JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

# Genetické markery asociované s technologickou a výživnou hodnotou kravského mléka

Vedoucí bakalářské práce: Ing. *et* Ing. Božena Hosnedlová, Ph.D.

Autor bakalářské práce: Kateřina Pavelcová

České Budějovice, 2016

# PROHLÁŠENÍ O PŮVODNOSTI

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce na téma: **Genetické markery asociované s technologickou a výživnou hodnotou kravského mléka,** a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných zemědělskou fakultou) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 20.4.2016

..……...

Kateřina Pavelcová

# PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat paní doktorce Boženě Hosnedlové za cenné rady, důležité informace, vstřícnost, trpělivost a čas, který mi věnovala.

## ABSTRAKT

Práce pojednává o technologicky a výživově zajímavých genetických markerech, genech ovlivňujících mléčnou užitkovost a kvantitativní parametry mléka. Nejvýznamnější genetické markery zahrnují geny asociované s množstvím a kvalitou mléčných proteinů a mléčného tuku. Genetické markery mohou pomoci ve šlechtitelských programech pro zpřesnění selekce žádoucích zvířat.



**Klíčová slova**: skot, mléko, složení mléka, polymorfizmus, kasein, marker



## ABSTRACT

The thesis deals with technologically and nutritionally interesting genetic markers, genes affecting milk yield and milk quantity parameters, with the emphasis on genes associated with the quantity and quality of milk proteins and milk fat. Genetic markers can help in breeding programs for more accurate selection of desirable animals.



**Keywords**: cattle, milk, composition of milk, polymorphism, casein, marker

# Obsah


**1. Úvod ..... 7**

**2. Cíl ..... 8**

**3. Literární přehled ..... 9**

**3.1 Genetické markery ..... 9**

**3.1.1 Rozdělení genetických DNA markerů ..... 9**

**3.2 Genetika skotu ..... 11**

**3.2.1 Studium genů podmiňujících mléčnou užitkovost ..... 13**

**3.3 Mléčná žláza a složení kravského mléka ..... 14**

**3.3.1 Mléčný tuk ..... 15**

**3.3.2 Mléčné bílkoviny ..... 15**

**3.4 Technologické zpracování mléka ..... 18**

**3.5 Geny kódující mléčné bílkoviny ..... 19**

**3.5.1 Gen $\alpha_{S1}$-*kasein* (*CSN1S1*) ..... 20**

**3.5.2 Gen $\alpha_{S2}$-*kasein* (*CSN1S2*) ..... 22**

**3.5.3 Gen *β-kasein* (*CSN2*) ..... 23**

**3.5.4 Gen *β-κ-kasein* (*β-κ-CN*) ..... 24**

**3.5.5 Gen *κ-kasein* (*CSN3*) ..... 25**

**3.5.6 Gen *α-laktalbumin* (*LALBA*) ..... 26**

**3.5.7 Gen *β-laktoglobulin* (*LGB*) ..... 27**

**3.6 Geny související se syntézou mléčného tuku ..... 29**

**3.6.1 Gen pro acylCoA:diacyglycerol acyltransferázu (*DGAT1*) ..... 29**

**3.6.2 Gen pro stearoyl-koenzym A desaturázu (*SCD*) ..... 30**

**3.7 Geny zahrnuté v hormonální signalizaci produkce mléka ..... 32**

**3.7.1 Gen pro růstový hormon (*GH*) ..... 32**

**3.7. 2 Gen pro receptor pro růstový hormon (*GHR*) ..... 33**

**3.7.3 Gen pro inzulinu podobný růstový faktor 1 (*IGF-1*) ..... 34**

**3.7.4 Gen *prolaktin* (*PRL*) ..... 35**

**3.7.5 Gen pro signální protein STAT5A a STAT5B (*STAT5A* a *STAT5B*) ..... 36**

**3.7.6 Gen pro fibroblastový růstový faktor 2 (*FGF2*) ..... 38**

**3.7.7 Gen pro transkripční faktor hypofýzy (*POU1F1*) ..... 39**

**3.8 A1 a A2 mléko a jeho vliv na lidské zdraví ..... 40**
**3.9 Závěr ..... 42**

**4. Seznam použité literatury ..... 44**

**5. Seznam použitých zkratek ..... 55**

# 1. Úvod

Kravské mléko je složeno z biologických složek v různém poměru a liší se mezi plemeny i v rámci plemene odlišnými nutričními a technologickými vlastnostmi. Je hlavním zdrojem živin pro mláďata i pro výživu člověka. Vhodnost mléka pro výrobu různých mléčných výrobků závisí na jeho složení. Po mnohá staletí bylo kravské mléko zpracováváno na mléčné výrobky, jako jsou máslo, jogurt a sýr. Pro výrobu sýrů je důležitý vysoký podíl kaseinů.

Množství mléka a proteinů v mléce slouží jako prioritní kritérium selekce dojeného skotu. Identifikace genů kódujících mléčné bílkoviny je velmi důležitá především v zemích a regionech, kde sýrařský průmysl zaujímá významnou pozici na trhu. Kvalita suroviny a její technologické vlastnosti výrazně ovlivňují jakost a hodnotu výtěžnosti konečného výrobku i výši ekonomického zisku.

V procesu šlechtění skotu je nezbytné se zaměřit na zlepšování nejen kvantitativních, ale především kvalitativních parametrů mléka, což by mělo vést ke snižování nákladů na produkci kvalitní finální suroviny. V současné době se ve šlechtění stále více využívá molekulárně genetických metod, především pak analýzy markerů ovlivňujících ukazatele mléčné produkce. Využití těchto markerů pozitivně ovlivňuje efektivitu a rentabilitu jak prvotní produkce mléka, tak i následného sýrárenského zpracování. Současný trend vědeckých studií zabývajících se mléčnou užitkovostí u skotu poukazuje na důležitost analýzy QTL pro mléčnou užitkovost.

# 2. Cíl

Cílem práce je zpracovat literární přehled zabývající se charakteristikou nejvýznamnějších genetických markerů majících vztah k technologické a výživné hodnotě mléka a jeho vhodnosti pro technologické zpracování především v sýrařství.

# 3. Literární přehled

## 3.1 Genetické markery

Genetickým markerem se rozumí fenotypový znak, protein, gen nebo sekvence DNA (Vignal *et* al., 2002).

Genetické DNA markery jsou libovolné geny nebo polymorfizmy přesně známé lokalizace, s jejichž pomocí lze identifikovat pozici neznámého genu. Byly nalezeny v určitých místech genomu a jsou přenášeny z jedné generace na druhou (Ruane and Sonnino, 2007). Odhalování polymorfizmu na úrovni DNA hraje klíčovou roli v genetice zvířat (Vignal *et* al., 2002).

Použití polymorfních genů jako genetických markerů se jeví jako slibná náhrada za tradičně uplatňované metody selekce. Efekt selekce závisí na frekvenci jednotlivých alel u různých plemen skotu a na vlivu těchto polymorfizmů na selektované vlastnosti a znaky (Lukač *et* al., 2013).

### 3.1.1 Rozdělení genetických DNA markerů

Z pohledu lokusů kvantitativních znaků (QTL; Quantitative Trait Loci) dělíme genetické DNA markery na 2 typy (Urban, 2008):
1. typ: Přímé markery - kódující exprimované geny - vyznačují se nízkou hladinou polymorfizmu. Využívají se v komparativním mapování.

2. typ: Nepřímé markery - jde o polymorfizmy, které nemají vliv na projev znaku, ale jsou ve vazbě s QTL. Dělí se na dvě skupiny:

a) vysoce variabilní sekvence DNA - patří sem krátké tandemové repetice tzv. mikrosatelity (STR; Short Tandem Repeats) a minisatelity (VNTR; Variable Number Tandem Repeats). Vyznačují se vysokým stupněm polymorfizmu. Hlavní využití mají při populačních studiích, určování rodičovství, identity a tvoří základ pro vazbové mapování genů, např. QTL.

b) jednonukleotidové polymorfizmy (SNP; Single Nucleotide Polymorphism) - markery v kódujících nebo častěji nekódujících sekvencích, ve kterých byl odhalen polymorfizmus podmíněný záměnou jedné báze v DNA.

Podle metod analýzy dělíme DNA markery do dvou skupin (Urban, 2008):

1. Založené na hybridizaci - RFLP
2. Založené na polymerázové řetězové reakci (PCR), kterou amplifikujeme náhodnou nebo specifickou sekvenci DNA (RAPD, AFLP, SSCP)

Nejčastěji používané techniky pro DNA typizaci genů kódujících mléčné bílkoviny jsou polymorfizmus délky restrikčních fragmentů (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism) a polymorfizmus konformace jednořetězcové DNA (SSCP; Single-Strand Conformation Polymorphism). Tyto techniky vyžadují vysokou kvalitu a kvantitu DNA, jestliže velikost amplikonu nepřekročí 200 bp (Shalla *et* al., 2014).

RFLP je metoda zjišťující změny v sekvenci DNA, které mohou být detekovány po štěpení vzorků DNA pomocí specifických enzymů (restrikčních endonukleáz). Většina RFLP markerů je kodominantních (obě alely u heterozygotních jedinců jsou detekovány) a vysoce lokusově specifických. Fragmenty vzniklé štěpením DNA se separují elektroforézou v agarózovém gelu. Jako RFLP sondy se nejčastěji používá fragment genomické DNA nebo cDNA (komplementární DNA) (Bruford *et* al., 2003; NCBI, 2015).

Náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD; Random Amplified Polymorphic DNA) je založena na PCR amplifikaci genomové DNA za pomoci oligonukleotidů s náhodnou sekvencí. RAPD nevyžaduje zvláštní znalosti sekvence DNA cílového organismu na rozdíl od tradičních analýz PCR. Desetinukleotidový primer buď amplifikuje, nebo neamplifikuje segmenty DNA podle toho, na kterých místech je primer se sekvencí komplementární. Různě amplifikované DNA úseky tvoří na gelu odlišné vzory (Mbwana *et* al., 2006; NCBI, 2015).

Polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism) je technika, díky které lze snadno provádět

screening variací celého genomu. Tato metoda může být velmi užitečná při analýze meziplemenných rozdílů (Toro *et* al., 2009).

Nedávné pokroky v detekci SNP umožňují různé způsoby genotypizace polymorfizmů. Jedna z těchto technik je SNaPshot genotypizace, která byla optimalizována ke genotypování SNP v bovinních genech, mezi něž patří *$\alpha_{S1}$-kasein* (*$\alpha_{S1}$-CN*), *β-kasein* (*β-CN*), *κ-kasein* (*κ-CN*), *α-laktalbumin* (*α-LA*) a *β-laktoglobulin* (*β-LG*). SNaPshot genotypizace je nově optimalizovaný, rychlý a efektivní screeningový postup, který by mohl poskytnout přesnější predikci plemenných hodnot u zvířat určených k selekci (Shalla *et* al., 2014).

Dále se jako genetické markery využívají alozymy, mitochondriální DNA a mikrosatelity. Alozymy, enzymy kódované různými alelami jednoho genu, byly prvními markery využívanými pro výzkumné analýzy u hospodářských zvířat (Liu and Cordes, 2004).

Mitochondriální DNA (mtDNA; mitochondrial DNA) markery jsou velmi užitečné k fylogenetickým analýzám. mtDNA se dědí maternálně bez rekombinací, a proto rozdíly v počtu nukleotidů v mitochondriálním genomu přímo odráží genetickou vzdálenost. Mutuje 5−10 krát častěji než jaderná DNA, proto lze studovat divergenci mezi divokou a domácí populací v průběhu domestikace (Bruford *et* al., 2003).

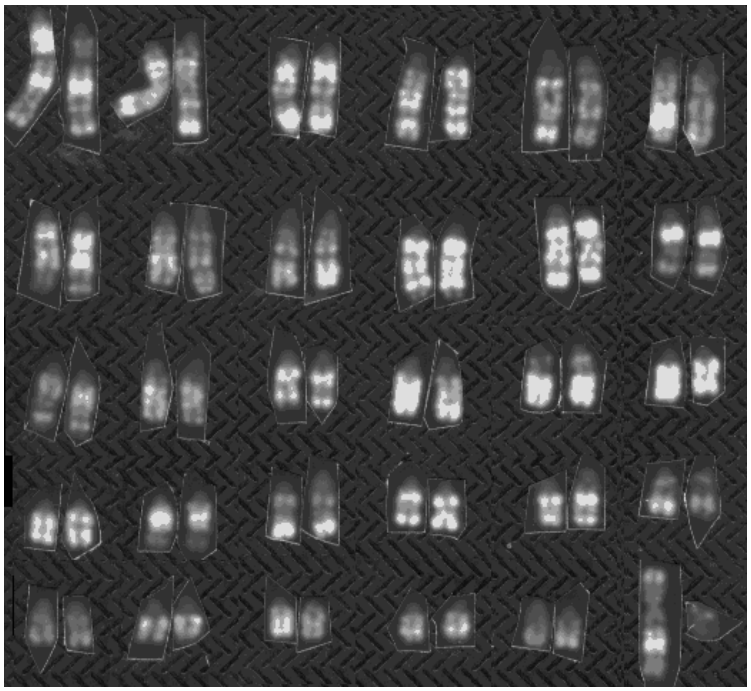
V posledních letech je genetická variabilita studována pomocí mikrosatelitů. Mikrosatelity jsou krátké opakující se sekvence, které vykazují vysokou míru polymorfizmu a jsou proto vhodné pro studium variability v rámci i mezi plemeny (Toro *et* al., 2009).

## 3.2 Genetika skotu

Poznání genomu skotu byl složitý úkol, na kterém pracovalo více než 300 vědců z 25 zemí světa. V roce 2009 bylo analyzováno celkem 22000 genů. Zmapování genomu skotu by mohlo vést k revoluci ve šlechtění. Nejvíce překvapující bylo zjištění, že domestikovaný skot (*Bos taurus*) sdílí zhruba 80 %

svých genů s člověkem, ale také organizace lidských chromozomů je bližší jejich uspořádání u domestikovaného skotu než u dalších zvířat (Beran, 2009).

Skot má 29 párů autozomů a jeden pár pohlavních chromozomů (X a Y) - (Obr. 1). Autozomy u skotu jsou akrocentrické a X- a Y- chromozomy jsou metacentrické (Weller *et* al., 2003).



**Obr. 1** Normální karyotyp skotu - býk (2n = 60, XY) (http://www.ihh.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetics/10/2.htm)

Bovinní DNA obsahuje $3\times10^9$ párů bází (bp). SNP významně asociovány se složením mléčných proteinů nebo s procentickým obsahem proteinů byly nalezeny na 31 genomových oblastech dvaceti bovinních autozomů (BTA, *Bos taurus* autosome) - (BTA 1, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28 a 29) (Schopen *et* al., 2011). SNP vysvětlují velký podíl fenotypové variance pro složení mléčných bílkovin a mohou být velmi užitečné při selekci zvířat, která produkují mléko s požadovanými technologickými vlastnostmi (Huang *et* al., 2012).

Bylo zjištěno, že každý bovinní chromozom (BTA) ovlivňuje 1–4 znaky mléčné produkce a pro každou vlastnost byly nalezeny QTL průměrně na třech BTA (Weller *et* al., 2003). V genomu skotu jsou hlavní oblasti QTL spojované se složením mléčných proteinů umístěné na BTA 5, 6, 11 a 14 (Caroli *et* al., 2009).

V QTL databázi skotu je celkem popsáno 7091 QTL. Z toho 1298 QTL je pro mléčnou produkci, 200 QTL pro množství mléka, 279 QTL pro obsah mléčného proteinu, 118 QTL pro produkci mléčných proteinů a 116 QTL pro produkci mléčného tuku (NAGRP, 2015). Cílem identifikace genů pomocí mapování QTL není pouze objasnit účinek těchto genů a pochopit podstatu QTL, ale také využít zjištěných informací ve šlechtitelské praxi (Viitala *et* al., 2006).

### 3.2.1 Studium genů podmiňujících mléčnou užitkovost

Pro studium genů podmiňujících mléčnou užitkovost se využívá metoda Markery asistovaná selekce (MAS; Marker Assisted Selection). Tato metoda umožňuje identifikovat počet markerů rozptýlených v genomu, které nás zajímají a pomocí nich lze detekovat jejich spojitost s důležitými vlastnostmi (Ruane and Sonnino, 2007). MAS může být nejlépe využitelná pro znaky s nízkou dědivostí (Lukač *et* al., 2013).

Genomická selekce (GS; Genomic Selection) využívá oproti MAS mnohonásobně více markerů. Tato metoda spočívá ve vyhledávání polymorfizmu DNA na úrovni SNP. Nezaměřuje se pouze na jedince, ale analyzuje zvířata napříč populací (Mukhopadhyay and Kumar, 2013). K hlavním přínosům genomické selekce patří zpřesnění odhadu plemenných hodnot (PH; breeding value), zkrácení generačního intervalu a zvýšená kontrola nad výskytem genetických defektů (Goddard and Hayes, 2007; Gassaway, 2011).

Chovatelé mohou ovlivňovat užitkovost hospodářských zvířat a vlastnosti zvyšující produkci ve stádech pomocí selekce jedinců na základě PH, přičemž nejvíce využívanou metodou je v současnosti odhad pomocí nejlepší lineární nevychýlené předpovědi (BLUP-AM; Best Linear Unbiased Prediction-Animal model). Ačkoliv se jedná o sofistikovanou selekční metodu, zohledňující vliv většiny faktorů, stále je třeba brát v potaz, že se jedná o odhad. Ten jakožto takový nikdy nemůže být tak přesný jako selekce na základě skutečného genetického založení jedince. V současné době je tedy selekce na základě konvenčních šlechtitelských postupů doplňována analýzou polymorfizmů se vztahem ke kvantitativním znakům mléčné užitkovosti (QTL) (Shahlla *et* al., 2014).

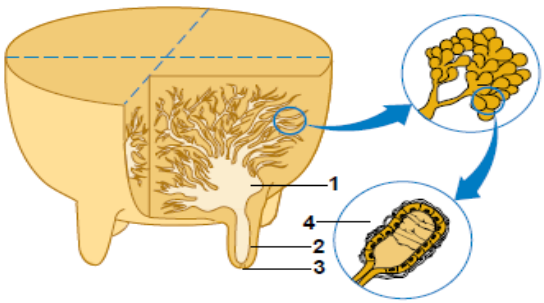
## 3.3 Mléčná žláza a složení kravského mléka

Mléko představuje nejdůležitější zdroj bílkovin a stopových prvků pro mláďata zvířat i pro člověka (Kamiński *et* al., 2007). Obsahuje živiny potřebné pro rostoucí organismus mláďat i organismus v dospělosti. Množství hlavních složek mléka se velmi liší mezi dojnicemi různých plemen. Vhodnost mléka pro výrobu mléčných výrobků, jako je máslo, jogurt a sýr závisí na jeho složení. Průměrné složení kravského mléka uvádí Tab. 1 (Bylund *et* al., 1995; Schopen *et* al., 2009).

**Tab. 1** Průměrné složení kravského mléka (Bylund *et* al., 1995)

| Složka | Obsah % |
|---|---|
| Voda | 85,5–89,5 |
| Sušina | 10,5–14,5 |
| Tuk | 2,5–6,0 |
| Bílkoviny | 2,9–5,0 |
| Laktóza | 3,6–5,5 |
| Minerální látky | 0,6–0,9 |

Kravské mléko je produkt mléčné žlázy samice tura domácího (*Bos primigenius f. taurus*) - Obr. 2. Uplatňováním cílené selekce mohou dojnice vyprodukovat až 14000 litrů za laktaci. Produkce mléka začíná obdobím prvního otelení, tj. ve věku jalovice 2–2,5 roku (Bylund *et* al., 1995, Šrubařová and Dvořák).




**Obr. 1** Průřez vemenem krávy (Bylund *et* al., 1995): 1 - mléčná cisterna, 2 - strukový kanálek, 3 - strukový svěrač a 4 – alveoly

### 3.3.1 Mléčný tuk

Složení mléčného tuku může u jednotlivých dojnic značně kolísat (Duchemin *et* al., 2013). Mléčný tuk je vylučován jako tzv. kapička mléčného tuku. Množství a složení mléčného tuku závisí na různých faktorech: plemeni, laktační fázi, genetickém založení jedince a složení krmné dávky. Mléčný tuk se skládá přibližně z 98 % triacylglycerolů a 1 % fosfolipidů (Argov-Argaman *et* al., 2013). Základní složkou tuku jsou mono-, di- a triglyceridy, mastné kyseliny, steroly, karotenoidy, vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E a K), stopové prvky a bioaktivní lipidy (Duchemin *et* al., 2013). Membrána tukových kuliček se skládá z fosfolipidů, lipoproteinů, glyceridů, proteinů, nukleových kyselin, enzymů, stopových prvků a vázané vody (Poulsen *et* al., 2012).

Složení mléčného tuku má velký vliv na kvalitu mléčných výrobků, protože ovlivňuje trvanlivost a kvalitu zpracovaného mléka. Větší obsah nenasycených mastných kyselin je výhodný z nutričního a zdravotního hlediska. Ceněný je především obsah kyseliny linolové a α-linolenové (Poulsen *et* al., 2012). Krátké a středně dlouhé řetězce mastných kyselin (C4:0 až C16:0), které jsou syntetizovány v mléčné žláze *de novo*, mají vysoký koeficient heritability (Bouwman *et* al., 2011; Duchemin *et* al., 2013), jsou tedy více ovlivněny genetickými faktory než dlouhé řetězce mastných kyselin, které pocházejí z krmné dávky nebo z mobilizace tělního tuku (Duchemin *et* al., 2013) a mají nízkou až střední dědivost (Bouwman *et* al., 2011).

### 3.3.2 Mléčné bílkoviny

Mléčné bílkoviny hrají klíčovou roli v nutriční kvalitě a technologických vlastnostech mléka (Gambra *et* al., 2013). Nutriční hodnota mléka je určena celkovým obsahem bílkovin, zatímco jeho technologická hodnota závisí na obsahu žádoucí frakce, zejména kaseinu, který představuje asi 75–85 % z celkového množství mléčných bílkovin. Studie mléčných bílkovin skotu mohou být využitelné jak v chovatelské praxi, tak i pro průmyslové zpracování mléka. Mléčné bílkoviny jsou ovlivněny alelami, jejichž frekvence se u jednotlivých plemen skotu liší, rozdíly jsou zjistitelné i mezi stády skotu v rámci jednoho plemene

(Czerniawska-Piatkowska *et* al., 2004). Obsah proteinů je jedním z parametrů zohledňovaných při výpočtu PH u dojeného skotu (Kamiński, 2004).

Molekula proteinu obsahuje okolo 100–200 aminokyselin. Proteiny se obecně skládají z přibližně 20 aminokyselin, v mléčné bílkovině se z nich vyskytuje 18 (Bylund *et* al., 1995). Kravské mléko má nízký obsah glycinu a naopak vysoký obsah kyseliny glutamové. Aminokyseliny se dělí z různých hledisek. Podle schopnosti syntézy aminokyselin v organismu byly rozděleny na nepostradatelné - esenciální Tab. 2, postradatelné - neesenciální Tab. 3 a polo-postradatelné - semiesenciální (Sabahelkheir *et* al., 2012). Aminokyseliny se skládají z aminoskupiny ($NH_2$) a karboxylové skupiny (COOH), které se váží na stejný atom uhlíku, tj. α-uhlík (Kamiński *et* al., 2007). Koncentrace jednotlivých frakcí mléčných bílkovin závisejí na polymorfních formách daného proteinu, které jsou dány záměnou jedné nebo více aminokyselin. Tyto malé změny v polypeptidovém řetězci mají významný vliv na chemické složení a fyzikálně-chemické vlastnosti mléčných bílkovin (Czerniawska-Piatkowska *et* al., 2004; Heck *et* al., 2009). Nutriční hodnota mléčných proteinů je ovlivněna skladbou aminokyselin a množstvím bioaktivních peptidů (Huang *et* al., 2012).

**Tab. 2** Esenciální aminokyseliny v kravském mléce (Sabahelkheir *et* al., 2012)

| **Esenciální aminokyseliny** | **mg aminokyseliny v 1 g celkového množství aminokyselin** |
|---|---|
| Lysin | 20,8 |
| Methionin | 9,6 |
| Fenylalanin | 71,9 |
| Threonin | 81,7 |
| Tryptofan | - |
| Histidin | 38,8 |
| Asparagin | - |
| Leucin | 130,1 |
| Isoleucin | 78,8 |
| Valin | 93,7 |

**Tab. 3** Neesenciální aminokyseliny v kravském mléce (Sabahelkheir *et* al., 2012)

| Neesenciální aminokyseliny | mg aminokyseliny v 1 g celkového množství aminokyselin |
|---|---|
| Kyselina asparagová | 80 |
| Serin | 49,7 |
| Alanin | 60,6 |
| Cystein | 14,3 |
| Tyrosin | 43,3 |
| Arginin | 15,7 |
| Kyselina glutamová | 186,8 |

Mléčné proteiny kravského mléka jsou směsí dvou hlavních typů proteinů, a to kaseinů, které tvoří zhruba 80 % z celkových mléčných proteinů a syrovátkových bílkovin, které tvoří cca 20 % ze všech bílkovin mléka (Velíšek, 2002, Kamiński *et* al., 2007). Složení mléčných proteinů uvádí Tab. 4.

**Tab. 4** Složení proteinů kravského mléka (Velíšek, 2002)

| Proteiny | Podíl v % | Obsah v g · $dm^{-3}$ |
|---|---|---|
| **Kaseiny celkem** | **80** | **25,6** |
| *$\alpha_S$-kasein* | 42 | 13,4 |
| *β-kasein* | 25 | 8 |
| *γ-kasein* | 4 | 1,3 |
| *κ-kasein* | 9 | 2,09 |
| **Proteiny syrovátky celkem** | **20** | **6,4** |
| *α-laktalbumin* | 4 | 1,3 |
| *sérový albumin* | 1 | 0,3 |
| *β-laktoglobulin* | 9 | 2,9 |
| *imunoglobuliny* | 2 | 0,6 |
| *polypeptidy* | 4 | 1,3 |

Mléčné bílkoviny jsou rozděleny na dvě skupiny v závislosti na jejich rozpustnosti při pH 4,6: na kaseiny a syrovátkové proteiny. Jejich rozdílné vlastnosti ukazuje Tab. 5. Nerozpustná frakce je tvořena čtyřmi kaseiny ($\alpha_{S1}$-, $\alpha_{S2}$-, β- a κ-kasein). Rozpustnou frakcí jsou syrovátkové proteiny, hlavními jsou α-laktalbumin a β-laktoglobulin (Ulutas *et* al., 2009, Šrubařová and Dvořák). Kasein tvoří 78–82 % bílkovin v kravském mléce a jeho množství představuje 2,5 % z celkového složení mléka. Kasein je velmi důležitým mléčným proteinem pro sýrařský průmysl (Czerniawska-Piatkowska *et* al., 2004; Azevedo *et* al., 2008). Kaseinová frakce se vypočítá jako součet $\alpha_{S1}$-, $\alpha_{S2}$-, β-, γ- a κ-kasein (Bonfatti *et* al., 2010a; Schopen *et* al., 2011).

**Tab. 5** Porovnání vybraných vlastností kaseinu a syrovátkových bílkovin (Šrubařová and Dvořák)

| Vlastnost | Kasein | Syrovátkové bílkoviny |
|---|---|---|
| Obsah hydrofobních a hydrofilních oblastí | obsahuje převážně hydrofobní oblasti | rovnováha mezi hydrofilními a hydrofobními zbytky |
| Obsah cysteinu a cystinu | obsahuje málo cysteinu | obsahují cystein a cystin |
| Struktura | v sekundárním uspořádání převažuje náhodná spirálovitá struktura | globulární struktura, převážně helikálního uspořádání |
| Teplotní stabilita | je teplotně stabilní | snadná tepelná denaturace |
| Vliv kyselých podmínek | nestabilní za kyselých podmínek | stabilní za mírně kyselých podmínek |

## 3.4 Technologické zpracování mléka

Složení mléčných bílkovin v kravském mléce je důležitým faktorem pro technologické zpracování mléka v mlékárenském průmyslu (Huang *et* al., 2012). Zlepšení koagulačních vlastností mléka je důležitým aspektem v genetice skotu, a to především z důvodů celosvětově se zvyšující výroby sýrů (Bonfatti *et* al., 2010a). Mléko s vyšším obsahem kaseinů podmiňuje vyšší výtěžek sýra (Schopen *et* al., 2011). Mezi faktory ovlivňující koagulaci mléka u jednotlivých dojnic patří jejich zdravotní stav, fáze laktace, výživa, obsah a vzájemný poměr kaseinů ($\alpha_{S1}$-, $\alpha_{S2}$-, β- a κ-kasein) a syrovátkových bílkovin v mléce. Koagulace je ale především určena genetickými faktory (Caroli *et* al., 2009; Poulsen *et* al., 2013). Zhoršená koagulace je spojena s nízkou pevností tvarohu a delší dobou srážení. Skladování mléka ovlivňuje koagulaci mléka, proto by se před zpracováním nemělo uchovávat déle než 24 hodin (Poulsen *et* al., 2013).

Mléko s vyšším obsahem kaseinu je žádoucí z důvodu jeho vyšší technologické hodnoty, tj. kratší doby srážení (tvorba sraženiny kaseinu v procesu

výroby sýra), větší pevnosti sraženiny a zvýšené výtěžnosti sýrů (Czerniawska-Piatkowska *et* al., 2004). Pevnost tvarohu závisí na složení kaseinu (Heck *et* al., 2009). Mléko obsahující malé kaseinové micely při srážení lépe zachycuje kasein ve srovnání s mlékem obsahujícím větší micely, čímž se snižuje ztráta kaseinu přechodem do syrovátky (Bonfatti *et* al., 2010a). Studium variant mléčných bílkovin u různých plemen skotu by mělo vyústit v negativní selekci jedinců, kteří nesou alely asociované s nepříznivými vlastnostmi mléka pro jeho zpracování v sýrařství (Caroli *et* al., 2009). Sýrařské vlastnosti mléka hrají zásadní roli při výrobě sýrů, zejména tvrdých a dlouho zrajících. Tato skutečnost je důležitá např. v Itálii, kde sýrařský průmysl využívá asi 70 % mléka z celkové produkce. Mléko se z hlediska výroby sýrů hodnotí pomocí následujících parametrů: doba koagulace, schopnost srážení mléka a pevnost tvarohu (Penasa *et* al., 2010). Tyto vlastnosti jsou ovlivněny mj. zastoupením jednotlivých frakcí mléčných bílkovin. Křehký tvaroh souvisí se zvýšeným výskytem $\alpha_{S1}$-kasein, $\alpha_{S2}$-kasein a dále se sníženým obsahem κ-kasein v kaseinovém komplexu (Bonfatti *et* al., 2011).

Jogurt je žádanou funkční potravinou. Má vysokou stravitelnost a biologickou dostupnost proteinu, vysoký obsah energie a vápníku a vykazuje příznivé účinky na lidské zdraví: antioxidační, antimikrobiální a antitrombotické (Perna *et* al., 2013).

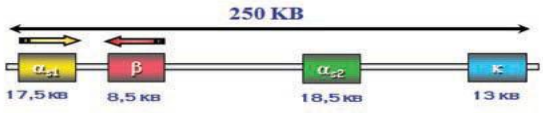
## 3.5 Geny kódující mléčné bílkoviny

Mléčné bílkoviny jsou z velké části (přibližně z 90 %) složené ze šesti hlavních mléčných proteinů, které jsou produkty stejnomenných genů: alfa-laktalbumin (α-LA), beta-laktoglobulin (β-LG), alfa$_{S1}$-kasein ($\alpha_{S1}$-CN), alfa$_{S2}$-kasein ($\alpha_{S2}$-CN), beta-kasein (β-CN) a kappa-kasein (κ-CN) (Heck *et* al., 2009). Zbývajících přibližně 10 % tvoří bovinní sérový albumin (BSA), gama-kasein (γ-kasein), laktoferin (LF), imunoglobuliny (Ig) a další proteiny, které se vyskytují v nízkých koncentracích (Schopen *et* al., 2009).

Geny mléčných proteinů jsou vysoce polymorfní (Huang *et* al., 2012). Tyto polymorfizmy pak zásadně ovlivňují rozdíly v koagulaci mléka (vlastnost důležitá pro sýrárenské zpracování), relativní podíl jednotlivých frakcí mléčných bílkovin a

výtěžek sýra (Bonfatti *et* al., 2011). Polymorfizmy genů hlavních mléčných bílkovin byly identifikovány a charakterizovány u různých plemen skotu (Gambra *et* al., 2013). Mléčné proteiny vznikají na základě mnoha alelických variant (Bonfatti *et* al., 2010b). Různé alelické varianty mléčných proteinů se od sebe navzájem liší jen v několika záměnách aminokyselin (či jejich absenci) v polypeptidovém řetězci (Ulutas *et* al., 2009).

Geny kódující jednotlivé kaseiny se nacházejí na bovinním chromozomu 6 (BTA 6) - Obr. 3 v pořadí *$\alpha_{S1}$-CN*, *β-CN*, *$\alpha_{S2}$-CN* a *κ-CN* (Kučerová *et* al., 2006; Comin *et* al., 2008; Heck *et* al., 2009). U genů kódujících kasein byly zjištěny mutace typu inzerce, delece a substituce (Caroli *et* al., 2009).




**Obr. 3** Geny ležící na bovinním chromozomu 6 (Caroli *et* al., 2009)

Geny kódující další mléčné proteiny jsou *β-LG* ležící na BTA 11 a *α-LA* na BTA 5 (Caroli *et* al., 2004; Kamiński, 2004).

### 3.5.1 Gen *$\alpha_{S1}$-kasein* (*CSN1S1*)

$\alpha_S$-kasein ($\alpha_S$-CN) tvoří 40 % z celkových bílkovin mléka. $\alpha_s$-CN je složen ze dvou nezávislých proteinů $\alpha_{S1}$-kasein ($\alpha_{S1}$-CN; alpha S1 casein) a $\alpha_{S2}$-kasein ($\alpha_{S2}$-CN; alpha S2 casein), které jsou přítomny v kravském mléce v poměru 4 : 1. Oba proteiny jsou vysoce fosforylovány a jsou nutričně důležité vzhledem k jejich schopnosti vázat vápník. $\alpha_{S1}$-CN kravského mléka obsahuje 8 fosfátových skupin a má molekulární hmotnost 23,6 kDa (Treweek *et* al., 2011). Studie ukázaly, že posttranslační modifikace $\alpha_S$-CN ovlivňuje srážení mléka a velikost kaseinových micel (Poulsen *et* al., 2013). Nízký obsah $\alpha_{s1}$-CN negativně ovlivňuje první fázi zrání sýrů, protože $\alpha_{s1}$-CN je substrátem pro chymozin obsažený v syřidlu. U kaseinů byly navíc prokázány mutace v nekódujících sekvencích, které mají vliv na expresi

specifických bílkovin a složení mléka. Jedním z těchto případů je promotor genu pro $\alpha_{S1}$-CN (Caroli *et* al., 2008).

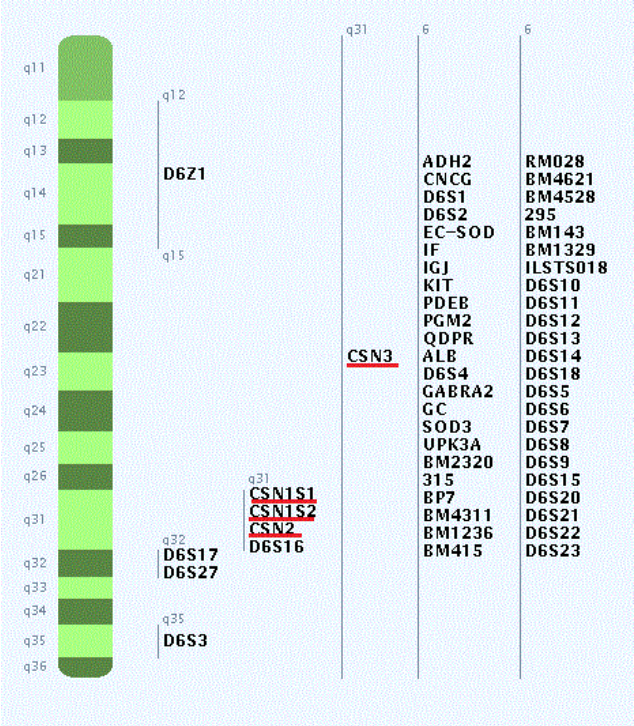
Bovinní gen *$\alpha_{S1}$-CN* (*CSN1S1*) je lokalizován na chromozomu 6 - Obr. 4 (Miluchová *et* al., 2009; Trakovická *et* al., 2011) a zaujímá cca 17 508 bp v DNA. Tento gen se skládá z 19 exonů o velikosti 24–385 bp a 18 intronů o velikosti 90–1967 bp (Koczan *et* al., 1991). Gen *$\alpha_{S1}$-CN* je funkčním kandidátním genem ovlivňujícím produkci mléka a obsah mléčných bílkovin (Prinzenberg *et* al., 2003; Kučerová *et* al., 2006). U tohoto genu je známo 8 genetických variant (*A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* a *H*) (Caroli *et* al., 2009; Shahlla *et* al., 2014), které byly popsány u různých plemen (Jann *et* al., 2002). Caroli *et* al. (2009) nalezl ještě další variantu *I*. Varianty *A* a *D* jsou vzácné, ale byly zjištěny u některých evropských plemen skotu (např. u holštýnsko-fríského). Varianty *F*, *G* a *H* byly identifikovány u plemene brown swiss (Caroli *et* al., 2008; Lühken *et* al., 2009).

K nejčastějším alelám patří alela *B*, která se vyskytuje s frekvencí 90−95 %, následuje alela *C* a dále alela *A* s nejnižším procentem výskytu (Caroli *et* al., 2008; Shalla *et* al., 2014). Alelu *B* charakterizuje mutace, vyúsťující ve změnu aminokyselin Glu→Gly na pozici 192 a alelu *C* mutace vedoucí k záměně Glu→Asp na pozici 84 (Kučerová *et* al., 2006; Lühken *et* al., 2009). Převaha alely *B* byla zjištěna u plemene jersey, guernsey, normandského, ayrshire a holštýnsko-fríského (Jann *et* al., 2002).

Pokud mají dojnice alelu *C* (či dokonce genotyp *CC*), pak vykazují v porovnání s jedinci s ostatními alelami nejvyšší produkci mléka, obsah proteinů a příznivé koagulační vlastnosti mléka (vyšší pevnost sraženiny, kratší doba koagulace). Alela *C* se vyskytuje s frekvencí 0,15–0,25 u plemen jersey, guernsey a normandského, u švédské populace holštýnsko-fríského plemene byla frekvence této alely mírně nižší - 0,145 (Lühken *et* al., 2009). Dojnice s genotypem *BC* mají v porovnání s genotypem *BB* vyšší obsah mléčných bílkovin a tuku (Bonfatti *et* al., 2010a; Schopen *et* al., 2011; Poulsen *et* al., 2013). Vyšší výtěžek sýřeniny byl asociován s genotypem *BB*. Frekvence genotypu *BC* se pohybovala v rozmezí 18,2–20,0 % a genotypu *CC* 1,6 % (Trakovická *et* al., 2011).

Varianta *A* se rozděluje na variantu $A_1$ a $A_2$. Varianta $A_1$ byla asociována s vyšší koncentrací $\alpha_{S1}$-CN ve srovnání s variantou $A_2$ (Heck *et* al., 2009).

Varianta *G* je spojena s nižším množstvím $\alpha_{s1}$-CN v mléce, ale s vyšším obsahem κ-CN a s vyšší pevností kaseinových micel, tj. s příznivou koagulací (Caroli *et* al., 2008; Lühken *et* al., 2009).




**Obr. 4** Lokalizace genů *CSN1S1*, *CSN12*, *CSN2* a *CSN3* na chromozomu 6 (NAGRP, 2016)

### 3.5.2 Gen *$\alpha_{S2}$-kasein* (*CSN1S2*)

$\alpha_{S2}$-kasein tvoří 10 % kaseinu obsaženého v kravském mléce a je fosforylován na více místech. Hraje velmi důležitou roli v transportu fosforečnanu vápenatého. $\alpha_{S2}$-CN kravského mléka obsahuje 11 fosfátových skupin a má molekulární hmotnost 25,2 kDa (Treweek *et* al., 2011). Protein $\alpha_{S2}$-CN se řadí k peptidům s obrannou aktivitou, které podporují antibakteriální schopnosti imunitního systému. Přípravky nebo proteolytické látky obohacené o $\alpha_{S2}$-CN se mohou použít pro zvýšení kvality a zdravotní nezávadnosti mléčných výrobků (Nilsen *et* al., 2009; Kishore *et* al., 2013).

Studium SNP genu *$\alpha_{S2}$-CN* (*CSN1S2*) - (Obr. 4) odhalilo velké množství významných asociací s produkcí mléka a mléčných bílkovin (Nilsen *et* al., 2009). V promotorové oblasti genu *$\alpha_{S2}$-CN* se reguluje transkripční rychlost a určuje

množství transkriptu v mléce. *$\alpha_{S2}$-CN* je v promotorové oblasti u různých plemen skotu charakterizován deseti variacemi: osm v oblasti promotoru (1,15 Kb), a po jednom v 50UTR (44 bp) a oblasti intronu-I (73 bp). U variace na pozici 1084 (C>T) bylo zjištěno, že ovlivňuje vyšší obsah $\alpha_{S2}$-CN v mléce. Jedinci s genotypem *CT* vykazovali oproti jedincům s genotypem *CC* vyšší obsah proteinu $\alpha_{S2}$-CN a β-CN v mléce (Kishore *et* al., 2013).

U tohoto genu jsou známé 4 genetické varianty (*A, B, C* a *D*) (Caroli *et* al., 2009; Shahlla *et* al., 2014), které mají vliv na vlastnosti mléčných bílkovin (Kishore *et* al., 2013). Substituce nukleotidů c.68C>T v exonu 3 vede k substituci aminokyselin Ser→Phe, což rozlišuje variantu *A* od varianty *B*, která byla pozorována u pincgavského plemene (Gallinat *et* al., 2013).

### 3.5.3 Gen *β-kasein* (*CSN2*)

β-kasein (β-CN; beta casein) tvoří až 45 % mléčného kaseinu a skládá se z řetězce 209 aminokyselin (Miluchová *et* al., 2014). Bylo zjištěno, že β-kasein má vliv na obsah mléčného tuku a bílkovin, a také ovlivňuje pevnost sýřeniny (Comin *et* al., 2008). Poměr obsahu $\alpha_S$-CN a β-CN ovlivňuje průběh koagulace (Bonfatti *et* al., 2010a). β-CN je také důležitý pro strukturu kaseinových micel (Kučerová *et* al., 2006).

Gen *β-CN* (*CSN2*) je mapován na bovinním chromozomu 6 (Obr. 4). U tohoto genu je známo 12 genetických variant (*$A_1$, $A_2$, $A_3$, B, C, D, E, F, G, $H_1$, $H_2$, I*) (Caroli *et* al., 2009; Shahlla *et* al., 2014) a dále byla identifikována 13. alela X (Miluchová *et* al., 2009). Podle Kučerové *et* al. (2006) a Miluchové *et* al. (2009b) jsou častými alelami *$A_1$, $A_2$, $A_3$, B* a *C*. Naopak Kamiński *et* al. (2007) tvrdí, že jsou nejčastější alely *$A_1$* a *$A_2$*, alela *B* je méně častá a alely *$A_3$* a *C* jsou dokonce vzácné.

Varianty *$A_1$* a *$A_2$* jsou nejčastější u holštýnsko-fríského plemene (Kamiński *et* al., 2007). Varianta *$A_1$* byla asociována s vyšším množstvím $\alpha_{S1}$-CN, κ-CN a nižším obsahem β-CN a $\alpha_{S2}$-CN oproti variantě *$A_2$*. Dojnice nesoucí alelu ***$A_1$*** vykázaly nižší množství mléka a obsah proteinů než dojnice s alelou *$A_2$* (Heck *et* al., 2009) - viz kap. 3.8. U dojnic s genotypem *$A_2A_3$* byl zjištěn nejvyšší obsah bílkovin a tuku. Genotyp *$A_1A_3$* byl asociován s nejvyšší produkcí mléka, ale s nižším procentickým

obsahem mléčných bílkovin (Kučerová *et* al., 2006). Genotyp $A_2A_2$ významně zvyšuje produkci mléka, obsah tuku a bílkovin (Miluchová *et* al., 2009).

Alela $A_3$ je spojena s vyšší mléčnou produkcí, oproti tomu je alela *B* asociována s vyšší produkcí proteinů (zejména kaseinů) a tuku (Miluchová *et* al., 2009). Alela *B* má vliv na zvýšení koagulačních vlastností mléka (Bonfatti *et* al., 2010a). Genotypy $A_1A_2$, $A_1B$, $A_2B$ nebo $A_3B$ byly v asociaci s vyšším obsahem β-CN na rozdíl od genotypů $A_1A_1$ a $A_2A_2$ (Heck *et* al., 2009). Genotyp $A_2B$ dosahoval nejnižších PH (Kučerová *et* al., 2006).

### 3.5.4 Gen *β-κ-kasein* (*β-κ-CN*)

Ve studii Schopena *et* al. (2011) bylo identifikováno sedm haplotypů genu beta-kappa-kaseinu (*β-κ-CN; CSN2-CSN3; beta kappa casein*): $A_1A$, $A_1B$, $A_1E$, $A_2A$, $A_2B$, *BB* a *IB*.

Genotyp *BB* je nejvýrazněji asociován s dobou koagulace, pevností tvarohu, množstvím bílkovin a tuku v mléce. Tento genotyp byl zjištěn u plemen holštýnsko-fríské a simmental (Caroli *et* al., 2009; Vallas *et* al., 2012; Poulsen *et* al., 2013). Alela *B β-CN* je příznivější pro koagulaci mléka než alely $A_1$ a $A_2$. Alely genu *β-CN* asociované s produkcí mléka a mléčných bílkovin jsou méně vhodné pro výrobu sýrů (Comin *et* al., 2008). Genotypy $A_2A_2AA$ a $A_1A_2AA$ měly nepříznivé účinky na pevnost tvarohu a koagulační vlastnosti. Genotyp *BB* genu *κ-CN* zvyšuje pevnost tvarohu a snižuje dobu koagulace, zatímco genotyp *AA* snižuje pevnost tvarohu a zvyšuje dobu koagulace. Porovnání vlivu genotypů *κ-CN* na pevnost tvarohu u genu *β-κ-CN* je následující: *BB>AB>AA* (Vallas *et* al., 2012).

Genotyp *IB β-κ-CN* má příznivou asociaci s procentickým obsahem proteinů v mléce, nicméně se zdá, že je tento pozitivní vliv spíše efektem varianty *I β-CN* než varianty *B κ-CN* (Vallas *et* al., 2012).

### 3.5.5 Gen *κ-kasein* (*CSN3*)

Kappa-kasein (κ-CN; kappa casein) tvoří přibližně 12 % kaseinu a je důležitou součástí kravského mléka (Azevedo *et* al., 2008). κ-CN je značně odlišný od ostatních kaseinů ve své struktuře i dalších vlastnostech. κ-CN se skládá ze 169 aminokyselin, jedná se o glykoprotein s molekulovou hmotností 120 kDa. κ-CN je jedním z hlavních proteinů kaseinových micel, kde hraje klíčovou roli v jejich stabilitě (Azevedo *et* al., 2008; Ecroyd *et* al., 2010). Většina molekul κ-CN se nachází na kaseinovém micelárním povrchu. Proteolytický enzym používaný v mlékárenském průmyslu (syřidlo chymozin) štěpí κ-CN na nerozpustný para-κ-CN a rozpustné kaseinové makropeptidy (CMP; caseinomacropeptides) (Ecroyd *et* al., 2010).

Gen *κ-CN* (*CSN3*) je umístěn na bovinním chromozomu 6q31 (Obr. 4). Celková délka genu je okolo 13 kB a většina sekvencí kódujících protein κ-CN se nachází ve 4. exonu (Azevedo *et* al., 2008). Při chymozinem navozené koagulaci ovlivňuje genotyp *κ-CN* soudržnost sýřeniny (Bonfatti *et* al., 2010a). Tento příznivý vliv je dán substitucí aminokyselin v peptidickém řetězci. Polymorfizmus *κ-CN* má vztah k technologickým vlastnostem mléka: době koagulace, pevnosti tvarohu, výtěžku sýrů (Kamiński, 2004), obsahu kaseinu a jiných mléčných bílkovin (Comin *et* al., 2008). Úspěšnost technologického procesu výroby sýrů tedy významně závisí na genotypu tohoto genu (Czerniawska-Piatkowska *et* al., 2004).

U tohoto genu je popsáno 11 genetických variant (*A, B, C, E,* $F^1$, $F^2$, $G^1$, $G^2$, *H, I, J*) (Caroli *et* al., 2009). U varianty *A* jsou na pozicích 136 a 148 substituce Ile→Thr, oproti tomu varianta *B* je podmíněna na těchto pozicích substitucí Asp→Ala (Azevedo *et* al., 2008). Tyto dvě bodové mutace mají vliv na strukturu proteinu a jeho glykosylaci. Alely *A* a *B* byly spojeny s nižší koncentrací κ-CN (Huang *et* al., 2012). Strukturní rozdíl vede u *A* varianty k vyšší stabilitě a pomalejší hydrolýze *κ-CN* mezi 105. a 106 aminokyselinou při enzymatickém srážení mléka (Azevedo *et* al., 2008; Caroli *et* al., 2009).

Nejčastějšími genotypy jsou *AA* a *AB* (Azevedo *et* al., 2008; Comin *et* al., 2008; Schopen *et* al., 2011). U dojnic s genotypem *AA* byl zjištěn pozitivní vliv na množství podmáslí (Hristov *et* al., 2012). Genotyp *BB* zvyšuje výtěžek sýřeniny o 10−20 % a kvalitu sýru v porovnání s genotypem *AA*. Bylo zjištěno, že mléko od

dojnic s alelou *B* je tepelně odolnější, má kratší dobu koagulace, lepší srážení a vhodnou velikost micel pro výrobu sýrů (Azevedo *et* al., 2008; Heck *et* al., 2009). Vliv alely *B* na pevnost tvarohu je ještě vyšší, pokud je ve spojení s alelou *I* (Demeter *et* al., 2010).

Varianta *E* byla asociována s nižším množstvím bílkovin ve srovnání s variantou *A* a s nevhodnými koagulačními vlastnostmi (Matějíček *et* al., 2008; Heck *et* al., 2009).

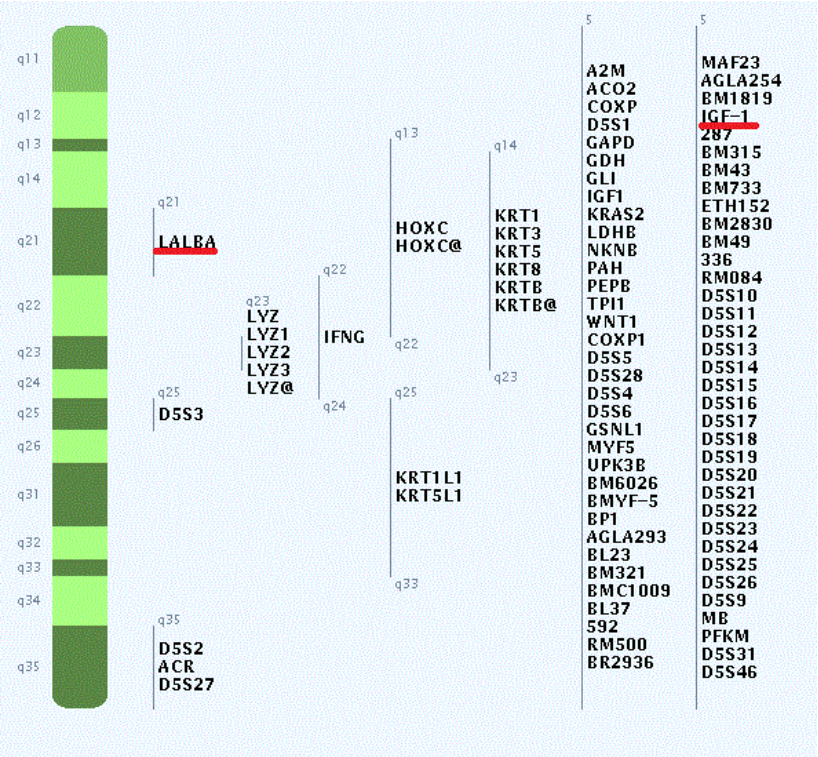
### 3.5.6 Gen *α-laktalbumin* (*LALBA*)

Syrovátkové proteiny tvoří přibližně 20 % z celkové mléčné bílkoviny a obsahují dva hlavní proteiny: α-laktalbumin (α-LA; LALBA; laktalbumin aplha) a β-laktoglobulin (β-LG; lactoglobulin beta) (Miluchová *et* al., 2014). Syrovátkové proteiny se dále skládají z imunoglobinů (IgG), glykomakropeptidů (GMP), bovinního sérového albuminu (BSA) a menších proteinů, jako je například laktoperoxidáza, lysozym a laktoferin (LF) (Kamiński *et* al., 2007). Nižší obsah syrovátkových proteinů poukazuje na vyšší obsah kaseinů (Braunschweig and Leeb, 2006).

Syrovátková bílkovina α-LA je jednou ze dvou hlavních syrovátkových bílkovin (Caroli *et* al., 2009). Syntéza laktózy je zajištěna vysokou koncentrací α-LA (Schopen *et* al., 2011). Laktóza řídí osmolaritu mléka, a proto může mít α-LA vliv na produkci mléka a na obsah dalších mléčných bílkovin (Riley *et* al., 2008). α-LA je monomerní, globulární proteinová podjednotka o molekulové hmotnosti cca 14 kDa a obsahuje ve své molekule čtyři disulfidové vazby. Díky těmto vazbám je molekulární struktura α-LA stabilnější během zahřívání než struktura β-LG. Zahřátí je důležitým procesem při výrobě většiny mléčných výrobků (Bu *et* al., 2009).

Gen *α-LA* (*LALBA*) kóduje protein α-LA a leží na bovinním chromozomu 5 - Obr. 5. U tohoto genu jsou popsány 3 varianty: *A*, *B* a *C*. Alely *A* a *B* ovlivňují vyšší obsah mléčných proteinů a tuku v mléce. U čínské populace holštýnského plemene byly zjištěny frekvence genotypů *AB* = 0,14 a *BB* = 0,86. Alela *A* se vyskytovala s frekvencí 0,07 a alela *B* s frekvencí 0,93. U afrických a asijských

plemen ve srovnání s plemeny evropskými byla pozorována vyšší frekvence alely *B* (Caroli *et* al., 2009; Shahlla *et* al., 2014).




**Obr. 5** Lokalizace genů *LALBA* a *IGF-1* na chromozomu 5 (NAGRP, 2016)

### 3.5.7 Gen *β-laktoglobulin* (*LGB*)

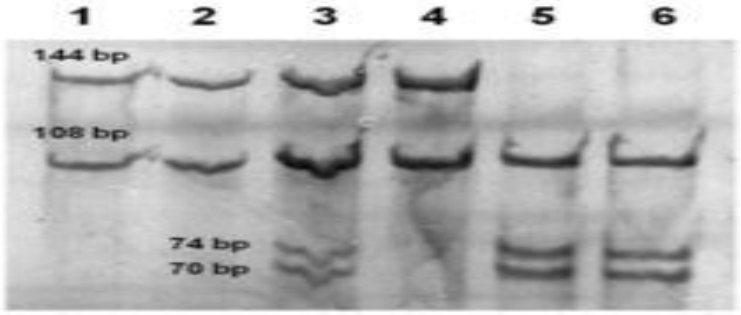
Protein β-LG tvoří 56–60 % z celkových syrovátkových proteinů. β-LG je monomerní, globulární proteinová podjednotka o molekulové hmotnosti cca 18 kDa a má dva disulfidové můstky Cys66-Cys160 a Cys106-Cys119 (Bu *et* al., 2009).

Gen *β-LG* (*LGB*) kódující protein β-LG má velikost 4 kb (Obr. 7) - (Hristov *et* al., 2012). Protein β-LG se skládá ze 162 aminokyselinových zbytků (Lukač *et* al., 2013). Polymorfní oblasti genu *β-LG* se nacházejí mezi 4. exonem a 4. intronem (Hristov *et* al., 2012). Genotypy *β-LG* mají vliv na koncentraci proteinu β-LG v mléce (Heck *et* al., 2009).

U tohoto genu se popisuje 11 variant (*A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J* a *W*) (Caroli *et* al., 2009; Shahlla *et* al., 2014). Alela *A* kóduje aminokyseliny Asp a Val na pozicích 64 a 118 (Kučerová *et* al., 2006; Lukač *et* al., 2013) a je spojována s vyšší relativní koncentrací β-LG a tím s nižší relativní koncentrací všech ostatních

mléčných bílkovin (α-LA, $\alpha_S$-CN, κ-CN a β-CN). Byl zjištěn vliv alely *A* genu *β-LG* a alely *B* genu *κ-CN* na koncentraci proteinů β-LG, κ-CN a dále na celkový obsah kaseinu v mléce (Heck *et* al., 2009; Huang *et* al., 2012). Alela *A* příznivě ovlivňuje koagulační vlastnosti mléka. Dojnice s genotypem *AA* vykazují vyšší produkci mléka a vyšší obsah proteinů v mléce (Bonfatti *et* al., 2010a).

Pro zjišťování genotypu *LGB* se využívá metoda PCR-RFLP. Obr. 6 ukazuje elektroforeogram s genotypy *AA*, *AB* a *BB*. Velikost PCR produktu je 252 bp. Genotyp *AA* je charakterizován dvěma fragmenty 144 a 108 bp, genotyp *BB* představují tři fragmenty: 108, 74 a 70 bp, a genotyp *AB* čtyři fragmenty: 144, 108, 74 a 70 bp (Hristov *et* al., 2012).

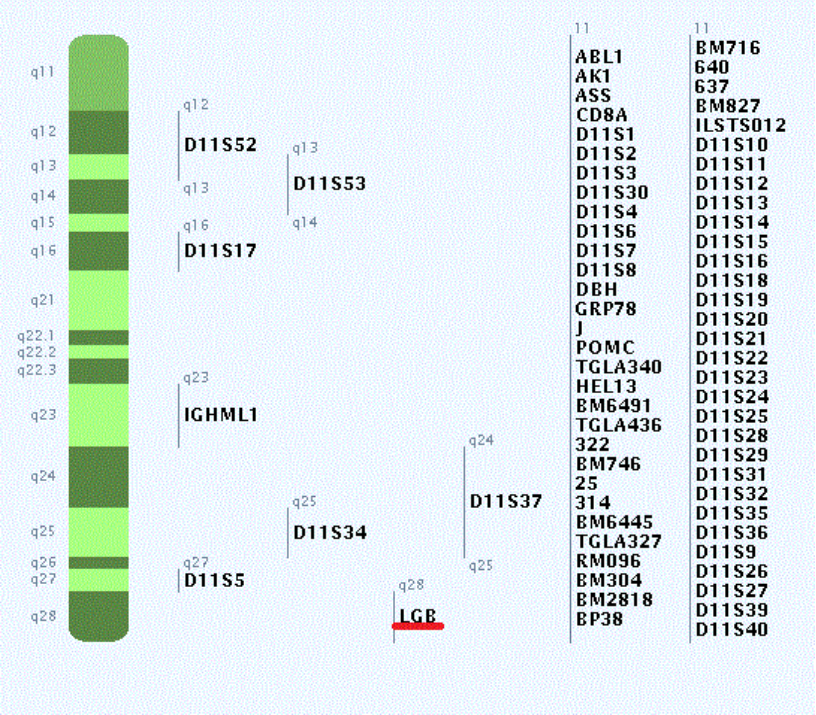



**Obr. 6** Elektroforetické vyhodnocení genotypů *LGB* (Hristov *et* al., 2012)

1,2,4 - *AA* genotyp, 5,6 - *BB* genotyp, 3 - *AB* genotyp

Alela *B* kóduje aminokyseliny Gly na pozici 64 a Ala na pozici 118 (Kučerová *et* al., 2006; Lukač *et* al., 2013). Alela *B* je asociována s nižším podílem β-LG v mléčných proteinech (Huang *et* al., 2012) a se zvýšenou srážlivostí sýřeniny (Bonfatti *et* al., 2010a). Genotyp *BB* byl asociován se zvýšeným obsahem tuku (Bonfatti *et* al., 2010b), proteinů a kaseinů (Lukač *et* al., 2013).

U zkoumaného souboru, kde byla zastoupena plemena jersey a holštýnsko-fríský skot, byla zjištěna frekvence genotypů *AA* = 0,23; *AB* = 0,58 a *BB* = 0,19 (Lukač *et* al., 2013). Porovnání vlivu genotypů na různé vlastnosti je následující: produkce mléka a výtěžnost podmáslí *BB*>*AB*>*AA*; obsah tuku *BB*>*AA*>*AB*; obsah bílkovin *AA*>*BB*>*AB* (Hristov *et* al., 2012).




**Obr. 7** Lokalizace genu *LGB* na chromozomu 11 (NAGR, 2016)

## 3.6 Geny související se syntézou mléčného tuku

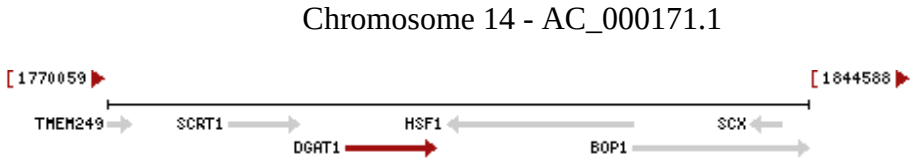
### 3.6.1 Gen pro acylCoA:diacyglycerol acyltransferázu (*DGAT1*)

Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferáza 1 (DGAT1; diacylglycerol O-acyltransferase 1) je klíčový enzym při syntéze mastných kyselin v posledním kroku syntézy triacylglycerolů probíhající v mléčné žláze (Fürbass *et* al., 2006; Sanders *et* al., 2006). Mléčný tuk se skládá přibližně z 98 % triglyceridů a enzymu DGAT1 (Juhlin *et* al., 2012).

Gen *DGAT1* byl mapován v centromerické oblasti BTA14 - Obr. 8 (Fürbass *et* al., 2006; Duchemin *et* al., 2013), má velikost 14 117 bp a obsahuje 16 intronů a 17 exonů. *DGAT1* je přítomen ve všech typech buněk, ale je vysoce exprimován v těch tkáních a orgánech, kde probíhá syntéza triglyceridů nejaktivněji, tj. v tukové tkáni, játrech, kosterním svalstvu a tenkém střevě (Juhlin *et* al., 2012). Polymorfizmus *DGAT1* významně ovlivňuje celkový obsah mléčného tuku a lipidových složek v polárních tucích (Argov-Argaman *et* al., 2013).

U genu *DGAT1* byla zjištěna mutace *K232A* se dvěma alelickými variantami: *K* a *A*. Substituce lyzinu (*K)* za alanin (*A*) se tedy nachází na pozici 232. Alela *K* je spjata se zvýšenou produkcí mléka, proteinů a se zvýšeným obsahem tuku v mléce oproti alele *A*. Dále bylo zjištěno, že je alela *K* asociována s vyšším podílem nenasycených mastných kyselin, např. kyseliny myristové, palmitové a stearové (Fürbass *et* al., 2006; Juhlin *et* al., 2012; Argov-Argaman *et* al., 2013).

Ke zkoumání genu *DGAT1* byl použit LRH test (longrange haplotype test) a byly nalezeny haplotypy, z nichž některé se využívají v selekci pro zvýšení produkce mléčného tuku (Grisart *et* al., 2004). Haplotypy *DGAT1 1-232K*, *2-232K*, *4-232K* a *5-232K* vzhledem k jejich extrémně nízké frekvenci nemohly být využity při selekci. Další haplotypy *DGAT1* jsou *3-232K*, *1-232A*, *2-232A*, *3-232A*, *4-232A* a *5-232A*. Haplotyp *5-232K* vykazoval významný vliv na zvýšení obsahu mléčného tuku a bílkovin. Oproti tomu paternálně děděný haplotyp *3-232K* významně zvyšuje dojivost a produkci proteinů a snižuje obsah mléčného tuku. Paternálně děděný haplotyp *1-232A* výrazně snižuje dojivost a zvyšuje obsah mléčného tuku (Kuehn *et* al., 2007).




**Obr. 8** Lokalizace genu *DGAT1* na chromozomu 14 (NCBI, 2015)

### 3.6.2 Gen pro stearoyl-koenzym A desaturázu (*SCD*)

Stearoyl-CoA desaturáza (SCD; stearoyl-CoA desaturase) je multifunkční komplexní enzym důležitý v buněčné biosyntéze mastných kyselin (FA; fatty acids) (Alim *et* al., 2012). Enzym SCD je důležitý při chemické přeměně nasycených mastných kyselin na nenasycené mastné kyseliny, které jsou syntetizovány buď *de novo* nebo využity z krmné dávky (Oh *et* al., 2013). Tento enzym také udržuje tekutost buněčných membrán i mléčného tuku. Tekutost mastných kyselin je primárně určena délkou řetězce, a proto je profil mastných kyselin důležitý pro syntézu mléčného tuku (Jacobs *et* al., 2013). SCD je hlavní faktor pro přeměnu

kyseliny stearové (C18:0) a kyseliny palmitové (C16:0) na kyselinu olejovou (cis C18:1) (Yokota *et* al., 2012; Kaplanová *et* al., 2013; Oh *et* al 2013).

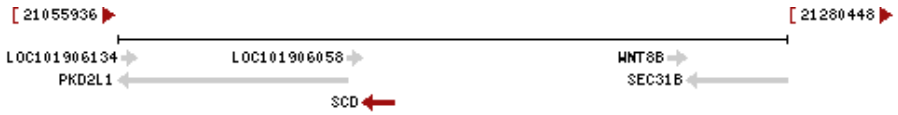
Bovinní *SCD* (*bSCD*) byl lokalizován na bovinním chromozomu 26q21 (Obr. 9). *SCD* má velikost přibližně 17 kb, skládá se ze 6 exonů a 5 intronů a byl navržen jako kandidátní gen ovlivňující profil mastných kyselin v mléce (Alim *et* al., 2012).

Sekvenční analýza identifikovala pět SNP v genu *SCD*: ve 3. intronu g.6926A→G, ve 4. intronu g.8646 G→A, v 5. exonu g.10153A→G, g.10213T→C a g.10329C→T (Alim *et* al., 2012). Substituce aminokyselin Val→Ala měla vliv na obsah kyseliny myristoolejové (C14:1) u japonských plemen skotu. Tato substituce je asociována s nižším obsahem nasycených mastných kyselin (SFA; saturated fatty acids), např. kyseliny myristové (C14:0) a kyseliny stearové (C18:0) a s vyšším obsahem mononenasycených kyselin (MUFA; mono unsaturated fatty acids), např. kyseliny myristoolejové (C14:1) a kyseliny olejové (C18:1) (Ishii *et* al., 2013).

U dojnic s genotypem *AG* (g.6926A→G) genu *SCD* byla prokázána vyšší dojivost (o 354 kg více mléka za laktaci), vyšší obsah tuku (o 12 kg více) a proteinu (o 7 kg více) v porovnání s jedinci o genotypu *GG*. Genotyp *AG* (g.8646A→G a g.10153A→G) se pojí s vyšší produkcí mléka, tuku a proteinu oproti genotypům *AA* a *GG* (Alim *et* al., 2012).

U genotypů *CT* (g.10213T→C a g.10329C→T) byla nejvyšší produkce mléka, tuku a proteinů, zatímco nejnižší obsah proteinů vykazovaly genotypy *TT* a *CC*. Dojnice s genotypem *CC* (g.10329C→T) měly vyšší produkci mléka (o 2 kg/den) a proteinu v mléce (cca o 0,07 kg/den) v porovnání s genotypem *TT*. Genotyp *TT* u plemene jersey vykazoval vyšší hodnoty mononenasycených kyselin (o 9,3 %), obsah C14:1 (37,9 %) a C18:1 (o 11,7 %) ve srovnání s genotypem *CC* (Alim *et* al., 2012). V porovnání s homozygotními genotypy byly heterozygotní lokusy asociovány s vyšší dojivostí, obsahem tuku a bílkovin (Oh *et* al., 2013).

Chromosome 26 – AC_000183.1




**Obr. 9** Lokalizace genu *SCD* na chromozomu 26 (NCBI, 2015)

## 3.7 Geny zahrnuté v hormonální signalizaci produkce mléka

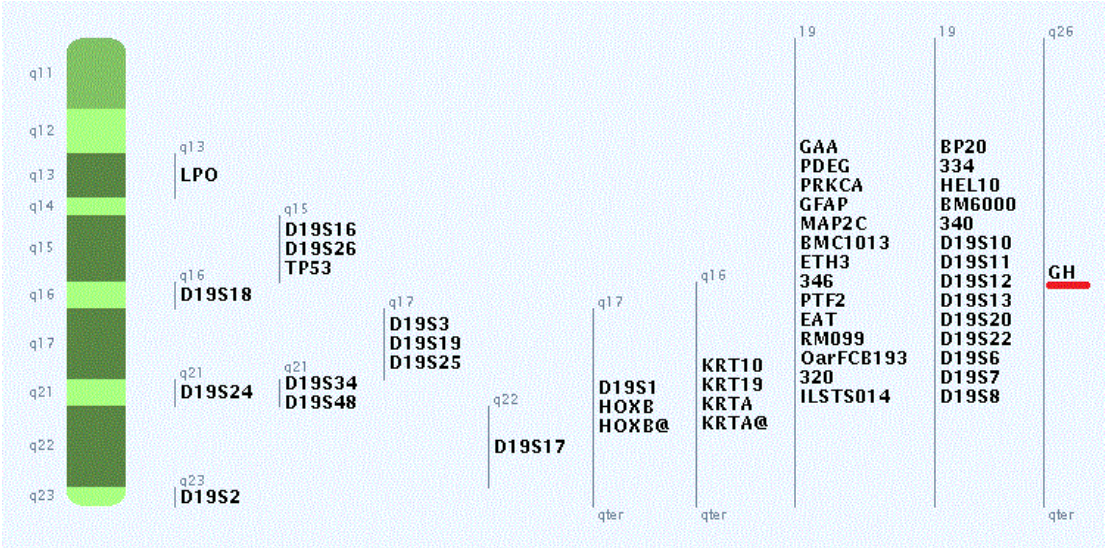
### 3.7.1 Gen pro růstový hormon (*GH*)

Růstový hormon (GH; growth hormon) má vliv na růst, vývoj, laktaci, reprodukci, metabolismus a imunitu (Lee *et* al., 2013; Tian *et* al., 2014). Podporuje růst kostí a usnadňuje včlenění aminokyselin v průběhu syntézy proteinu. Významná role GH během laktace se dokládá zvýšením dojivosti u dojnic o 10–15 % (Hradecká *et* al., 2008). Bovinní GH (bGH) je syntetizován somatotropními buňkami předního laloku hypofýzy (Arango *et* al., 2014) a jedná se o peptid o molekulové hmotnosti 22 kDa (Zhou *et* al., 2005).

Gen *bGH* se nachází na q22 bovinního chromozomu 19 - Obr. 10 a obsahuje 5 exonů kódujících 217 aminokyselin (Lee *et* al., 2013). Mezi známé polymorfizmy patří $GH_1$ a $GH_2$. Uvnitř genu byly nalezeny SNP podmíněné substitucemi 679 C→T v exonu 1, 1692 T→C v intronu 3 a 2141 C→G, 2258 C→T, 2277 C→T a 2291 A→C v exonu 5. Substituce 2291 A→C významně podporuje produkci mléka, obsah tuku a proteinu u holštýnsko-fríského skotu (Lee *et* al., 2013). U SNP v 5. exonu genu *GH* byla zjištěna další substituce aminokyselin, a to Thr (ACG)→Met (ATG) v kodonu 172. Kromě předchozích existují ještě další 3 haplotypy v kodonech 127 a 172: haplotyp *A* (Leu-Thr), *B* (Val-Thr) a *C* (Val-Met), které tvoří 6 genotypů tj. *AA*, *AB*, *AC*, *BB*, *BC* a *CC*. Jedinci s genotypem *AC*, *BC* a *CC* měli významně vyšší plazmatickou koncentraci růstového hormonu než ti s ostatními třemi genotypy (Ardiyanti *et* al., 2012).

Nejznámější je polymorfizmus *GH1*, substituce Leu (CTG)→Val (GTG) na pozici 127 v 5. exonu (Lee *et* al., 2013; Arango *et* al., 2014). Studie *GH1* genu u holštýnského skotu prokázala, že alela $GH1^L$ má vyšší frekvenci než alela $GH1^V$.

Genotyp $GH1^{LL}$ vede k vyšší produkci mléka ve srovnání s genotypem $GH1^{LV}$, který je asociován s vyšším množstvím bílkovin a tuku (Hradecká *et* al., 2008).

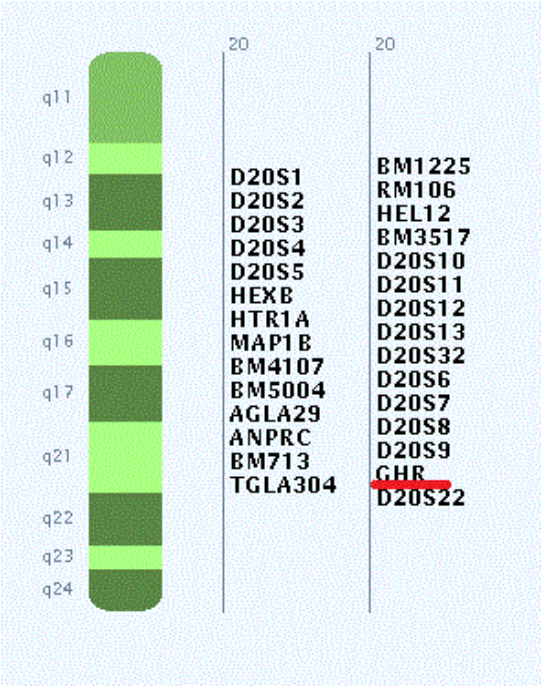



**Obr. 10** Lokalizace genu *GH* na chromozomu 19 (NAGRP, 2016)

### 3.7. 2 Gen pro receptor pro růstový hormon (*GHR*)

Receptor pro růstový hormon (GHR; growth factor receptor) je důležitý pro identifikaci genetických markerů (Deepika and Salar, 2013). Bovinní *GHR* byl zmapován na proximálním dlouhém rameni chromozomu 20 v oblasti 20q7.1 (Obr. 11) a skládá se z 10 exonů a 9 intronů (Garrett *et* al., 2008). GHR je jednořetězcový polypeptid složený ze 634 aminokyselin (Mehmannavaz and Ghorbani, 2012).

Byly popsány dvě substituce v *GHR* s různým vlivem dle plemene. První substituce T→A se nachází v exonu 8 - Phe→Tyr (F279Y) a ovlivňuje produkci mléka, tuku a bílkovin u ayshirského plemene. Druhá substituce Asn→Thr (N528T) se nachází v exonu 10 a vykazovala vliv na dojivost, množství tuku a bílkovin v mléce u maďarské populace holštýnsko-fríského plemene (Viitala *et* al., 2006; Mehmannavaz and Ghorbani, 2012). Dále genotyp *AA* je asociován s nižší produkcí mléka, tuku a dále se zvýšením obsahu bílkovin, zatímco genotyp *GG* má vliv na výtěžek mléčného tuku. Frekvence alely *A* se pohybovala u plemen aberden-angus a holštýnsko-fríský v rozmezí 0,915–1,00 a převládala nad alelou *G* s frekvencí 0.00–0,085 (Hradecká *et* al., 2008, Deepika and Salar, 2013).




**Obr. 11** Lokalizace genu *GHR* na chromozomu 20 (NAGRP, 2016)

### 3.7.3 Gen pro inzulinu podobný růstový faktor 1 (*IGF-1*)

Protein inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1; insulin-like growth factor 1) je syntetizován a také vylučován játry a dalšími tkáněmi. Gen pro IGF-1 byl zmapován na bovinním chromozomu 5 (Obr. 5) - (Luna-Nevarez *et* al., 2011). GH a cirkulující IGF-1 jsou hlavní regulátory postnatálního růstu a metabolismu (Mullen *et* al., 2011). GH stimuluje uvolnění IGF-1 z jater a je rozhodující pro využití a distribuci živin. IGF-1 hraje důležitou roli v růstu mléčné žlázy a regulaci několika buněčných procesů, včetně stimulace syntézy proteinů v epiteliálních buňkách mléčné žlázy. Plazmatická hladina IGF-1 koreluje s koncentrací mléčného tuku a s produkcí mléka v průběhu celé laktace a v pozdní laktaci. Hladina cirkulujícího IGF-1 byla asociována se zvýšenou dojivostí. Je známo, že výživa, včetně energetických složek a obsahu bílkovin ovlivňuje plazmatickou koncentraci IGF-1 (Grochowska *et* al., 2001).

Gen *IGF-1* je genetický marker pro zlepšení plodnosti a produkce mléka u skotu (Grochowska *et* al., 2001). Mléčnou produkci ovlivňuje alela *G* u varianty genu *IGF1i3*, která asociovala u holštýnsko-fríského plemene se zvýšenou dojivostí v první laktaci (o 398±173,0 kg za laktaci) a na druhé laktaci se zvýšenou produkcí

tuku (nárůst o 751,3±262,0 kg). Tato alela také zvyšovala produkci mléčných bílkovin v první (18,8±6,8 kg) a druhé laktaci (21,3±10,2 kg) (Mullen *et* al., 2011).

### 3.7.4 Gen *prolaktin* (*PRL*)

Bovinní prolaktin (PRL; bPRL; prolactin) je polypeptidový hormon, který je syntetizován a vylučován v mléčné žláze, ve žláze předního laloku hypofýzy, ale také řadou jiných buněk a tkání (Mehmannavaz and Ghorbani, 2012; Dong *et* al., 2013) prostřednictvím JAK/STAT signální dráhy (The Janus kinase/signal transducers and activators of transcription signaling pathway) (Lü *et* al., 2010). V mléčné žláze je hormon PRL primárně zodpovědný za produkci mléčných bílkovin, tuku a laktózy (Viitala *et* al., 2006). Molekula PRL je uspořádána v jednom řetězci aminokyselin se 3 intramolekulárními disulfidovými vazbami mezi 6 zbytky cysteinu. bPRL se skládá ze 199 aminokyselin o molekulové hmotnosti ~ 23 kDa (Dong *et* al., 2013).

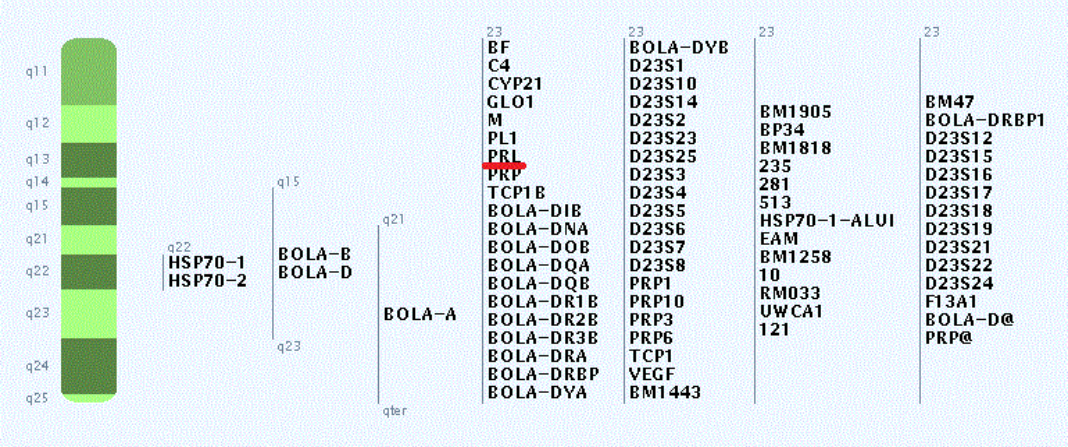
*bPRL* je lokalizován na bovinním chromozomu 23 v poloze 23q21 Obr. 12. Tento gen má velikost 10 kb a je složen z 5 exonů (1:855-936 nt, 2:3661-3842 nt, 3:6186-6293 nt, 4:8.321-8.500 nt a 5:9129-9388) a 4 intronů. Asociační analýza G→T SNP v pozici -485 promotoru genu *PRL* prokázala významnou spojitost s produkcí mléka a obsahem tuku i proteinu u holštýnsko-fríského plemene (Mehmannavaz and Ghorbani, 2012; Dong *et* al., 2013).

PCR-RFLP technikou lze identifikovat dvě alely *A* a *B*. Tento polymorfizmus je ve vazbě s produkcí mléka a obsahem proteinů. Genotyp *BB* je spojován s procentickým obsahem proteinů a genotyp *AA* ovlivňuje mléčnou produkci (Rincón *et* al., 2013).

U *PRL* byly lokalizovány 4 SNP v promotoru, 1 v intronu a 4 v exonu, tj. mutace v tomto pořadí na pozici A→G-1043 (SNP-1043A→G), A→G-402 (SNP-402A→G), T→C+2723 (SNP+2723T→C) a transverze A→G+8398 (SNP+8398G→A). Haplotyp *AG* nesoucí alely *A* a *G* na pozicích -1043 A→G a -402 A→G byl významně asociován se zvýšenou produkcí mléka a haplotyp *AA* byl asociován se zvýšeným obsahem tuku v mléce (Lü *et* al., 2010).

Nejdůležitější polymorfizmus se nachází na exonu 4, kde byla zjištěna tichá mutace v kodonu 103 SNP A→G, která se váže k mléčným znakům u plemen mléčného skotu. Genotyp *GG* u populace holštýnsko-fríského má významný vliv na zvýšení produkce mléka s vyšším obsahem tuku než genotyp *AA*. Lokus 7545 s genotypem *AA* je asociován s vyšší dojivostí (8457±938 kg) v porovnání s genotypy *GA* (7537±1278 kg) a *GG* (7757±1174 kg) (Dong *et* al., 2013).

Studie provedená v Rusku u stáda červenostrakatého skotu vykázala pozitivní vliv u genotypu *AA* na produkci mléka. U populace plemen montbeliarde a holštýnsko-fríské nebyl vliv na produkci mléka zjištěn, nejvyšší produkce mléka dosahovaly dojnice s genotypem *AG* (Dong *et* al., 2013).




**Obr. 12** Lokalizace genu *PRL* na chromozomu 23 (NAGRP, 2016)

### 3.7.5 Gen pro signální protein STAT5A a STAT5B (*STAT5A* a *STAT5B*)

Signální transduktory a aktivátory transkripce (STAT; signal transducer and activator of transcription) jsou skupina transkripčních faktorů zahrnujících STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B a 6. Proteiny STAT5 jsou důležité pro růst a diferenciaci buněk, protože zprostředkovávají aktivitu genů *GH* a *PRL* (Żukiewicz *et* al., 2012).

STAT5 byl původně objeven jako PRL indukující transkripční faktor a nazýván jako faktor mléčné žlázy (Bao *et* al., 2010; Selvaggiho *et* al., 2013). STAT5 existuje ve dvou blízce příbuzných formách A a B, z nichž je každá kódována dvěma samostatnými geny (Bao *et* al., 2010). Geny kódující STAT5A a STAT5B jsou odvozeny z jednoho původního genu a jsou vysoce homologní - z 90 % mají

identickou kódující sekvenci. Obě izoformy vznikající na podkladě těchto genů se liší několika aminokyselinami v karboxylovém konci molekuly proteinu. U skotu byly geny *STAT5A* a *STAT5B* objeveny na bovinním chromozomu 19q17 a obsahují 4 domény o celkové délce 44,39 kb (Cosier *et* al., 2010). Geny kódující STAT5A a STAT5B jsou kandidátní geny pro kvantitativní znaky u skotu (Selvaggi *et* al., 2009), proto mohou být použity v genetických šlechtitelských programech zaměřených na zlepšení mléčné produkce (Żukiewicz *et* al., 2012).

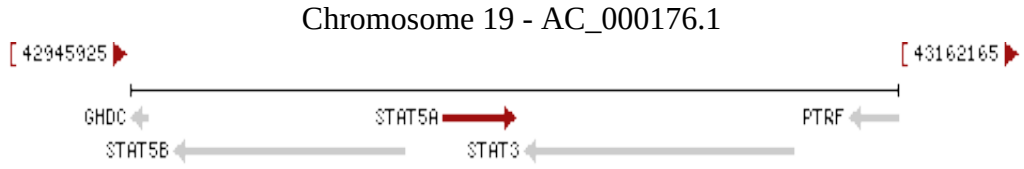
Gen *STAT5A* byl lokalizován na bovinním chromozomu 19 (Obr. 13) - (Selvaggi *et* al., 2009). Skládá se z devatenácti exonů kódujících 794 aminokyselin (Bao *et* al., 2010; Selvaggi *et* al., 2013). Substituce G→C *SNP12195* na 8. exonu a *SNP14217* na 9. intronu ovlivňuje množství mléčného proteinu a procentického obsahu tuku u holštýnsko-fríského plemene (Oikonomou *et* al., 2011; Selvaggi *et* al., 2013). U substituce *SNP12195* byl genotyp *GG* asociován s poklesem procentického obsahu mléčného proteinu a tuku (Khatib *et* al., 2008; Cosier *et* al., 2010).

Na tomto genu byly nalezeny dvě tranzice: A9501G na lokusu $P_1$, tranzice C12735T na lokusu $P_2$, která způsobila substituci aminokyselin Thr→IIe. U lokusu $P_1$ vykazuje *GG* genotyp vyšší dojivost (+945 kg) na první laktaci v porovnání s genotypem *AA*. Genotypy *AA* a *AG* asociují s vyšším obsahem bílkovin ve srovnání s genotypem *GG*. U lokusu $P_2$ bylo zjištěno, že genotyp *CT* zvyšuje procentický obsah bílkovin v mléce oproti genotypu *CC* (Selvaggi *et* al., 2009; Bao *et* al., 2010; Carşai and Vlaic, 2013).

U různých plemen (simmental, aberdeen angus, hereford, jersey, limousine, charolais a jersey) byla zjištěna významná převaha alely *T* (0,805–0,909) nad alelou *C* (0,091–0,195) (Selvaggi *et* al., 2009). Ve studii jerseyského skotu byly zaznamenány následující rozdíly mezi genotypy *TT* a *TC*: pro produkci mléka (5888,20 *vs*. 5896,74 kg), produkci tuku (261,81 *vs*. 242,54 kg), obsah tuku (4,55 *vs*. 4,14 %), obsah proteinů (3,77 *vs*. 3,79 %) a produkci proteinů (219,45 *vs*. 223,17 kg). U genotypu *TC* byla vyšší denní produkce mléka a celkový obsah sušiny (bílkovina a laktóza) ve srovnání s genotypem *TT* (Selvaggi *et* al., 2013). U plemene brown swiss produkovaly dojnice s genotypem *CT* méně mléka než dojnice s genotypem *CC* (5149,54 kg *vs*. 5418,68 kg), u tohoto genotypu byl výrazně bohatší obsah proteinů (+0,19 %) (Selvaggi *et* al., 2009). Dále byl nalezen polymorfizmus T12743C na 16.

exonu u polské populace fríského plemene. U tohoto polymorfizmu vykazoval genotyp *TC* v porovnání s genotypem *TT* vyšší produkci mléka, obsah sušiny, bílkovin a laktózy. U italské populace holštýnsko-fríského plemene byl genotyp *CT* asociován s vyšším obsahem proteinů v mléce (Carsai and Vlaic, 2013).

Mezi polymorfizmem *SNP12195* u genu *STAT5A* a polymorfizmem *SNP11646* u genu *FGF2* (Fibroblastový růstový faktor 2, fibroblast growth factor 2) viz kap. 3.7.6) byla zjištěna korelace s produkcí mléka. Polymorfizmus SNP12195 genu *STAT5A* lze využít pro genetické zlepšení produkce mléka u dojnic (Oikonomou *et* al., 2011).

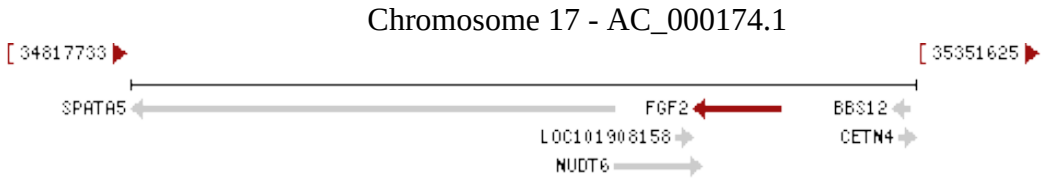



**Obr. 13** Lokalizace genu *STAT5A* a *STAT5B* na chromozomu 19 (NCBI, 2015)

### 3.7.6 Gen pro fibroblastový růstový faktor 2 (*FGF2*)

Gen pro fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2; fibroblast growth factor 2) se nachází v distální části chromozomu 6 (Wang *et* al., 2008). Primárním místem produkce *FGF2* u skotu je děložní epitel (Obr. 14) - (Cooke *et* al., 2009). Exprese *FGF2* u skotu probíhá v mléčné žláze a mohl by být důležitý pro rozvoj a reorganizaci mléčné žlázy. Asociace mezi polymorfizmem genu *FGF2* a produkcí mléka byla zkoumána u populace holštýnů v Izraeli (Wang *et* al., 2008).

Při výzkumu byl zjištěn pouze jeden SNP 1/G v poloze 11646 na intronu 1. Byly stanoveny genotypy *AA*, *AG* a *GG*. Frekvence alel byla: *A* = 0,35 a *G* = 0,65. Genotypové frekvence byly *AA* = 0,13, *AG* = 0,45 a *GG* = 0,42. Produkce tuku byla nejnižší u genotypu *AA* (13,83 kg) ve srovnání s genotypy *AG* (31,96 kg) a *GG* (26,14 kg). Genotyp *GG* byl spojen se zvýšeným obsahem mléčného tuku (Wang *et* al., 2008). Podle Oikonomou *et* al. (2011) neměl polymorfizmus *FGF2* významný vliv na produkci mléka.




**Obr. 14** Lokalizace genu *FGF2* na chromozomu 17 (NCBI, 2015)

### 3.7.7 Gen pro transkripční faktor hypofýzy (*POU1F1*)

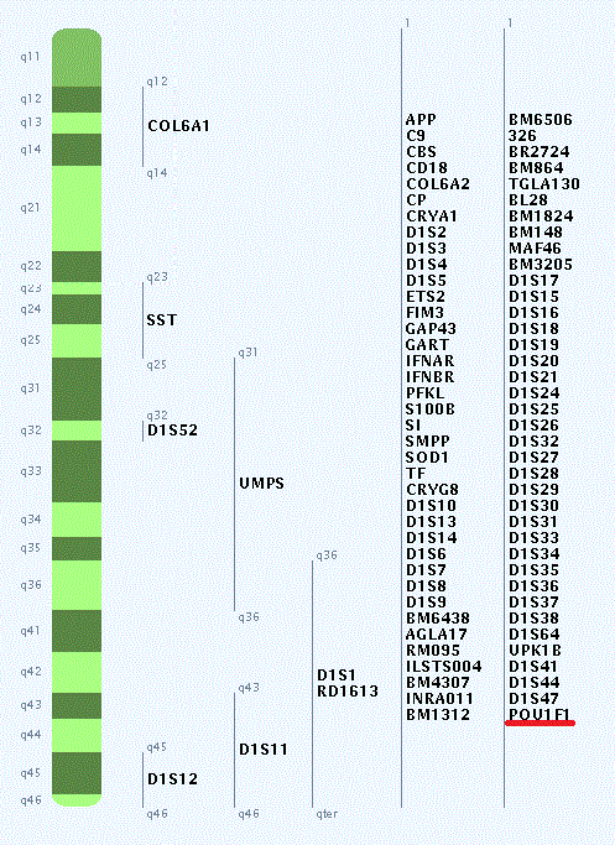
Bovinní transkripční faktor hypofýzy 1 (PIT-1; pituitary transcription factor 1) je členem domény POU (The Pituitary-specific PIT-1) obsahující proteiny a skupinu transkripčních regulátorů, které mají rozhodující úlohu v diferenciaci a proliferaci buněk. Inhibice syntézy PIT-1 vede k výraznému snížení exprese genů *PRL*, *GH* a *TRH* (tyreotropin uvolňující hormon; thyrotropin releasing hormone) v proliferaci somatotropních a laktotropních buněčných linií, které je produkují (Carrijo *et* al., 2008; Misrianti *et* al., 2010; Selvaggi and Dario, 2011).

Gen *PIT-1* má oficiální název *POU1F1* (pituitary specific positive transcription factor 1) (Selvaggi and Dario, 2011). Tento gen je zapojen do růstu a vývoje u savců (Carrijo *et* al., 2008). Kódující gen *PIT-1* je významný genetický marker pro hodnocení a zlepšení produkčních vlastností mléka u skotu (Doosti *et* al., 2011; Carsai *et* al., 2012; Trakovická *et* al., 2014) a dále má vliv na technologické vlastnosti mléka (Selvaggi and Dario, 2011).

Bovinní *PIT-1* byl mapován na bovinním chromozomu 1 v centromerické oblasti 1q21-q22 (Obr. 15). 6. exon kóduje polypeptidový řetězec o 291 aminokyselinách (~33 kD) (Selvaggi and Dario, 2011; Ozdemir *et* al., 2012).

U americké populace holštýnsko-fríského plemene byla nalezena substituce Pro76His nacházející se na 3. exonu, která byla asociována s mléčnou produkcí (Carsai *et* al. 2012). Alela *A* je u plemene holštýnsko-fríského spojována s vyšší dojivostí, obsahem tuku a bílkovin oproti alele *B*. U tohoto genu je žádaným genotypem *AB*, dojnice s tímto genotypem produkují více mléka než dojnice s genotypem *BB* (Javanmard *et* al., 2010; Misrianti *et* al., 2010; Doosti *et* al., 2011; Heidari *et* al., 2012; Trakovická *et* al., 2014). Frekvence genotypů u genu *PIT-1* byly u sledované populace holštýnskeho skotu následující: *AA* = 4 %, *AB* = 31 % a

*BB* = 65 % (Ozdemir *et* al., 2012). Naproti tomu u populace plemene brown swiss nebyl pozorován vliv *PIT-1* polymorfizmu na dojivost ani na složení mléka (Heidari *et* al., 2012; Trakovická *et* al., 2014).




**Obr. 15** Lokalizace genu *POU1F1* na chromozomu 1 (NAGRP, 2016)

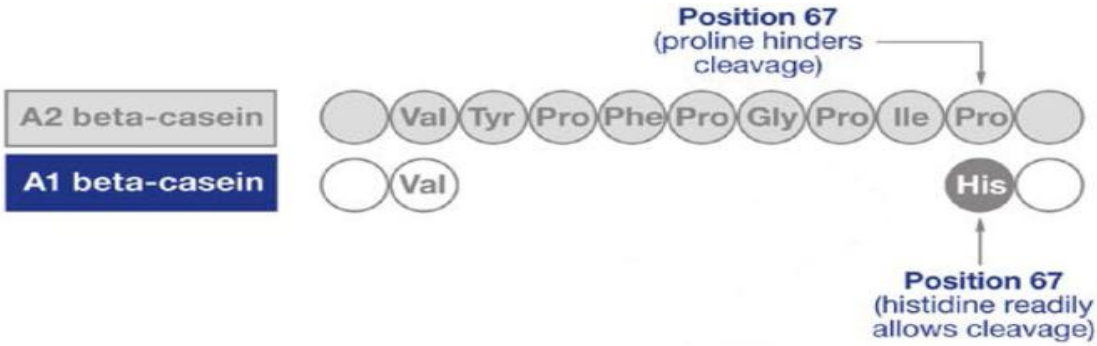
## 3. 8 A1 a A2 mléko a jeho vliv na lidské zdraví

Gen *CSN2* je lokalizován na 6. chromozomu a má délku 8,5 kb. Dvě jeho varianty *A1* a *A2* ovlivňují lidské zdraví, proto se mléko označuje jako A1 a A2 (Šrubařová and Dvořák). Alely $A_1$ a $A_2$ se liší v kódované aminokyselině na 67. pozici: $A_1$ kóduje His a $A_2$ kóduje Pro (Obr. 16) - (Kučerová *et* al., 2006; Kamiński *et* al., 2007). Výzkumy z Nového Zélandu naznačují, že je A2 mléko příznivější pro zdraví člověka než mléko A1 (Kamiński *et* al., 2007). A1 varianta je rizikovým faktorem *diabetes mellitus* typu 1 (DM-1) u dětí, ovlivňuje vznik neurologických, mentálních a koronárních onemocnění. Oproti tomu A2 varianta redukuje hladinu cholesterolu v krevním séru, snižuje koncentraci nízkodenzitních lipoproteinů (LDL; low density lipoprotein) a je vhodná jako prevence různých cévních onemocnění

(Šrubařová and Dvořák, 2007; Sodhi *et* al., 2012). Studie vykazující asociaci mezi příjmem A1 mléka s výskytem DM-1 u dětí mladších 15 let byly provedeny v následujících zemích: Austrálie, Kanada, Dánsko, Finsko, Německo, Island, Nový Zéland, Norsko, Švédsko a USA-San Diego (Kamiński *et* al., 2007). Při pokusech na myších, které probíhaly 250 dní, bylo zjištěno, že při krmení dietou obsahující mléko od dojnic s alelou *A1* se téměř u poloviny jedinců projevil *diabetes mellitus*, oproti tomu u myší s dietou obsahující mléko od krav s alelou *A2* se onemocnění neprojevilo (Sharma *et* al., 2012).

Výskyt variant A1 a A2 se liší v rámci plemene, holštýnsko-fríské plemeno má přibližně stejné zastoupení alel *A1* a *A2*, plemeno jersey nese ze 35 % alelu *A1*, guernsey z 10 % alelu *A1* a u skotské populace ayrshirského plemene se tato alela vyskytuje s frekvencí více než 50 % (Sharma *et* al., 2012). U dojených plemen severoevropského původu (holštýnsko-fríský, ayrshire a shorthorn) je alela *A1* považována za hlavní variantu genu *CSN2* v mléce. Varianta *A2* se naopak nachází častěji v mléce plemen guernsey, jersey, charolais a limousine (Truswell *et* al., 2005).

V roce 2000 byla zřízena společnost *A2 Corporation s.r.o.* se sídlem na Novém Zélandu a s mezinárodními investory s jasným cílem vytvořit mléko prospěšné lidskému zdraví. Technologie patentovaná v roce 1989 byla zaměřena na produkci dojnic, jejichž mléko by obsahovalo pouze variantu *A2*, a dále na distribuci tohoto mléka jako jedinečného produktu (Truswell *et* al., 2005; Kamiński *et* al., 2007; Sharma *et* al., 2012). Od roku 2003 bylo mléko A2 prodáváno na Novém Zélandu a v Austrálii. Marketingová kampaň se také rozjela v Asii i v USA (Kamiński *et* al., 2007) a vyjednává se kontrakt s Evropou (Šrubařová and Dvořák, 2007).




**Obr. 16** Rozdíl v kódované aminokyselině na pozici 67 u alel *A1* a *A2 β-CN* (MDPI-Open Access Publishing, 2016)

## 3.9 Závěr

V posledních letech se do popředí dostává studium genetických markerů a možnosti jejich uplatnění v selekci a šlechtění. To vše se uskutečňuje s využitím molekulárně-genetických metod, jejichž předmětem zájmu je mj. mapování genomu a studium polymorfizmu na úrovni DNA (Šrubařová and Dvořák). Pro lepší orientaci v této problematice byla sestavena databáze, kde jsou vybrány nejdůležitější genetické markery pro mléčnou produkci. U skotu je asociováno 344 QTL se znaky mléčné produkce (Ogorevc *et* al., 2009).

Mapování QTL není důležité pouze z hlediska zájmu identifikovat geny a pochopit podstatu QTL, ale také pro praktické využití těchto znalostí ve šlechtění. Velmi významná studie, která odstartovala další výzkumy mléčných bílkovin, byla detekce alel *A* a *B* genu *β-LG* u skotu, které působí příznivě na koagulaci mléka a srážlivost sýřeniny. Tím začal zájem o genetické polymorfizmy hlavních mléčných bílkovin. Dalším genem ovlivňujícím obsah a kvalitu mléčné bílkoviny je *κ-CN*, u kterého genotyp *BB* výrazně zvyšuje sýřitelnost. Geny *β-CN* a $\alpha_S$*-CN* ovlivňují průběh koagulace. Byly detekovány polymorfizmy u genů všech hlavních mléčných bílkovin zlepšující nutriční hodnotu mléka a jeho technologickou kvalitu. Tyto informace lze využít pro genetickou selekci.

Dalšími důležitými geny pro zlepšení jakostních parametrů mléka i zvýšení mléčné užitkovosti jsou *DGAT1*, *SCD*, *GH*, *GHR*, *STAT5A* a *PIT-1*. Alela *K* u genu *DGAT1* podporuje vyšší obsah mléčného tuku v mléce. U genu *SCD* genotyp *AG* pozitivně působí na zvýšení mléčné produkce. Nejvýznamější substituce $GH1^{LL}$ je Leu→Val na pozici 127 spojená s produkcí mléka o vysokém obsahu mléčných

bílkovin a mléčného tuku. U genu *GHR* je alela *A* asociována s vyšším obsahem mléčných bílkovin, oproti tomu je alela *G* asociována s pozitivním vlivem na výtěžek mléčného tuku. Prozatimní studie poukazují, že genotyp *TC* genu *STAT5A* pozitivně ovlivňuje mléčnou produkci (vyšší obsah tuku a bílkovin). U genu *PIT-1* je alela *A* spojována s vyšší dojivostí. Gen *FGF2* podle zatím málo provedených studií nelze považovat za významný pro produkci či složení mléka u skotu.

Od roku 2000 se trh snaží nabídnout mléko s prospěšnými vlastnostmi na zdraví jedince. Výběr kvalitnějšího mléka může pomoci předcházet civilizačním chorobám.

Genetické markery pro mléčnou užitkovost jsou studovány různými metodami u mnoha plemen skotu. Stanovení genotypů těchto markerů u plemenných býků a plemenic umožní lepší výběr jedinců se žádanými vlastnostmi, a tím zajištění vyššího ekonomického zisku.

# 4. Seznam použité literatury


Alim M. A., Fan Y. P., Wu X. P., Xie Y., Zhang Y., Zhang S. L., Sun D. X., Zhang Y., Zhang Q., Liu L., Guo G. Genetic effects of stearoyl-coenzyme A desaturase (SCD) polymorphism on milk production traits in the Chinese dairy population. *Molecular Biology Reports*. 2012, vol. 39, issue 9, 8733-8740.

Arango J., Echeverri J.J., López A. Association between a polymorphism in intron 3 of the bovine growth hormone gene and growth traits in Holstein heifers in Antioquia. *Genetics and Molecular Research*. 2014, vol. 13, issue 3, 6191-6199.

Ardiyanti A., Abe T., Tameoka N., Kobayashi E., Shoji N., Ohtani Y., Suzuki K., Roh S., Katoh K. Effects of Growth Hormone Gene Polymorphism on Lipogenic Gene Expression Levels in Diaphragm Tissues of Japanese Black Heifers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2012, vol. 25, issue 8, 1055-1062.

Argov-Argaman A., Mida K., Cohen B.-Ch., Visker M., Hettinga K. Milk Fat Content and DGAT1 Genotype Determine Lipid Composition of the Milk Fat Globule Membrane. *Plos One.* 2013, vol. 8, issue 7, e68707.

Azevedo A.L.S., Nascimento C.S., Steinberg R.S., Carvalho M.R.S., Peixoto M.G.C.D., Teodoro R.L., Verneque R.S., Guimaraes S.E.F., Machado M.A. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research*. 2008, vol. 7, issue 3, 623-630.

Bao B., Zhang Ch., Fang X., Zhang R., Gu Ch., Lei Ch., Chen H. Association between polymorphism in STAT5A gene and milk production traits in Chinese Holstein cattle. *Animal Science Papers and Reports.* 2010, vol. 28, issue 1, 5-11.

Beran O. Co přináší poznání genomu skotu. *Zpravodaj českého svazu chovatelů.* 2009, 16, 3, 46-49.

Bonfatti V., Cecchinato A., Gallo L., Blasco A., Carnier P. Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle. *Journal of Dairy Science*. 2011, vol. 94, issue 10, 5183-5193.

Bonfatti V., Di Martino G., Cecchinato A., Degano L., Carnier P. Effects of β-κ-casein (CSN2-CSN3) haplotypes, β-lactoglobulin (BLG) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of

Simmental cows. *Journal of Dairy Science*. 2010 a, vol. 93, issue 8, 3809-3817.

Bonfatti V., Di Martino G., Cecchinato A., Vicario D., Carnier P. Effects of β-κ-casein (CSN2-CSN3) haplotypes and β-lactoglobulin (BLG) genotypes on milk production traits and detailed protein composition of individual milk of Simmental cows. *Journal of Dairy Science*. 2010 b, vol. 93, issue 8, 3797-3808.

Bouwman A. C, Bovenhuis H., Visker M. HPW, Arendonk J. AM van. Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle. *BMC Genetics*. 2011, vol. 12, issue 1.

Braunschweig M.H., Leeb T. Aberrant Low Expression Level of Bovine β-Lactoglobulin Is Associated with a C to A Transversion in the BLG Promoter Region. *Journal of Dairy Science*. 2006, vol. 89, issue 11, 4414-4419.

Bruford, M.W., Bradley, D.G., Luikart, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat. Rev., Genet*. 2003, 4, 901–910.

Bu G., Luo Y., Zheng Z., Zheng H. Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α-lactalbumin and β-lactoglobulin in whey protein isolate. *Food and Agricultural Immunology*. 2009, vol. 20, issue 3, 195-206.

Bylund G. Dairy processing handbook, *Tetra Pak Processing Systems AB S-221 86 Lund, Sweden*, 1995, Chapter 1, Primary production of milk, s. 1-12., Chapter 2, The chemistry of milk, 13-36.

Caroli A., Chessa S., Bolla P., Budelli E., Gandini G.C. Genetic structure of milk protein polymorphisms and effects on milk production trans in a local dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics.* 2004, 121, 119-127.

Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science*. 2009, vol. 92, issue 11, 5335-5352.

Caroli A., Chessa S., Chiatti F., Rignanese D., Meléndez B., Rizzi R., Ceriotti G. Short Communication: Carora Cattle Show High Variability in αs1-Casein. *Journal of Dairy Science*. 2008, vol. 91, issue 1, 354-359.

Carrijo S.M., Alencar M.M. de, Toral F.L.B., Regitano L. C. de A. Association of PIT1 genotypes with growth traits in Canchim cattle. *Scientia Agricola*. 2008, vol. 65, issue 2, 116-121.

Carsai T.C., Balteanu V.A., Vlaic A., Cosier V. The Polymorphism of Pituitary Factor 1 (POU1F1) in Cattle. *Animal Science and Biotechnologies.* 2012, vol. 45, issue 1, 142-146.

Carsai T.C., Vlaic A. The polymorphism of RseI type at STAT 5A locus in cattle. *Animal Biology & Animal Husbandry - International Journal of the Bioflux Society*. 2013, vol. 5, issue 2, 236-240.

Comin A., Cassandro M., Chessa S., Ojala M., Dal Zotto R., De Marchi M., Carnier P., Gallo L., Pagnacco G., Bittante G. Effects of Composite β- and κ-Casein Genotypes on Milk Coagulation, Quality, and Yield Traits in Italian Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*. 2008, vol. 91, issue 10, 4022-4027.

Cooke F. N T, Pennington K. A, Yang Q., Ealy A. D, Several fibroblast growth factors are expressed during pre-attachment bovine conceptus development and regulate interferon-tau expression from trophectoderm. *Reproduction*. 2009, vol. 137, issue 2, 259-269.

Coşier V., Vlaic A., Constantinescu R., Gulea A., Pop I.A., Peter D. Research Concerning the PCR-RFLP/Eco88I Polymorphism of STAT5A Gene in Romanian Simmental Cattle. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies.* 2010 vol. 67 (1-2).

Czerniawska-Piątkowska E., Kamieniecki H., Pilarczyk R., Rzewucka E. A comparison of protein polymorphisms in milk produced by two dairy farms in West Pomerania. *Archiv Tierzucht, Dummerstorf*. 2004, vol. 47, issue 2, 155-163.

Deepika, Salar R.K. Polymorphism Studies of Growth Hormone Receptor (GHR) Gene in Indigenous Grey Cattle Breeds if India. *DHR International Journal of Biomedical and Life Sciences.* 2013, vol. 4, issue 2, 270-277.

Demeter R.M., Markiewicz K., van Arendonk J.A.M., Bovenhuis H. Relationships between milk protein composition, milk protein variants, and cow fertility traits in Dutch Holstein-Friesian cattle. *Journal of Dairy Science*. 2010, vol. 93, issue 11, 5495-5502.

Dong C.H., Song X.M., Zhang L., Jiang J.F., Zhou J.P., Jiang Y.Q. New insights into the prolactin-RsaI (PRL-RsaI) locus in Chinese Holstein cows and its effect on milk performance traits. *Genetics and Molecular Research*. 2013, vol. 12, issue 4, 5766-5773.

Doosti A., Arshi A., Momeni B. Molecular study of PIT1 gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle. *African Journal of Agricultural Research.* 2011, vol. 6, issue 19, 4467-4470.

Duchemin S., Bovenhuis H., Stoop W.M., Bouwman A.C., van Arendonk J.A.M., Visker M.H.P.W. Genetic correlation between composition of bovine milk fat in winter and summer, and DGAT1 and SCD1 by season interactions. *Journal of Dairy Science*. 2013, vol. 96, issue 1, 592-604.

Ecroyd H., Thorn D.C., Liu Y., Carver J.A. The dissociated form of κ-casein is the precursor to its amyloid fibril formation. *Biochemical Journal*. 2010, vol. 429, issue 2, 251-260.

Fürbass R., Winter A., Fries R., Kühn Ch. Alleles of the bovine DGAT1 variable number of tandem repeat associated with a milk fat QTL at chromosome 14 can stimulate gene expression. *Physiological Genomics*. 2006, vol. 25, issue 1, 116-120.

Gallinat J.L., Qanbari S., Drögemüller C., Pimentel E.C.G., Thaller G., Tetens J. DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. *Journal of Dairy Science*. 2013, vol. 96, issue 1, 699-709.

Gambra R., Peñagaricano F., Kropp J., Khateeb K., Weigel K.A., Lucey J., Khatib H. Genomic architecture of bovine κ-casein and β-lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*. 2013, vol. 96, issue 8, 5333-5343.

Garrett A. J., Rincon G., Medrano J.F., Elzo M.A., Silver G.A., Thomas M.G. Promoter region of the bovine growth hormone receptor gene: Single nucleotide polymorphism discovery in cattle and association with performance in Brangus bulls. *Journal of Animal Science*. 2008, vol. 86, issue 12, 3315-3323.

Gassaway L.V.M. Genomika v praxi USA [online]. [s.l.] : MTS spol. s r.o., 2011., c2011 [cit. 2011-10-25].

Goddard M.E., Hayes B.J. Genomic selection. *J. Anim. Breed. Genet. 124*. 2007, 323–330.

Grisart B., Farnir F., Karim L., Cambisano N., Kim J.-J., Kvasz a., Mni M., Simon P., Frere J.-M., Coppieters W., Georges M. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, vol. 101, issue 8, 2398-2403.

Grochowska R., Sorensen P., Zwierzchowski L., Snochowski M., Lovendahl P. Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-I of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. *Journal of Animal Science.* 2001, vol. 79, 469-477.

Heck J.M.L., Schennink A., van Valenberg H.J.F., Bovenhuis H., Visker M.H.P.W., van Arendonk J.A.M., van Hooijdonk A.C.M.. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 2009, vol. 92, issue 3, 192-1202.

Heidari M., Azari M. A., Hasani S., Khanahmadi A., Zerehdaran S. Effect of polymorphic variants of GH, Pit-1, and β-LG genes on milk production of Holstein cows. *Russian Journal of Genetics*. 2012, vol. 48, issue 4, 417-421.

Hradecká E., Čítek J., Panicke L., Řehout V., Hanusová L. The relation of GH1, GHR and DGAT1 polymorphisms with estimated breeding values of milk production traits of German Holstein sires. *Czech Journal of Animal Science.* 2008, vol. 53, issue 6, 238-245.

Hristov P., Teofanova D., Mehandzhiyski I., Zagorchev L., Radoslavov G. Application of Milk Proteins Genetic Polymorphism for Selection and Breeding of Dairy Cows in Bulgaria. *Milk Production - Advanced Genetic Traits, Cellular Mechanism, Animal Management and Health*. InTech, 2012., chapter 2.

Huang W., Peñagaricano F., Ahmad K.R., Lucey J.A., Weigel K.A., Khatib H. Association between milk protein gene variants and protein composition traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science.* 2012, vol. 95, issue 1, 440-449.

Ishii A., Yamaji K., Uemoto Y., Sasago N., Kobayashi E., Kobayashi N., Matsuhashi T., Maruyama S., Matsumoto H., Sasazaki S., Mannen H. Genome-wide association study for fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*. 2013, 1-8.

Jacobs A. A. A., Dijkstra J., Liesman J. S., VandeHaar M. J., Lock A. L., van Vuuren A. M., Hendriks W. H., van Baal J. Effects of short- and long-chain fatty acids on the expression of stearoyl-CoA desaturase and other lipogenic genes in bovine mammary epithelial cells. *Animal*. 2013, vol. 7, issue 09, 1508-1516.

Jann O., Prinzenberg E.M., Brandt H., Williams J.L., Ajmone-Marsan P., Zaragoza P., Özbeyaz C., Erhardt G. Intragenic haplotypes at the bovine CSN1S1 locus. *Archiv Tierzucht, Dummerstorf*. 2002, vol. 45, issue 1, 13-21.

Javanmard A., Asadzadeh N., Sarhadi F. DNA Polymorphism of Bovine Pituitary-Specific Transcription Factor and Leptin Gene Between Iranian Bos indicus and Bos taurus Cattle. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences.* 2010, vol. 5, issue 3, 282-285.

Juhlin J., Fikse W.F., Pickova J., Lundén A. Association of DGAT1 genotype, fatty acid composition, and concentration of copper in milk with spontaneous oxidized flavor. *Journal of Dairy Science*. 2012, vol. 95, issue 8, 4610-4617.

Kamiński S. Polymorphism of milk protein genes in coding and regulatory regions and their effects on gene expression and milk performance trans. *Animal Science Papers and Reports.* 2004, vol. 22, issue 1, 109-113.

Kamiński S., Cieślińska A., Kostyra E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*. 2007, vol. 48, issue 3, 189-198.

Kaplanová K., Dufek A., Dračková E., Simeonovová J., Šubrt J., Vrtková I., Dvořák J. The association of CAPN1, CAST, SCD, and FASN polymorphisms with beef quality traits in commercial crossbred cattle in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science.* 2013, vol. 58, issue 11, 489-496.

Khatib H., Monson R.L., Schutzkus V., Kohl D.M., Rosa G.J.M., Rutledge J.J. Mutations in the STAT5A Gene Are Associated with Embryonic Survival and Milk Composition in Cattle. *Journal of Dairy Science*. 2008, vol. 91, issue 2, 784-793.

Kishore A., Sodhi M., Mukesh M., Mishra B.P., Sobti R.C. Sequence analysis and identification of new variations in the 5′-flanking region of αS2-casein gene in Indian zebu cattle. *Molecular Biology Reports*. 2013, vol. 40, issue 7, 4473-4481.

Koczan D., Hobom G., Seyfert H.-M. Genomic organization of the bovine alpha-S1 casein gene. *Nucleic Acids Research.* 1991, vol. 19, issue 20, 5591-5596.

Kučerová J., Matějíček A., Jandurová O.M., Sørensen P., Němcová E., Štípková M., Kott T., Bouška J., Frelich J. Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science.* 2006, vol. 51, issue 6, 241-247.

Kuehn Ch., Edel Ch., Weikard R., Thaller G. Dominance and parent-of-origin effects of coding and non-coding alleles at the acylCoA-diacylglycerol-acyltransferase (DGAT1) gene on milk production traits in German Holstein cows. *BMC Genetics*. 2007, vol. 8, issue 1, 62-71.

Lee J. H., Lee Y. M., Lee J. Y., Oh D. Y., Jeong D. J., Kim J. J. Identification of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the Bovine Growth Hormone (-italic-bGH-italic-) Gene Associated with Growth and Carcass Traits in Hanwoo. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2013, vol. 26, issue 10, 1359-1364.

Liu, Z.J., Cordes, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 2004, 1-37.

Lukač D., Vidović V., Nemeš Ž., Stupar M., Popović-Vranješ A. Genotypic frequencies of the β-lactoglobulin, κ-casein and transferrin in Serbian Holstein-Friesian dairy cattle. *Genotypic frequencies in diary cattle, Mljekarstvo.* 2013, vol. 63, issue 4, 203-210.

Luna-Nevarez P., Rincon G., Medrano J. F., Riley D. G., Chase C. C., Coleman S. W., VanLeeuwen D. M., DeAtley K. L., Islas-Trejo A., Silver G. A., Thomas M. G. Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone-insulin-like growth factor axis in straightbred and crossbred Angus, Brahman, and Romosinuano heifers: Population genetic analyses and association of genotypes with reproductive phenotypes. *Journal of Animal Science*. 2011, vol. 89, issue 4, 926-934.

Lü A., Hu X., Chen H., Jiang J., Zhang Ch., Xu H., Gao X. Single nucleotide polymorphisms in bovine PRL gene and their associations with milk production traits in Chinese Holsteins. *Molecular Biology Reports*. 2010, vol. 37, issue 1, 547-551.

Lühken G., Caroli A., Ibeagha-Awemu E.M., Erhardt G. Characterization and genetic analysis of bovine α s1 -casein I variant. *Animal Genetics*. 2009, vol. 40, issue 4, 479-485.

Matějíček A., Matějíčková J., Štípková M., Hanuš O., Genčurová V., Kysel'ová J., Němcová E., Kott T., Šefrová J., Krejčová M., Melčová S., Hölzelová I., Bouška J., Frelich J. Joint effects of CSN3 and LGB genes on milk quality and coagulation properties in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science*. 2008, vol. 53, issue 6, 246-252.

Mbwana, J., Bölin, I., Lyamuya, E., Mhalu, F., Lagergård, T. (2006) Molecular Characterization of *Haemophilus ducreyi* Isolates from Different Geographical Locations. *Journal of Clinical Microbiology 44 (1)*, 2006, 132-137.

MDPI - Open Access Publishing. [online]. [cit. 2016-03-31]. Dostupné z: *http://www.mdpi.com/nutrients/nutrients-07-05339/article_deploy/html/images/nutrients-07-05339-g001-1024.png*

Mehmannavaz Y., Ghorbani A. Genetic Polymorphisms of Some Bovine Lactogenic Hormones. *Milk Production - Advanced Genetic Traits, Cellular Mechanism, Animal Management and Health*. InTech, 2012, 53-76.

Miluchová M., Gábor M., Trakovická A. Analysis of Beta-Casein Gene (CSN2) Polymorphism in Different Breeds of Cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnologies.* 2014, vol. 47, issue 1, 82-85.

Miluchová M., Trakovická A., Gábor M. Analysis of Polymorphism of alpha S1 casein of Slovak Pinzgau by PCR-RFLP. *Zootehnie si Biotehnologii*. 2009, vol. 42, issue 2, 284-287.

Misrianti R, Sumantri C, Farajallah A. Polymorphism Identification of Pit1 Gene in Indonesian Buffaloes (Bubalus bubalis) and Holstein-Friesian Cows. *Media Peternakan*. 2010, vol. 33, issue 3, 131-136.

Mukhopadhyay C.S., Kumar D. Genomic Selection: Its Prospects and Challenges. School of Animal Biotechnology, GADVASU, Ludhiana, Punjab. Senior Scientist, CABIN, IASRI, Pusa, New Delhi. 2013. 186-200.

Mullen M.P., Lynch C.O., Waters S.M., Howard D.J., O'Boyle P., Kenny D.A., Buckley F., Horan B., Diskin M.G. Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and insulin-like growth factor-1 genes are associated with milk production, body condition score and fertility traits in dairy cows. *Genetics and Molecular Research*. 2011, vol. 10, issue 3, 1819-1830.

NAGRP (National Animal Genome Research Program) *NAGRP Cattle Genome Coordination Program.* [online]. [cit. 2016-03-31]. Dostupné z:*http://www.animalgenome.org/cattle/maps/cytomap/*

NCBI (National Center for Biotechnology Information Search database) *Gene.* [online]. [cit. 2016-03-31]. Dostupné z: *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=CSN3+bos+taurus*

Nilsen H., Olsen H., Hayes B., Sehested E., Svendsen M., Nome T., Meuwissen T., LIEN S. Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle. *Genetics Selection Evolution*. 2009, vol. 41, issue 1, 24-36.

Normal karyotypes in domestic animals. Dostupné z: http://www.ihh.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetics/10/2.htm

Ogorevc J., Kunej T., Razpet A., Dovc. P. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*. 2009, vol. 40, issue 6, 832-851.

Oh D., Jin M., Lee Y., Ha J., Kim B., Yeo J. Identification of Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) Gene Interactions in Korean Native Cattle Based on the Multifactor-dimensionality Reduction Method. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2013, vol. 26, issue 9, 1218-1228.

Oikonomou G., Michailidis G., Kougioumtzis A., Avdi M., Banos G. Effect of polymorphisms at the STAT5A and FGF2 gene loci on reproduction, milk yield and lameness of Holstein cows. *Research in Veterinary Science*. 2011, vol. 91, issue 2, 235-239.

Ozdemir M. Determination of PIT-1/HINF1 Polymorphism in Holstein and native ear cattle raised as genetic resource in Turkey. *The Journal of Animal & Plant Sciences.* 2012, vol. 22, issue 1, 25-28.

Penasa M., Cassandro M., Pretto D., De Marchi M., Comin A., Chessa S., Dal Zotto R., Bittante G. Short communication: Influence of composite casein genotypes

on additive genetic variation of milk production traits and coagulation properties in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*. 2010, vol. 93, issue 7, 3346-3349.

Perna A., Intaglietta I., Simonetti A., Gambacorta E. Effect of genetic type and casein haplotype on antioxidant activity of yogurts during storage. *Journal of Dairy Science*. 2013, vol. 96, issue 6, 3435-3441.

Poulsen N.A., Bertelsen H.P., Jensen H.B., Gustavsson F., Glantz M., Lindmark M.H., Andrén A., Paulsson M., Bendixen C., Buitenhuis A.J., Larsen L.B. The occurrence of noncoagulating milk and the association of bovine milk coagulation properties with genetic variants of the caseins in 3 Scandinavian dairy breeds. *Journal of Dairy Science*. 2013, vol. 96, issue 8, 4830-4842.

Poulsen N.A., Gustavsson F., Glantz M., Paulsson M., LarsenL.B., Larsen M.K. The influence of feed and herd on fatty acid composition in 3 dairy breeds (Danish Holstein, Danish Jersey, and Swedish Red). *Journal of Dairy Science*. 2012, vol. 95, issue 11, 6362-6371.

Prinzenberg E.-M., Weimann C., Brandt H., Bennewitz J., Kalm E., Schwerin M., Erhardt G. Polymorphism of the Bovine CSN1S1 Promoter: Linkage Mapping, Intragenic Haplotypes, and Effects on Milk Production Traits. *Journal of Dairy Science*. 2003, vol. 86, issue 8, 2696-2705.

Riley L.G., Wynn P.C., Williamson P., Sheehy P.A. The role of native bovine α-lactalbumin in bovine mammary epithelial cell apoptosis and casein expression. *Journal of Dairy Research*. 2008, vol. 75, issue 03, 319-325.

Rincón J.C., López-Herrera A., Echeverri J.J. Effect of two single nucleotide polymorphisms on milk yield and composition. *Genetics and Molecular Research*. 2013, vol. 12, issue 2, 995-1004.

Sabahelkheir M.K., Fat en M.M., Hassan A.A. Amino Acid Composition of Human and Animal's Milk (Camel, Cow, Sheep and Goat). *Journal of Science and Technology*. 2012, vol. 2, 2-34.

Sanders K., Bennewitz J., Reinsch N., Thaller G., Prinzenberg E.-M., Kühn C., Kalm E. Characterization of the DGAT1 Mutations and the CSN1S1 Promoter in the German Angeln Dairy Cattle Population. *Journal of Dairy Science*. 2006, vol. 89, issue 8, 3164-3174.

Selvaggi M., Dario C. Analysis of two Pit-1 gene polymorphisms: Single nucleotide polymorphisms (SNPs) distribution patterns in Podolica cattle breed. *African Journal of Biotechnology*. 2011, vol. 10, issue 55, 11360-11364.

Selvaggi M., Dario C., Normanno G., Celano G.V., Dario M. Genetic polymorphism of STAT5A protein: relationships with production traits and milk composition

in Italian Brown cattle. *Journal of Dairy Research*. 2009, vol. 76, issue 04, 441.

Selvaggi M., Tufarelli V., Pinto F., Centoducati G., Damrosio A., Santacroce M.P., Dario C. Bovine STAT5A Gene Polymorphism Analysis and Its Association with Milk Composition Traits in Jersey Cows. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics.* 2013, vol. 3, issue 4, 341-344.

Shahlla N. M., Obaid U., Riazuddin S. Genetic polymorphism of milk protein variants and their association studies with milk yield in Sahiwal cattle. *African Journal of Biotechnology*. 2014, vol. 13, issue 4, 555-565.

Sharma N., Sharma V., Nautiyal S.Ch., Singh P.R., Kushwaha R.S., Sailwal S., Ghosh S., Naushad A., Singh R.K. A1, A2 Beta casein variants in cows – its impact on modern human health. *International Journal of Research in Social Sciences.* 2012, vol. 2, issue 4, 705-718.

Schopen G.C.B., Heck J.M.L., Bovenhuis H., Visker M.H.P.W., van Valenberg H.J.F., van Arendonk J.A.M. Genetic parameters for major milk proteins in Dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science.* 2009, vol. 92, issue 3, 1182-1191.

Schopen G.C.B., Visker M.H.P.W., Koks P.D., Mullaart E., van Arendonk J.A.M., Bovenhuis H. Whole-genome association study for milk protein composition in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2011, vol. 94, issue 6, 3148-3158.

Sodhi M., Mukesh M., Kataria R.S., Mishra B.P., Joshii B.K. Milk proteins and human health: A1/A2 milk hypothesis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism.* 2012, vol. 16, issue 5, 856.

Šrubařová P., Dvořák J. Analýza Genomického markeru CSN2 v mléce skotu.

Tian Y.G., Yue M., Gu Y., Gu W.W., Wang Y.J. Single-nucleotide polymorphism analysis of GH, GHR, and IGF-1 genes in minipigs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2014, vol. 47, issue 9, 753-758.

Toro M.A., Fernández J., Caballero A. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science [online]*. 2009, 120(3), 174-195.

Trakovická A., Gábor M. Genetic Structure of Alpha S1 Casein in Slovak Pinzgau Cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnologies.* 2011, vol. 44, issue 1, 345-347.

Trakovická A., Moravčíková N., Gábor M., Miluchová M. Genetic polymorphism of Pit-1 gene associated with milk production traits in Holstein cattle. *Acta Agraria Kaposváriensis.* 2014, vol. 18, issue 1, 146-151.

Treweek T.M., Thorn D.C., Price W.E., Carver J.A. The chaperone action of bovine milk αS1- and αS2-caseins and their associated form αS-casein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011, vol. 510, issue 1, 42-52.

Truswell A S. The A2 milk case: a critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2005, vol. 59, issue 5, 623-631.

Ulutas Z., Yildirim M. Genetic Variants of β-Lactoglobulin, $\alpha_{s1}$-Casein and β-Casein of Milk in East Anatolian Red Cattle Breed. *Asian Journal of Chemistry*. 2009, vol. 21, issue 1, 795-801.

Urban T. Virtuální svět genetiky 3: principy genetiky populací a kvantitativních znaků. Brno: AF MZLU,. *QTL & MAS-genetické markery*. [online].01.06.2012 [cit. 2016-03-31]. Dostupné z: *http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/qtl/qtl2.html*

Velíšek J. Chemie potravin I. 2. uprav. vyd. Tábor: OSSIS, 2002., 1038, ISBN 80-86659-03-8.

Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and thein use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*. 2002, vol. 34, issue 3, 275-305.

Viitala S., Szyda J., Blott S., Schulman N., Lidauer M., Mäki-Tanila A., Georges M., Vilkki J. The Role of the Bovine Growth Hormone Receptor and Prolactin Receptor Genes in Milk, Fat and Protein Production in Finnish Ayrshire Dairy Cattle. *Genetics*. 2006, vol. 173, issue 4, 2151-2164.

Wang X., Maltecca C., Tal-Stein R., Lipkin E., Khatib H. Association of Bovine Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) Gene with Milk Fat and Productive Life: An Example of the Ability of the Candidate Pathway Strategy to Identify Quantitative Trait Genes. *Journal of Dairy Science*. 2008, vol. 91, issue 6, 2475-2480.

Weller J.I., Golik M., Seroussi E., Ezra E., Ron M. Population-Wide Analysis of a QTL Affecting Milk-Fat Production in the Israeli Holstein Population. *Journal of Dairy Science*. 2003, vol. 86, issue 6, 2219-2227.

Yokota S., Sugita H., Ardiyanti A., Shoji N., Nakajima H., Hosono M., Otomo Y., Suda Y., Katoh K., Suzuki K. Contributions of FASN and SCD gene polymorphisms on fatty acid composition in muscle from Japanese Black cattle. *Animal Genetics*. 2012, vol. 43, issue 6, 790-792.

Zhou G.L., Jin H.G., Liu Ch., Guo S.L., Zhu Q., Wu Y.H. Association of genetic polymorphism inGH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *Journal of Biosciences*. 2005, vol. 30, issue 5, 595-598.

Żukiewicz, A., Grzesiak W., Szatkowska I., Błaszczyk P., Dybus A.Genetic Factors of Milk Yield in Dairy Cattle – Advances in the Quest for Universal Markers. *Israel Journal of Veterinary Medicine.* 2012, vol. 67, issue 2, 82-91.

# 5. Seznam použitých zkratek

AFLP - Amplified Fragment Lenght Polymorphism; polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů

Ala - alanine; alanin

Asp - aspartic acid; kyselina asparagová

Asn - asparagine; asparagin

α-LA - alpha laktalbumin; alfa laktalbumin

$\alpha_{S1}$-CN - alpha S1 casein; alfa S1 kasein

$\alpha_{S2}$-CN - alpha S2 casein; alfa S2 kasein

β-CN - beta casein; beta kasein

β-LG - beta lactoglobulin; beta laktoglobulin

bp - base pair; bázové páry

BTA - *Bos taurus* autosome; bovinní chromozom

CMP - caseinomacropeptid; rozpustný kaseinový komplex

CN - casein; kasein

Cys - cysteine; cystein

DGAT 1 - acylCoA: diacyglycerol transferase 1; acylCoA: diacyglycerol transferáza 1

DM-1 - *diabetes mellitus* type 1; *diabetes mellitus* typu 1

DNA - deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina

FA - fatty acid; mastná kyselina

FGF2 - fibroblast growth factor 2; fibroblastový růstový faktor 2

GH - growth hormon; růstový hormon

GHR - growth factor receptor; receptor pro růstový hormon

Gln - glutamine; glutamin

Glu - glutamic acid; kyselina glutamová

Gly - glycine; glycin

GS - genomic selection; genomická selekce

His - histidine; histidin

IGF1 - insulin-like growth factor 1; inzulin růstový faktor 1

Ile - isoleucine; izoleucin

κ-CN - kappa casein; kappa kasein

kb - kilobase; kilobáze

kDA - kilodalton; kilodalton

Leu - leucine; leucin

Lys - lysine; lysin

MAS - Marker-Assisted Selection; markery asistovaná selekce

Met - methionine; methionin

mtDNA - mitochondrial DNA; mitochondriální DNA

MUFA - mono unsaturated fatty acids; mononenasycená mastná kyselina

PCR - Polymerase Chain Reaction; polymerázová řetězová reakce

PH - breeding value; plemenná hodnota

Phe - phenylalanine; fenylalanin

PIT1, POU1F1 - pituitary transcription factor 1; transkripční faktor hypofýzy 1

PRL - prolactin; prolaktin

Pro - proline; prolin

QTL - Quantitative Trait Locus; lokus kvantitativních znaků

RADP - Random Amplified Polymorphic DNA; markery náhodně amplifikovaná polymorfní DNA

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism; polymorfizmus délky restrikčních fragmentů

SCD - stearoyl-CoA desaturase; stearoyl-CoA desaturáza

Ser - serine; serin

SFA - saturated fatty acid; nasycená mastná kyselina

SNP - Single Nucleotide Polymorphism; jednonukleotidový polymorfizmus

SSCP - Single-Strand Conformation Polymorphism; polymorfizmus konformace jednořetězové DNA

STAT5A - signal transducer and activator of transcription 5A; signální transduktor a aktivátor transkripce 5A

STAT5B - signal transducer and activator of transcription 5B; signální transduktor a aktivátor transkripce 5B

Thr - threonine; threonin

TRH - thyrotropin releasing hormone; tyreotropin uvolňující hormon

Tyr - tyrosine; tyrosin

Val - valine; valin