-li klub nyní o povinném profilování, nechť začne s ISAG2020. Začal-li profilovat nedávno, nechť přejde co nejrychleji na ISAG2020, „bude to méně bolet“, populační data budou jistou satisfakcí :-)

Některé kluby mají povinnost doložit při bonitaci DNA profil, a ověření rodičovství provádějí jen u podezřelých případů; některé kluby mají povinnost doložit při bonitaci ověření rodičovství.

GENOMIA genetic laboratory

Přechod z ISAG2006 na ISAG2020

1) povinný profil

Zde je přechod na ISAG2020 relativně nenáročný.

Pokud bude u podezřelého případu rodičovství rozkol v typu profilu, kooperující strana dotestuje chybějící typ nebo se v řádu klubu stanoví, že klub může nařídit otestování druhého typu profilu s vědomím majitele psa, ale bez jeho souhlasu (jednou už majitel psa dodal STR pro uchovnění, tak s profilováním souhlasil, teď se jen profil převede na porovnatelný formát → postup ukotvit v řádu).

Vhodný mechanizmus je také ten, že nekooperující strana prohrává (odmítnutí spolupráce znamená přiznání nekalého krytí).

GENOMIA genetic laboratory

Přechod z ISAG2006 na ISAG2020

2) povinné ověření rodičovství

Zde výrazně vzrostou náklady, neboť určitá „generace“ bude mít oba typy profilů, aby byla zajištěna kontinuita.

Vícenáklad lze chovatelům kompenzovat slevou na nějakém poplatku nebo jinou výhodou.

Lze dočasně (nebo trvale) přejít na povinnost doložit pouze profil, nikoliv ověření rodičovství, a ověřovat rodičovství jen u podezřelých případů.

GENOMIA genetic laboratory

Genomia se snaží přechod usnadnit

V březnu a září 2024 budou probíhat akce na dotestování SNP profilů psům, kteří mají povinný profil a mají jen STR.

Kluby a chovatelé mají možnost nahlásit perspektivní chovné jedince, které z jejich pohledu stojí za to převést na SNP profil.

Genomia provede dotestování SNP profilu se slevou 42 %. Podmínkou je existující STR profil, vhodná kvalita a množství DNA uloženého vzorku.

Objednávku dotestování musí nahlásit zákazník, který je na zprávě STR profilu, přes online registrační formulář (bude otevřen měsíc předem).

Převedením dostatečného počtu psů na SNP (min 30) bude možné zahájit modelaci diverzity a heterozygozity plemene a začít tak sledovat populační studie plemene.

GENOMIA genetic laboratory

Ceny testování pro 2024

STR profil 1350 Kč, s klubovou slevou **1215 Kč**

SNP profil 1690 Kč, s klubovou slevou **1521 Kč**

SNP profil k balíčku testů pro plemeno 1350 Kč, s klubovou slevou 1215 Kč

GENOMIA genetic laboratory

Děkuji za pozornost, těšíme se na spolupráci s vaším chovatelským klubem

v případě dotazů nás kontaktujte:
laborator@genomia.cz

GENOMIA
genetic laboratory