

eská zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a chovu



Variabilita genu *SOD1* a její vztah k degenerativní myelopatii u plemene bernský salašnický pes

Diplomová práce

Autor práce: Simona Mrázková

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2015 ZU v Praze

### **estné prehlásenie**

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu "Variabilita genu *SOD1* a její vztah k degenerativní myelopatii u plemene bernský salašnický pes" som vypracovala samostatne pod vedením vedúceho diplomovej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú citované v práci a uvedené v zoznamu literatúry na konci práce. Ako autorka uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že som v súvislosti s jej vytvorením neporušila autorské práva tretích osôb.

V Prahe dňa 10.4.2015

---

## **Poďakovanie**

Rada by som touto cestou poďakovala vedúcemu mojej diplomovej práce doc. Dr. Ing. Pavlovi Vejlovi a Ing. Daniele Šílovej za odborné vedenie, pomoc, ochotu, cenné pripomienky a rady pri spracovaní mojej diplomovej práce. Moje poďakovanie patrí aj vedeniu klubu –vaj iarskych sala–níckych psov na Slovensku a v ČR, ako aj majiteľom bernských sala–níckych psov za poskytnutie vzoriek a informácií o hodnotených psoch.

## Variabilita genu *SOD1* a její vztah k degenerativní myelopatii u plemene bernský sala-nický pes

### Súhrn

Teoretická čas tejto diplomovej práce podáva informácie o vlastnostiach bernského sala-nického psa, histórii a najastejšie sa vyskytujúcich dedičných ochoreniach tohto plemena. Hlavná čas literárneho prehľadu je zameraná na informácie o *SOD1* géne, jeho lokalizácii, štruktúre, funkcii a polymorfizmech u ktorých je predpokladaná asociácia s ochorením degeneratívna myelopatia. Tiež je popísané toto ochorenie z hľadiska klinických príznakov, diagnostiky, liečby a podobnosti s amyotrofickou laterálnou sklerózou u loveka.

ale sú uvedené popisy laboratórnych metód, ktoré boli použité pre výskumnú časť, ako je PCR, PCR-RFLP, separačná elektroforéza a Sangerova sekvenácia.

Druhá čas práce rozoberá postupný vývoj metodiky použitej pre vedecký experiment. Podrobne popisuje postup izolácie a následného spracovania DNA metódou PCR-RFLP a Sangerovou sekvenáciou. Uvádza výber primerov a vhodných restriktívnych enzýmov na detekciu kauzálnych mutácií *SOD1:c.118G>A* a *SOD1:c.52A>T* vedúcich k degeneratívnej myelopatii. Tiež sú tu uvedené informácie o procese sekvenácie okolia exónu 1 génu *SOD1* a navrhnutia nového metodického postupu detekcie mutácie *SOD1:c.52A>T* pomocou kapilárnej elektroforézy na základe zistenia prítomnosti inzertu.

Posledná čas tejto diplomovej práce zobrazuje získané výsledky a ich štatistické vyhodnotenie. Celkovo bolo do štúdie zahrnutých 303 bernských sala-nických psov, z čoho 42,57 % bolo heterozygotných a 5,94 % bolo homozygotných v mutácii *SOD1:c.118G>A*. Z rovnakej skupiny jedincov bolo 75 heterozygotov v mutácii *SOD1:c.52A>T* a 5 boli v tejto mutácii homozygotní. Jedinci boli rozdelení do kategórií podľa pohlavia, veku a pôvodu, následne boli jednotlivé kategórie medzi sebou porovnané. Pomocou  $\chi^2$  testu bolo zistené, že neexistujú na hladine významnosti  $L=0,05$  štatisticky významné rozdiely medzi frekvenciami výskytu jednotlivých genotypov a alel medzi jednotlivými skupinami. V tejto časti je tiež popísaná získaná sekvencia okolia exónu 1 *SOD1* génu, ktorá doposiaľ nebola uvedená v ľadnej dostupnej genomovej databáze.

Výsledky diplomovej práce poskytli informácie o polymorfizmoch génu *SOD1* asociovaných degeneratívnu myelopatiou a na základe následných populačných analýz i zhodnotenie výskytu jednotlivých mutovaných alel v populácii bernského sala-nického psa. Dáta môžu

by využité pri zostavovaní vhodných chovných párov, a tým dopomôc k zníženiu výskytu degeneratívnej myelopatie v chove.

**K ú ové slová:** pes domáci, *Canis lupus f. familiaris*, bernský salašnícky pes, degeneratívna myelopatia, *SOD1:c.118G>A*, *SOD1:c.52A>T*, sekvenácia

## **Variability of *SOD1* gene and its relation to degenerative myelopathy in breed Bernese Mountain Dog**

### **Summary**

The theoretical part of the diploma thesis reports characteristics, history and health status of the breed Bernese Mountain Dog. The main part of literature review focuses on information about localization, structure and function of *SOD1* gene and polymorphisms associated with degenerative myelopathy. This disease is described in terms of clinical signs, diagnose, treatment and similarities with amyotrophic lateral sclerosis. The following are descriptions of laboratory methods used in the research part of the thesis, such as PCR, PCR-RFLP, gel electrophoresis and Sanger's sequencing method.

Second part of this thesis analyzes the gradual development of the methodology used for scientific experiment. Procedure of isolation and afterwards treatment of DNA by PCR-RFLP and Sanger's sequencing method is described in details. Given is the process of designing primers and restriction enzymes for detection of causal mutation *SOD1*:c.118G>A and *SOD1*:c.52A>T leading to degenerative myelopathy. The research section also contains information about sequencing an area of exon 1 *SOD1* gene. The new method to detect mutation *SOD1*:c.52A>T according to location of insert by using capillary electrophoresis was suggested.

Last part deals with gained results and statistic evaluation. Samples of DNA were collected and tested from 303 Bernese Mountain Dogs. Tests for mutation *SOD1*:c.118G>A shows, that 42,57 % of these dogs were heterozygous and 5,94 % dogs were recessive homozygous. 75 dogs tested for mutation *SOD1*:c.52A>T were heterozygous and 5 dogs were recessive homozygous in this mutation. Individuals were divided into several groups (gender, origin, age), which were than compared with each other. The statistical survey ( $\chi^2$  test,  $p=0,05$ ) involving comparing the frequency of genotypes and alleles in established groups didn't show any statistically important differences. In this part, there are also described results of sequencing area surrounding exon 1 of *SOD1* gene, which wasn't published in any international genome database yet.

This thesis presents information about *SOD1* polymorphism associated with degenerative myelopathy and the evaluation of recessive alleles incidence in population of Bernese

Mountain Dog. Presented data can be used for forming of breeding couples and thus decreasing the frequency of degenerative myelopathy.

**Keywords:** dog, *Canis lupus f. familiaris*, Bernese Mountine Dog, degenerative myelopathy, *SOD1:c.118G>A*, *SOD1:c.52A>T*, sequencing

# Obsah

1 Úvod.....	11
2 Ciele práce.....	12
2.1 Vedecké hypotézy .....	12
2.2 Ciele práce .....	13
3 Literárna re-er-e .....	14
3.1 Bernský sala-nický pes.....	14
3.1.1 História plemena .....	14
3.1.2 Charakteristika plemena .....	15
3.1.3 Zdravotný stav plemena .....	16
3.2 Genomové databázy .....	18
4 Superoxid dismutázy.....	19
4.1 Superoxid dismutáza 1 .....	19
4.1.1 Gén pre superoxid dismutázu 1 .....	20
4.1.2 Umiestnenie na chromozóme a exon- intronová -truktúra.....	21
4.1.3 <sup>TM</sup> truktúra génu.....	22
4.1.4 Polymorfizmus.....	23
4.2 Degeneratívna myelopatia .....	24
4.2.1 Klinické príznaky degeneratívnej myelopatie.....	24
4.2.2 Diagnostika degeneratívnej myelopatie .....	25
4.2.3 Lie ba degeneratívnej myelopatie .....	26
4.2.4 Genetické testovanie degeneratívnej myelopatie.....	26
4.2.5 Amyotrofická laterálna skleróza.....	27
4.3 PCR - Polymerase chain reaction.....	28
4.3.1 Princíp metódy PCR.....	28
4.3.2 PCR - RFLP (Restriction fragment lenth polymorfism) .....	31
4.4 Separa ná elektroforéza.....	32
4.5 Sekvenovanie .....	32
4.5.1 Sangerova sekvenovacia metóda .....	32
5 Materiál a metódy .....	34
5.1 Odber a izolácia DNA .....	34
5.1.1 Odber DNA.....	34
5.1.2 Izolácia DNA .....	34
5.1.3 Kvantita a kvalita izolovanej DNA.....	35
5.2 PCR - RFLP marker kauzálnej mutácie génu <i>SOD1</i> vedúci k degeneratívnej myelopatii u bernského sala-nického psa .....	35
5.2.1 Vo ba restrikt ného enzýmu schopného rozlí-i alely génu <i>SOD1</i> .....	35
5.2.2 Poufítie PCR - RFLP markera kauzálnej mutácie génu <i>SOD1</i> .....	36



5.3	Sekvenácia oblasti <i>SOD1</i> génu s výskytom markerov kauzálnej mutácie génu <i>SOD1</i>	42
5.3.1	Amplifikácia fragmentu génu <i>SOD1</i> určeného k sekvenácii.....	42
5.3.2	Gélová purifikácia PCR produktu markera génu <i>SOD1</i> .....	43
5.3.3	Príprava sekvenacej reakcie.....	44
5.3.4	Purifikácia produktu sekvenacej reakcie .....	45
5.3.5	Rozpoznávanie sekvencií pomocou kapilárnej elektroforézy .....	46
5.4	Navrhnutie molekulárnych markerov pre detekciu vybraného polymorfizmu génu <i>SOD1</i>	46
5.4.1	Inzerovaný polymorfizmus v intróne 1 génu <i>SOD1</i> .....	46
5.4.2	Detekcia sekvencií pomocou kapilárnej elektroforézy .....	46
5.4.3	Navrhnutie primerov pre amplifikáciu oblasti inzeru určenú na detekciu polymorfizmov pomocou kapilárnej elektroforézy.....	47
5.5	Sekvenácia okolia oblasti exónu 1 <i>SOD1</i> génu .....	48
5.6	Bioinformatické a štatistické spracovanie dát .....	53
5.6.1	Bioinformatické spracovanie dát .....	53
5.6.2	Vyhodnotenie frekvencií nemutovaných a mutovaných alel génu <i>SOD1</i> z pohľadu populačnej genetiky.....	53
5.6.3	Simulácia dopadu úplnej selekcie proti homozygotným jedincom nesúcim mutované alely génu <i>SOD1</i> .....	54
5.6.4	Porovnanie genotypových a alelických frekvencií kauzálnych mutácií génu <i>SOD1</i>	54
6	Výsledky .....	55
6.1	Hodnotenie kvality a kvantity izolovanej DNA.....	55
6.2	Molekulárna analýza mutácie 118. nukleotidovej bázy génu <i>SOD1</i> .....	55
6.2.1	Špecifickosť navrhnutého PCR-RFLP markera.....	55
6.3	Molekulárna analýza mutácie 52. nukleotidovej bázy <i>SOD1</i> génu. ....	56
6.3.1	Špecifickosť navrhnutého PCR-RFLP markera.....	56
6.4	Výskyt mutovaných alel <i>SOD1</i> génu v populácii testovaných jedincov.....	58
6.5	Sekvenčná analýza exónu 1 a exónu 2 génu <i>SOD1</i> .....	68
6.5.1	Porovnanie sekvencií exónu 2 u vybraných zástupcov bernského salašníckeho psa	68
6.5.2	Porovnanie aminokyselínovej sekvencie proteínu kódovaného exónom 2 <i>SOD1</i> génu u psa .....	69
6.6	Sekvenácia okolia exónu 1 <i>SOD1</i> génu .....	70
6.6.1	Porovnanie aminokyselínovej sekvencie proteínu kódovaného exónom 1 <i>SOD1</i> génu u psa .....	76
6.7	Dielkový polymorfizmus navrhnutého markeru inzeru v intróne 1 génu <i>SOD1</i> stanovený kapilárnou elektroforézou.....	76
6.8	Frekvencie výskytu mutovaných alel génu <i>SOD1</i> v testovanej populácii psov a ich hodnotenie na základe populačnej genetiky.....	78
6.8.1	Mutácia 118. nukleotidovej bázy <i>SOD1</i> génu.....	78
6.8.2	Mutácia 52. nukleotidovej bázy <i>SOD1</i> génu .....	79

6.8.3	Štatistické vyhodnotenie rozdielov medzi vytvorenými skupinami .....	80
6.8.4	Frekvencie výskytu mutovaných alel génu <i>SOD1</i> v testovanej populácii psov pri vedení úplnej selekcie proti mutovanej alele .....	82
7	Diskusia.....	84
7.1	Voľba modelového plemena.....	84
7.2	Izolácia DNA a hodnotenie jej kvality a kvantity.....	84
7.3	Detekcia kauzálnych mutácií <i>SOD1</i> génu u plemena bernský salašnícky pes ..	85
7.3.1	Metóda PCR - RFLP .....	85
7.3.2	Metóda Sangerovej sekvenácie.....	87
7.4	Detekcia dĺžkového polymorfizmu v oblasti intrónu 1 <i>SOD1</i> génu .....	88
7.5	Sekvenácia okolia exónu 1 génu <i>SOD1</i> .....	89
7.6	Analýza kauzálnych mutácií génu <i>SOD1</i> asociovaných s degeneratívnou myelopatiou z hľadiska populačnej genetiky .....	91
7.6.1	Variabilita a frekvencia alel génu <i>SOD1</i> u plemien skupiny –vaj iarskych salašníckych psov.....	91
7.6.2	Hodnotenie frekvencie výskytu mutovaných alel génu <i>SOD1</i> v testovanej populácii psov pri vedení úplnej selekcie proti mutovanej alele .....	93
8	Záver .....	94
9	Zoznam citovanej literatúry .....	96
10	Zoznam použitých skratiek .....	106
11	Prílohy.....	108
11.1	Príloha 1: Pufry a roztoky použité pri elektroforetickej separácii DNA markera sú upravené podľa Sambrook et al., (1989).....	109
11.2	Príloha 2: Obrazová dokumentácia plemena bernský salašnícky pes .....	110

# 1 Úvod

Plemeno bernský sala-nický pes bolo oficiálne uznané na začiatku 20. storočia a v súčasnosti sa radí do 2. FCI skupiny, medzi ťvaja iarske sala-nické psy.

Pôvodne tieto psy stráfilili farmy a majetok a vďaka svojej mohutnej kostre a miernemu temperamentu sa využívali na ťahanie vozíkov. V súčasnosti je bernský sala-nický pes prevažne domácim miláčikom, ale stretneme sa s ním i pri záchrannárskych prácach i v ťportovej kynológii.

Podobne ako u iných plemien, i v chove bernského sala-nického psa je možné pozorovať výskyt geneticky podmienených ochorení. Jedným z týchto ochorení je degeneratívna myelopatia.

Degeneratívna myelopatia je progresívne neurodegeneratívne ochorenie postihujúce miechu. Dochádza k demyelizácii a strate axónov najmä v oblasti hrudnej miechy, čo spôsobí narušenie nervových dráh ovládajúcich predné i zadné končatiny, dýchacie svaly a orgány dutiny brušnej. Pôvodne sa predpokladalo, že toto ochorenie je typické pre nemeckého ovčáka, no násom bolo diagnostikované u širokej škály plemien, vrátane bernského sala-nického psa.

Presný spôsob účinný mechanizmus degeneratívnej myelopatie nie je známy, ale štúdie uskutočnené u viac ako 100 plemien psov poukázali na priamu súvislosť výskytu ochorenia s mutáciou *SOD1* génu. Je známa mutácia 118. bázy génu *SOD1*, kde dochádza k zámene dusíkatej bázy guanínu za adenín, čo spôsobí tvorbu aminokyseliny lysínu miesto kyseliny glutámovej. U bernského sala-nického psa bola identifikovaná bodová mutácia 52. nukleotidovej bázy tohto génu spôsobujúca zámenu adenínu za tymín a tým tvorbu aminokyseliny threonínu miesto serínu.

V tejto diplomovej práci vyhodnocujem mutácie vyskytujúce sa v *SOD1* géne u vybranej skupiny ťvaja iarských sala-nických psov, prevažne u bernského sala-nického psa. Súčasťou práce je tiež podrobný popis metódy experimentu od odobrania vzoriek buniek z bukálnych slizníc psa, analýzu DNA a následne detekciu *SOD1* génu metódou PCR-RFLP a sekvenčnou analýzou. Snahou tejto práce je poukázať na genetické podmienenie degeneratívnej myelopatie, a tým pomôcť chovateľom bernských sala-nických psov znížiť výskyt tohto ochorenia v chove v Českej republike a na Slovensku.

## 2 Ciele práce

### 2.1 Vedecké hypotézy

Na základe riešenia diplomovej práce boli stanovené vedecké hypotézy, ktoré vychádzajú z aktuálneho stavu poznania o kandidátnom géne *SOD1*, ktorého mutácie môžu byť príčinou ochorenia degeneratívna myelopatia. Vedecké hypotézy je možné zhrnúť do nasledujúcich bodov:

- Bernský salašnícky pes je vhodným plemenom pre štúdium kauzálnej mutácie *SOD1* génu.
- Faktorom pre prejav degeneratívnej myelopatie je bodová mutácia v *SOD1* géne. U väčšiny psích plemien ide o mutáciu *SOD1:c.118G>A* v exóne 2.
- Na základe publikovaných výsledkov je pre plemeno bernský salašnícky pes charakteristická bodová mutácia *SOD1:c.52A>T* vyskytujúca sa v 1. exóne génu.
- Tieto bodové mutácie vedú k zmene aminokyselinového zloženia polypeptidového reťazca, čo vyústí do vzniku alebo zániku miesta restrikčného enzýmu.
- Exón 1 *SOD1* génu je lokalizovaný v zatiaľ neznámom úseku (N) sekvencie (Ensembl) pred exónom 2 a je charakterizovaný vysokým podielom GC párov báz. Je možné predpokladať, že existujú termostabilné DNA polymerázy, ktoré umožnia amplifikáciu týchto oblastí.

## 2.2 Ciele práce

Konkrétne ciele diplomovej práce sú zamerané na potvrdenie alebo vyvrátenie vedeckých hypotéz uvedených v predchádzajúcej kapitole. Tieto ciele je možné charakterizovať nasledujúcimi bodmi:

- Vypracovanie literárneho prehľadu o degeneratívnej myelopatii u psa a jej genetickom podmienení.
- Získanie vzoriek DNA od bernských salašníckych psov v spolupráci s klubom –vaj iarskych salašníckych psov v SR a slovenským klubom –vaj iarskych salašníckych psov.
- Overenie výskytu mutácie *SOD1*:c.118G>A u získaných vzoriek.
- Navrhnutie metodického postupu detekcie mutácie *SOD1*:c.52A>T.
- Sekvenácia zatiaľ neznámych oblastí *SOD1* génu.
- Populačná genetická analýza oboch mutácií u bernského salašnického psa.
- Oznámenie výsledkov práce majiteľom testovaných zvierat a pomoc chovateľom pri výbere vhodných chovných párov, a tým minimalizácia šírenia degeneratívnej myelopatie v populácii bernského salašnického psa v SR a na Slovensku.

## 3 Literárna re-er-e

### 3.1 Bernský sala-nický pes

#### 3.1.1 História plemena

Bernský sala-nický pes patrí medzi veľmi staré plemená. Kostené nálezy psích lebiek silne pripomínajúcich bernského sala-nického psa nájdené v Nemecku a v oblasti Bernu v Švajčiarsku sú datované do obdobia 800 - 400 p.n.l. (Clark, 2014). Predpokladá sa, že bernský sala-nický pes sa vyvinul z rímskeho molosa (Riggsbee, 2007).

Za priameho predchodcu bernského sala-nického psa sa považuje Durbachlerský pes, ktorý sa vyskytoval v oblasti dnešného Švajčiarska už na konci 19. storočia. Tieto psy stráždili farmy a majetok, no zároveň boli vernými spoločníkmi loveka. Vďaka svojej mohutnej kostre a miernemu temperamentu sa využívali i na ťahanie vozíkov (Hample et al., 2007).

Plemeno durbachlerský pes bolo oficiálne uznané v roku 1904 švajčiarskou kynologickou spoločnosťou a štyri psy zodpovedajúceho vzťahu boli zapísané do švajčiarskej plemennej knihy. Na vývoji plemena sa veľmi mierou podieľal prof. Albert Heim. Vďaka jeho úsiliu sa durbachlerský pes stal populárnym a uznávaným plemenom. Pomohol tiež založiť Durbach klub a napísať prvý oficiálny štandard plemena (Riggsbee, 2007). Prvý štandard vydaný 15.11.1907 bol výrazne odlišný od toho súčasného a povel oval väzby rozptálie farieb a ve kosti (Bartschi, 2006).

Výstavy psov usporiadanej v roku 1910 sa zúčastnilo 107 psov, z čoho približne 3/4 zodpovedali stanovenému štandardu durbachlerského psa (Hample et al., 2007). Plemeno bolo oficiálne premenované na bernského sala-nického psa v roku 1912 a následne zaradené medzi ostatné švajčiarske sala-nické psy. Názov bol odvodený od regiónu Bernese Mittelland v blízkosti Bernu, odkiaľ pochádzala väzba týchto psov (Smith, 1995).

V roku 1948 bola fena bernského sala-nického psa krížená so psom plemena novofundland. Pretože tá z tohto spojenia mala široký, hlboký hrudník, no i dlhú špičku. Toto kríženie bolo označené za nešťastnú náhodu, ale tieto psy boli i tak využívané v chove. V tretej generácii sa opäť vyskytvalo požadované sfarbenie. V súčasnej dobe je možné pôvod takmer každého bernského sala-nického psa odvodiť až k tomuto chovnému páru (Riggsbee, 2007).

V sú asnosti sa úloha bernského sala-nického psa zmenila. Je to prevažne domáci miláčik, no súčasťou je i jeho využitie pri záchranných prácach i v športovej kynológii.

V švajčiarskej republike zastrešuje chov bernského sala-nického psa Klub švajčiarskych sala-nických psů a na Slovensku sa o chov stará Slovenský klub švajčiarskych sala-nických psů.

### **3.1.2 Charakteristika plemena**

Bernský sala-nický pes je spolu s veľkým švajčiarskym sala-nickým psom, appenzelským sala-nickým psom a entlebuchským sala-nickým psom zaradený medzi švajčiarske sala-nické psy. Oficiálne bolo toto plemeno uznané 26.7.1954 a zaradené do 2. skupiny - pinč, bradáč, molosoidné plemená a švajčiarske sala-nické psy, sekcia 3 - švajčiarske sala-nické psy.

Podľa najnovšej verzie platného štandardu plemena vydaného 5.5.2003 je bernský sala-nický pes charakterizovaný ako dlhosrstý, trojfarebný, viac než stredne veľký, silný a pohyblivý úžitkový pes s mohutnými konatinami, harmonický a vyvážený.

Bernský sala-nický pes dosahuje v kohútiku výšku 64 - 70 cm, u feny 58 - 66 cm. Ideálna váha nie je stanovená a dôraz je kladený najmä na celkový dojem.

Je to harmonický pes so širokým a hlbokým hrudníkom, silnou, no nie ťažkopádnu hlavou a dlhým, voľne zveseným chvostom. Krk je silný, svalnatý a stredne dlhý. Hrudníkové konatiny i panvové konatiny sú rovné, postavené skôr široko. Oči sú tmavohnedé, mandovitého tvaru. Srs je dlhá, lesklá, hladká alebo mierne vlnitá.

Najväčší dôraz je kladený na sfarbenie. Typické sfarbenie bernského sala-nického psa má čierny základ so sýtym hnedo červeným pálením na lícach, nad očami, na všetkých štyroch konatinách a na hrudníku. Biela farba sa vyskytuje na krku a prechádza celým hrudníkom. Na hlave sa nachádza symetrická biela kresba, ktorá sa na nose rozširuje na papuľu. Charakteristické sú i na bielo sfarbené labky a špička chvosta.

Bernský sala-nický pes má vo všetkých typoch pohybu priestornú, rovnomernú chôdzu.

Už využitie v minulosti napovedá, že bernský sala-nický pes šiel po boku svojich majiteľov, sprevádzal svoju rodinu a vytrvale plnil svoje pracovné úlohy. Toto sa výrazne odzrkadlilo na jeho súasnej povahe. Je to spoločenský pes, ktorý bezhranične miluje svoju rodinu. Je veľmi

inteligentný, vnímavý a ušľachlivý. Je to kontaktný a priateľský pes, no zároveň sa u neho prejavuje obranný inštinkt (Harper, 2004). Preto je dôsleditý dôsledný, no láskyplný výcvik. V prípade, keď bernský salašnícky pes vyrastá v nevhodnom prostredí, môže sa z neho stať neistý, ušľachlivý a agresívny pes. Toto plemeno nevyžaduje ťažkú aktivitu, no dlhšie pravidelné prechádzky sú nutnosťou.

### 3.1.3 Zdravotný stav plemena

Priemerný vek flivota u bernského salašnického psa je 8 rokov. Pes rastie a vyvíja sa približne do druhého roku flivota. V tomto období je dôležitý klás dôraz na správnu výživu a dostatok pohybu. Prekrmovanie psa často vedie k nadváhe, čo môže spôsobiť zápalové ochorenia kostí alebo rastové bolesti. Nedostatok krmiva, a jeho nízky obsah flivín môže viesť k poruchám vývoja a kosteným deformáciám.

U bernského salašnického psa sa vyskytujú zdravotné problémy typické pre všetky veľké plemená, ako je napr. torza (otvorenie) žalúdka a choroby pohybového aparátu. Štatistiky hovoria, že približne 3 % psov majú aspoň jedenkrát za flivot torzu žalúdka, u približne 42 % z toho je potrebná operácia a približne 11 % postihnutých psov umiera (Clark, 2014).

Medzi najčastejšie poruchy pohybového aparátu patrí dysplázia bedrového a lakťového kĺbu. Pri dysplázii bedrového kĺbu dochádza k chorobnej zmene kostí, z ktorých pozostáva bedrový kĺb. Kĺbové plochy sú v dôsledku zápalových procesov pozmenené (napr. sploštené), potom nezapadajú tesne do seba a kĺb nie je stabilný. Táto deformácia spravidla vedie k bolestivému obmedzeniu pohyblivosti kĺbu. Počas flivota psa takmer vždy dochádza aj ku vzniku artrózy. Dysplázia bedrových kĺbov sa nedá vyliečiť. Podľa vážnosti stavu sa terapia pohybuje od medikamentózneho liečenia až k operatívnym postupom (okrem iných aj nasadeniu umelého kĺbu) (Ginter et al., et al., 2001). V snahe o zníženie výskytu je možné do chovu zaradiť iba jedincov ktorí boli po vyhodnotení röntgenových snímok ohodnotení stupňom A, B alebo C (D a E sa nepripúta). Dysplázia lakťového kĺbu popisuje komplex ochorení (osteochondróza) lakťového kĺbu. Dochádza k zmenám štruktúry chrupavky a kostenj hmoty kĺbov v dôsledku vývinových porúch a z toho vyplývajúceho nadmerného preťaženia niektorých častí. V mnohých prípadoch dochádza k oddeleniu kúskov chrupiek a kostí, ktoré sa potom vo ne vznesajú v kĺbovom mazaní. Výsledkom je vznik pravidelného a bolestivého podráždenia, ktoré spôsobuje krívanie psa. Často je nutné chirurgicky odstrániť uvoľnené kúsky kosti (Ginter et al., 2001).



Keďže toto ochorenie má geneticky podmienený základ, v oficiálnom chove je možné vybrať iba psy s hodnotením 0 a 1.

Von Willenbrandova choroba je súčasťou z rady ochorení postihujúcich toto plemeno. Ide o zníženie Von Willenbrandova faktoru v krvi. Tento glykoprotein je v kombinácii so zráfacím faktorom VIII zodpovedný za prietok krvných doštičiek. Prejavom je neustávajúce krvácanie po zranení alebo operácii. Je známy autosomálne recesívny genetický základ tohto ochorenia (Clark, 2014).

Tak ako i u iných plemien, i u bernského salašníckeho psa je možné sa stretnúť s ochoreniami oka - entropiom a entropiom. Ide o vyhnutie spodného okraja do vnútra alebo von z oka. Dochádza k dráždeniu oka a prieniku choroboplodných zárodkov, čo spôsobuje zápal spojivky a rohovky (Crispin, 2009).

Skúsenosti preukázali u tohto plemena vysokú predispozíciu na ochorenie obličiek. Vysoký podiel medzi chorobami obličiek má glomerulonefritída, pri ktorej dochádza k stratám bielkovín a v konečnom dôsledku k chronickému zlyhávaniu obličiek (Ginter et al., 2001). Tiež sa vyskytuje Familiárna nefropatia a renálna dysplázia. Renálna dysplázia spôsobuje abnormálny vývoj obličkového tkaniva, ktorý vyúsťuje do chronického zlyhania obličiek.

V posledných rokoch sa okrem toho stretávame i s výskytom rôznych typov rakoviny (Case., 2013). Najčastejšie sa u bernského salašníckeho psa vyskytuje rakovina imunitného systému - histiocytóza (Ackerman, 2001) a miazgovej sústavy - lymfom (Ginter et al., 2001), no výnimkou nie je ani rakovina jednotlivých vnútorných orgánov, kože i kostí.

U bernského salašníckeho psa sa tiež uvádza predispozícia na dilatáciu kardiomyelopatiu (Clark, 2014).

Medzi chovateľmi tohto plemena sa do popredia dostáva problematika degeneratívnej myelopatie, ktorá bude v tejto práci podrobne rozobraná.

## 3.2 Genomové databázy

Najvyužívanejšími databázami v genetike sú databázy genových sekvencií a proteínové databázy. Databázy genomových sekvencií je možné rozdeliť na dva základné typy - primárne databázy obsahujúce výsledky experimentov bez pridaných informácií a sekundárne databázy spájajúce poznatky z primárnych databáz s ostatnými údajmi ako sú napr. informácie o nukleotidových sekvenciách príbuzných druhov zvierat, a rôzne génové varianty (Baker and Brass, 1998). Zahŕňajú tiež informácie týkajúce sa štruktúry génov, lokalizácie na chromozónoch, klonovania, cytogenetiky, zvieracích modelov a súvisiacej bibliografie (Biancoa et al., 2013). Mnohé genomové databázy poskytujú obsiahle informácie o genetických ochoreniach a génoch, ktoré ich podmieňujú (Baker and Brass, 1998), čím pomáhajú identifikovať vzťahy medzi špecifickými biologickými problémami. V súčasnosti je online dostupných niekoľko tisíc genomových databáz umožňujúcich získanie dát zo sekvenácie a interaktívne analýzy za pomoci využitia softvérových nástrojov, ako je napr. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Maloy and Hughes, 2013).

Jedna z najrozsiahlejších genomových databáz bola vytvorená Národným centrom pre biotechnologické informácie (NCBI) v roku 1988. Ide o komplexný systém získavajúci dáta od externých vedcov, medzinárodných vedeckých konzorcií a na základe vlastného výskumu. Súčasťou NCBI je OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), katalóg ľudských génov a genetických ochorení, obsahujúci informácie o adom dát, fenotypov a referencií na vetky známe dedičné choroby človeka. Databáza OMIM poskytuje poznatky približne o 4613 ochoreniach, 367 génoch s asociáciou k fenotypu a o 1317 génoch (vrátane 183 microRNA) so známou sekvenciou (Biancoa et al., 2013).

Významnou genomovou databázou je Ensembl (EMBL - European Molecular Biology Laboratory), ktorá bola založená na podnet Európskeho bioinformatického inštitútu (EBI) a Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) v roku 1999. Princípom Ensembl je tzv. otvorená filozofia. Všetky dáta a programy sú dostupné v plnej forme bezplatne pre akademických aj komerčných vedcov. Hlavnou úlohou tejto webovej databázy je poskytnúť dáta genomových sekvencií jednotlivých organizmov (Birney et al., 2006). Neustále dochádza k aktualizácii informácií o genome človeka, myši, daniel, rastlín, bezstavovcov, baktérií a ostatných eukaryotických a prokaryotických organizmov (Kersey et al., 2010).

## 4 Superoxid dismutázy

ROS sú atómy alebo molekuly s obsahom vo ného elektrónu, ktoré vznikajú ako štandardný vedajší produkt bune ného metabolizmu (Halliwell and Gutteridge, 1990). Po spojení vo tých kyslíkových radikálov s inými molekulami vznikajú peroxylové ( $\text{ROO}^\cdot$ ) a hydroxylové ( $\text{HO}^\cdot$ ) radikály a môžu by prí inou fragmentácie DNA (Wiseman and Halliwell 1996) i lipidových štruktúr, spôsobí oxidatívne zmeny proteínov vyús ujúce do chemickej fragmentácie alebo zníženie odolnosti vo i proteázam (Davies, 1987). Koncentrácia ROS v bunke je udržiavaná pomocou antioxidantných enzýmov, medzi ktoré patrí i SOD, glutathion peroxid a kataláza (Afonso et al., 2007).

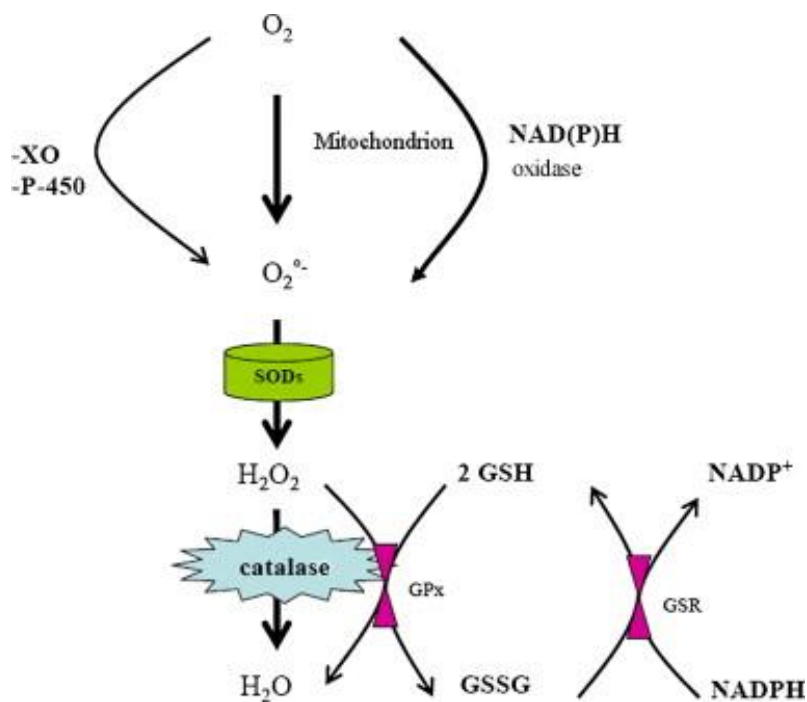
V bunke sú známe tri základné izoformy superoxidu dismutázy:

1. Superoxid dismutáza s prítomnosťou horíka v molekule (MnSOD), vyskytujúca sa najmä v mitochondriách bunky (Gottipati et al., 2008), hrá kľúčovú úlohu pri regulácii vo tých kyslíkových radikálov vznikajúcich pri dýchaní bunky (Sarsour, 2006).
2. Superoxid dismutáza s prítomnosťou medi alebo zinku v molekule (Cu/ZnSOD). Cu/ZnSOD sa vyskytuje v cytoplazme a v jadre. Jej hlavnou úlohou je premena ROS na hydrogén peroxid a molekulárny kyslík (Zhang et al., 2002).
3. Extracelulárna superoxid dismutáza (ecSOD). ECSOD je jediný mimobunecný enzým so schopnosťou odbúravať kyslíkové radikály (Sheng et al., 2014).

### 4.1 Superoxid dismutáza 1

Enzýmy patriace medzi SOD boli po prvýkrát izolované z bunky v roku 1938 Mannom a Keilinom. Ich funkcia v organizme bola však popísaná až o 31 rokov neskôr McCordom a Fridovichom (1969). Superoxid dismutáza 1 je homodimér s obsahom medi a zinku vo svojej molekule (Zelko et al., 2002). Molekulárna hmotnosť *SOD1* dosahuje 32 000 Da a nachádza sa takmer výhradne v intracelulárnom cytoplazmatickom priestore - v cytoplazme, v okolí jadra a v lyzozómoch cicavích buniek (Crapo et al., 1992).

Funkciou *SOD1* je katalýza premeny vo tých kyslíkových radikálov na molekuly kyslíka a peroxid vodíka ( $\text{O}^{2\cdot} + \text{O}^{2\cdot} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ). Peroxid vodíka je následne eliminovaný pôsobením glutathion peroxidu a katalázy (Afonso et al., 2007). Proces odbúravania ROS je zobrazený na obrázku.

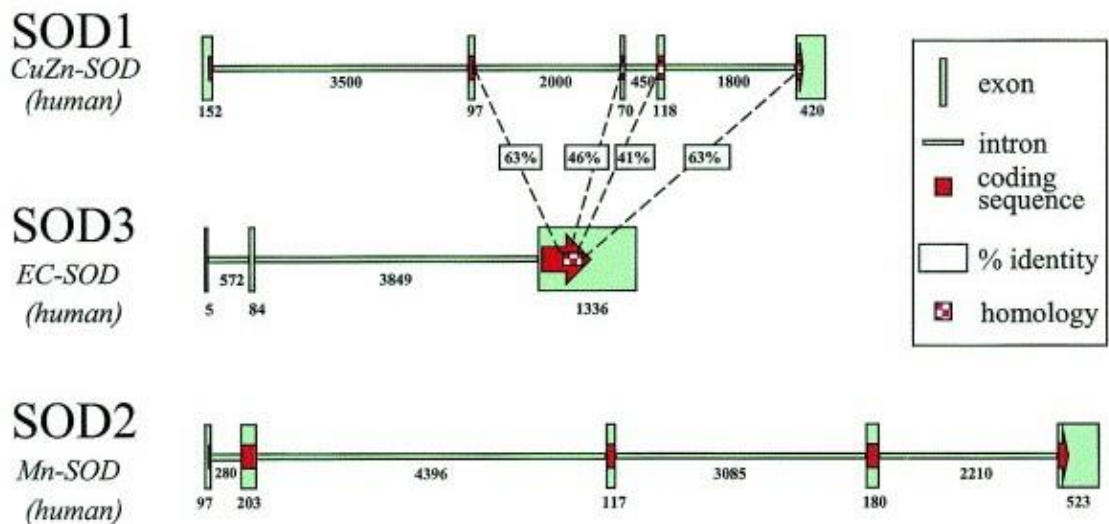


Obr. 1: Spôsob tvorby a odbúrania ROS (GSH - glutathione; GSSG - oxidized glutathione; GSR - glutathione reductase; XO - xanthine oxidase) (Afonso et al., 2007)

Nesprávna funkcia *SOD1* je považovaná za jeden z faktorov prispievajúcich ku skorej apoptóze neurónov. Toto sa prejavuje vznikom neurodegeneratívnych ochorení, ako je napr. amyotrofická laterálna skleróza (Greenlund et al., 1995).

#### 4.1.1 Gén pre superoxid dismutázu 1

Vzhľadom na podobný evolučný vývoj génov pre enzýmy *SOD1*, *SOD2* a *SOD3*, je možné medzi nimi pozorovať výraznú podobnosť (obr. 2).

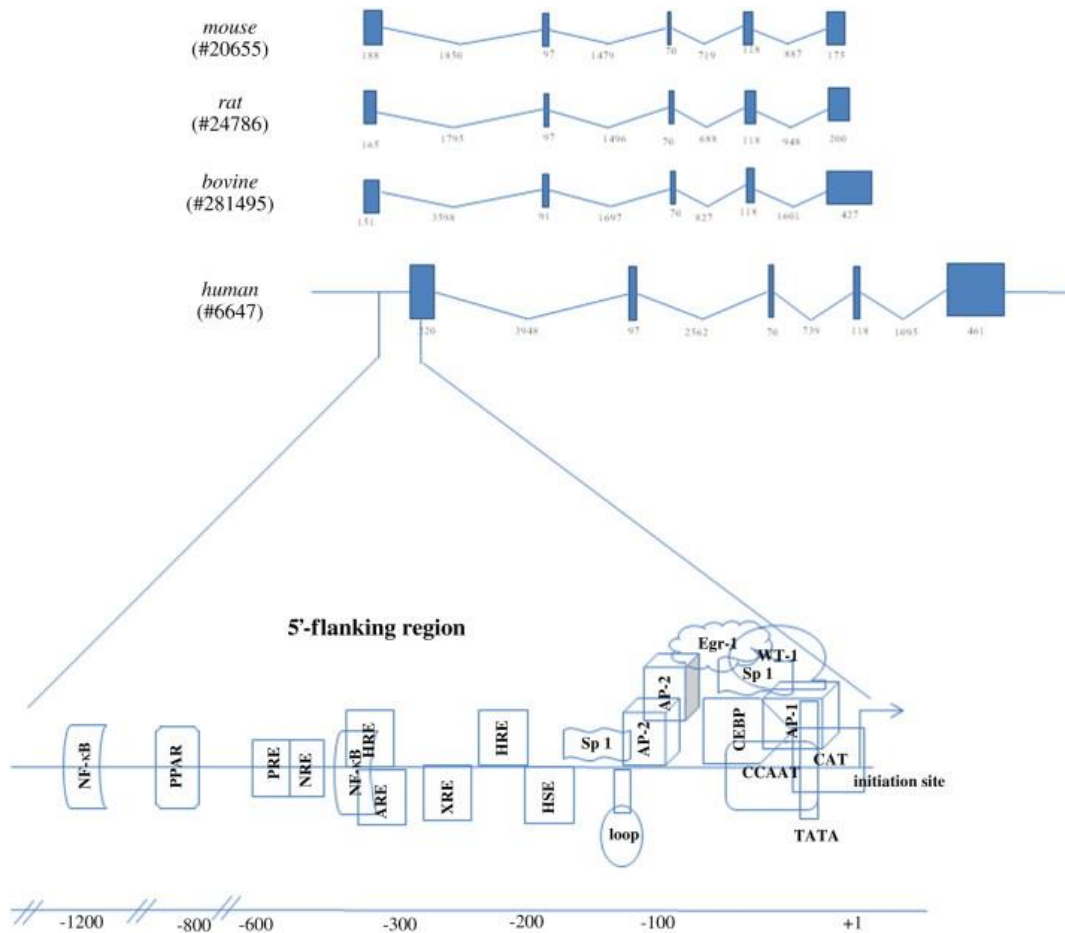


Obr. 2: Podobnosť –truktúry génov rodiny superoxid dismutáz (Zelko et al., 2002)

#### 4.1.2 Umiestnenie na chromozóme a exon- intronová –truktúra

Umiestnenie a –truktúra génu závisí od konkrétneho živočíšneho druhu. U hovädzieho dobytku bol *SOD1* gén lokalizovaný na 1. chromozóme (Schmutz et al., 1996), u myši na 16. chromozóme (Hsu, 1992) a u loveka na 21 chromozóme (Levanon et al., 1985). U psa je tento gén umiestnený na 31. chromozóme.

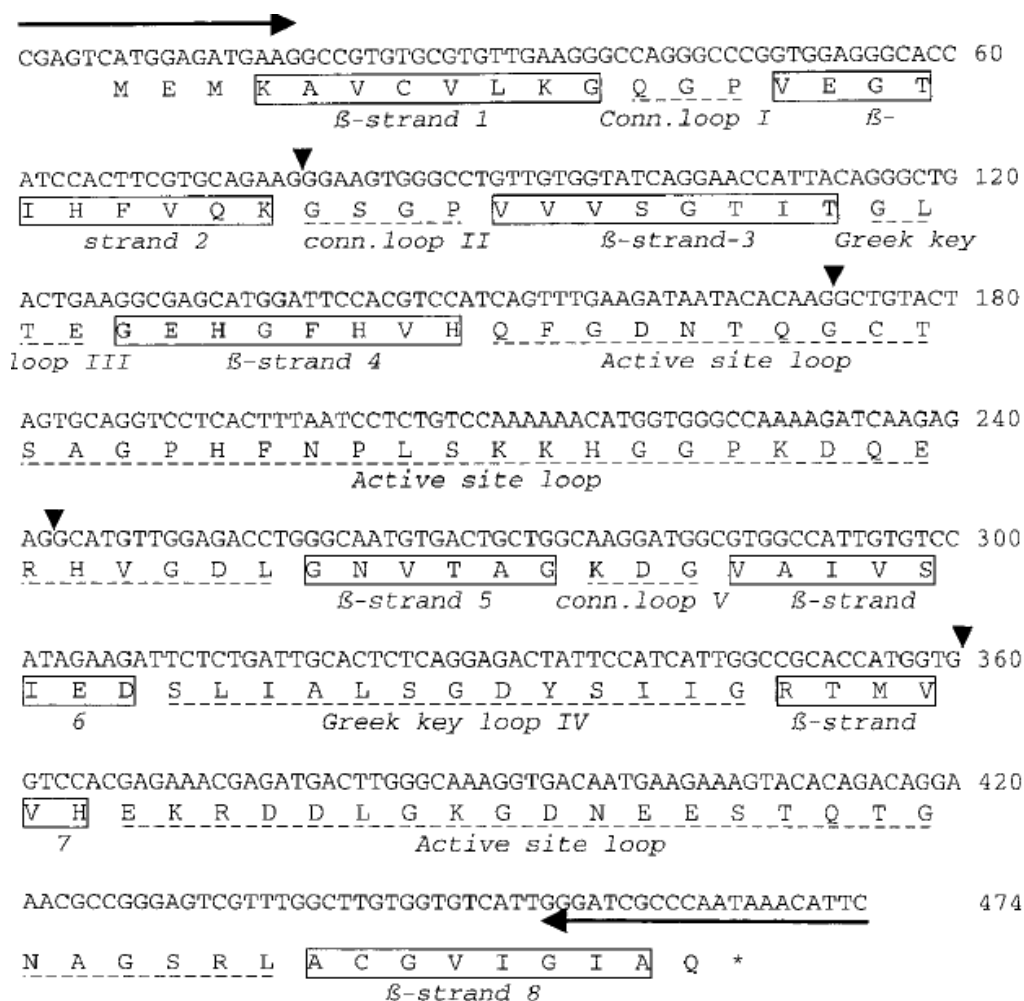
*SOD1* gén sa skladá z 5 exónov a 4 intrónov. V oblasti proximálneho promotora sa nachádza vysoko konzervatívna G-C oblasť, TATA box a CCAAT box (Zelko et al., 2002). V tejto oblasti génu bolo identifikovaných niekoľko korelačných oblastí pre transkripčné faktory (obr. 3) (Miao and Clair, 2009). Vysoká homológia 5' blízkych úsekov naznačuje, že intenzívne evolučné faktory zachovali kľúčové regulačné oblasti génu. Oblasť 3' konca obsahuje niekoľko poly(A) signálov sekvencií, čo spôsobuje ukončenie vytvárania mRNA v rôznej dĺžke (Zelko et al., 2002). Oblasti exónov jednotlivých živočíšnych druhov a loveka zdieľajú výraznú podobnosť, zato vo veľkosti intrónov je možné pozorovať odlišnosti. Tieto odlišnosti sú pravdepodobne spôsobené génovým polymorfizmom v rozdielnych tkanivách a bunkách (Miao and Clair, 2009).



Obr. 3: Podobnosť v štruktúrnom usporiadaní *SOD1* génu u myši, potkana, býka a človeka. Zobrazenie väzbových oblastí pre transkripčné faktory v úseku promotora *SOD1* génu (Mio et al., 2009)

#### 4.1.3 Štruktúra génu

Kódujúca oblasť *SOD1* génu je tvorená 462 nukleotidmi, ktoré kódujú 153 aminokyselín. Poradie nukleotidov je zobrazené na obrázku 4. Podobnosť nukleotidovej sekvencie *SOD1* génu psa s hovädzím dobytkom dosahuje asi 93 % a s človekom približne 83 %. (Green et al., 2002). Z tohto dôvodu je pes ideálne modelové zvieratko na výskum ochorení s predpokladaným vplyvom *SOD1* génu u človeka.



Obr. 4: Sekvencia nukleotidov kódujúcich oblastí génu *SOD1* (prepis z cDNA). Trojuholník označuje miesto intrón - exónovej bariéry, hviezdička znamená terminálny kodón (Green et al., 2002)

#### 4.1.4 Polymorfizmus

Polymorfizmus génu *SOD1* je v súčasnosti predmetom intenzívneho štúdia. Už bolo objavených 150 mutácií vyskytujúcich sa najmä v oblastiach exónov spôsobujúcich až 70 rôznych zámien aminokyselín (Turner and Talbot, 2008), ale i v TATA boxe v promotore génu (Niemann et al., 2007). Viac ako 90 rôznych mutácií génu *SOD1* u loveka je asociovaným s amyotrofickou laterálnou sklerózou (Zelko et al., 2002). Najčastejšou je výskyt mutácie spôsobujúcej zámenu 4 kódovanej aminokyseliny alanínu za valín v prvom exóne (Deng et al., 1993). Toto nevyhľaditeľné ochorenie spôsobuje degeneráciu motorických neurónov v oblasti miechy a mozgu. Mutácie sa vyskytujú približne u 2 % pacientov s ALS a asi u 10 - 15 % pacientov s familiárnou ALS (Zelko et al., 2002).

U psa boli na základe GWA analýzy popísané 2 substitučné mutácie v *SOD1* géne. Ich prítomnosť je spájaná s výskytom degeneratívnej myelopatie. Ide o zámenu guanínu na 118 pozícii (exon 2) za adenín, čo vyústí do tvorby lyzínu miesto kyseliny glutámovej (Awano et al., 2009). Wininger et al. (2011) popísal druhú substitučnú mutáciu, ktorej výskyt bol zatiaľ potvrdený len u plemena bernský salašnícky pes. Táto mutácia spôsobuje zámenu 52 bázy (exon 1) adenínu za tymín. Na základe tejto substitúcie sa tvorí treonín namiesto serínu.

## 4.2 Degeneratívna myelopatia

Degeneratívnu myelopatiu ako prvý popísal Averill v roku 1973 ako zákernú, progresívnu, celkovo propriceptívnu ataxiu a kŕčovitú parézu panvových končatín za inajúcu v neskoršej dospelosti, nakoniec vyúsťujúcu do paraplegie (Averill et al., 1973). Skupina ochorení získala svoje pomenovanie kvôli nešpecifickému histopatologickému poškodeniu tkaniva miechy z neuritej príčiny. V súčasnosti je degeneratívna myelopatia charakterizovaná ako smrteľné neurodegeneratívne ochorenie vyskytujúce sa u viacerých psích plemien (Awano et al., 2008). Ide o nezápalové ochorenie u ktorého nie je presne známy spôsob účinnosti. Tým, ktorí popisujúce vplyv retrovírusu, a iných vírusových a bakteriálnych kmeňov sa ukázali ako nesprávne (DeLahunta and Glass, 2009). Jediným v súčasnosti potvrdeným faktorom je mutácia *SOD1* génu.

Popísaná bola u plemena nemecký ovčák, sibírsky husky, boxer, welsh corgi pembroke, chesapeake bay retriever, rodézsky ridgeback, labradorský retriever, bernský salašnícky pes, nova scotia duck tolling retriever, hovawart, mastif, barzoj, nemecká doga a iné.

### 4.2.1 Klinické príznaky degeneratívnej myelopatie

Klinické príznaky degeneratívnej myelopatie sú pozorovateľné približne od 8. roku života postihnutého psa. Prvotne sa prejavuje nekontrolovateľná ataxia a mierne kŕčovitá paréza panvových končatín. Viditeľnými znakmi sú opotrebované nechty a orazastejšie postupné krívanie na zadné končatiny. Patelárne reflexy sú v tomto štádiu obvykle normálne, prípadne mierne znížené (Coates et al., 2010). Tieto príznaky sú pripisované strate horných motorických neurónov. Progres ochorenia je nezvratný a majitelia často volia eutanáziu psa skôr, než dôjde k úplnému ochrnutiu končatín (Zeng et al., 2014).

V neskorom štádiu vývinu ochorenia je možné na mieche pozorovať lézie a patologické zmeny. Dochádza k poruche morfológie a funkcie dolných motorických neurónov



prejavujúcej sa rozšírenou svalovou atrofiou a čiastočným, ale celkovým ochrnutím horných končatín. Objavuje sa dysfágia a pes stráca schopnosť chodiť (Matthews, 1985). V neskorej fáze rozvoja ochorenia sa vyskytuje fekálna a urinálna inkontinencia (Wininger et al., 2011). V terminálnom štádiu dochádza k zlyhaniu respiračného ústrojenstva (Morgan et al., 2014).

#### 4.2.2 Diagnostika degeneratívnej myelopatie

Z dôvodu veľkého množstva podobne sa prejavujúcich ochorení chrbtice psa, môžu byť prvotné klinické príznaky degeneratívnej myelopatie ľahko zamenené. Obdobné vonkajšie príznaky sa vyskytujú napr. pri dysplázii bedrového kĺbu (DeLahunta and Glass, 2009). Definitívnu diagnostiku je preto možné určiť až pitvou (Zeng et al., 2014).

Imunohistologické testy na detekciu fosforilovaných neurofilamentov a hodnoty výskytu proteínu v gliách nervovej sústavy (nazývaný aj astroprotein) sa používajú ako miera straty axónov. V postnatálnom tkanive je množstvo myelínu veľmi nízke a tiež je znížená hustota axónov v dorzálnych častiach chrbtice. Po celej dĺžke miechy sa vyskytujú napuchnuté myelínové pochvy. V ich okolí je hodnota astroproteinu relatívne konštantná (Wininger et al., 2011). V dorzálnych častiach miechy, medzi bedrovými stavcami a v oblasti krčnej chrbtice je možné pozorovať výskyt axonopatických lézií. Postupné rozšírenie po celej mieche trvá u každého jednotlivca rozdielne dlho, no vo všeobecnosti ide o dobu 6 - 12 mesiacov (DeLahunta and Glass, 2009). Pozorované histologické lézie, malé množstvo prítomných neurónov a demyelizácia sú typickými znakmi vyskytujúcimi sa v mieche jedinca postihnutého vyšším štádiom degeneratívnej myelopatie (Wininger et al., 2011).

Pomocou imunochemických testov miechy je možné zistiť prítomnosť *SOD1* - imunoreaktívnych agregátov v motorických neurónoch (Morgan et al., 2014). U postihnutých degeneratívnou myelopatiou sa v neurónoch vyskytujú cytoplazmatické inklúzie obsahujúce anti - *SOD1* protilátku, javiacu sa po PAS teste ako jasne ohraničený tmavý zhluk (Awano et al., 2008).

Jednou z možných diagnostických metód je i elektromyografia. V ranej fáze nie je viditeľná žiadna spontánna aktivita a rýchlosť prenosu signálu neurónmi je v norme. Neskôr je pozorovaná multifokálna aktivita svalstva na končatinách a rýchlosť prenosu signálu medzi proximálnymi a distálnymi motorickými neurónmi je znížená v porovnaní s rýchlosťou u zdravého jedinca (Awano et al., 2008; Coates et al., 2010).

PWC T8 motor roots	Unaffected	Affected	P value
No. of dogs	5	8	
Average count of axons	3,676 ± 262	3,863 ± 691	0.57
Average endoneural cross-sectional area ( $\mu\text{m}^2$ )	308,081.54 ± 39,460.49	297,826.80 ± 55,818.72	0.72
Average area occupied by axons ( $\mu\text{m}^2$ )	191,114.56 ± 35,453	179,168.71 ± 24,679.03	0.48
Endoneural area occupied by axons (%)	61.7 ± 6.1	60.7 ± 5.8	0.78
Average axon density count/ $\text{mm}^3$ )	12,165.08 ± 2,131	13,400.49 ± 3,874.93	0.53

Tab. 1: Merania motorických neurónov od 5 nepostihnutých a 8 postihnutých psov (Morgan et al., 2014).

#### 4.2.3 Lie ba degeneratívnej myelopatie

Neexistuje možná lieba na zvrátenie degenerácie axónov neurónov v mieche. Pôvodná teória predpokladajúca autoimunitný charakter ochorenia nebola potvrdená, ani –túdie popisujúce podávanie imunosupresív neuvádzajú pozitívny efekt na liebu degeneratívnej myelopatie (Polizopoulou et al., 2008). –asté je podávanie vitamínov E a B<sub>12</sub> kvôli ich známej úlohe pri liebe iných neurologických ochorení u domestikovaných zvierat i primátov, no ich vplyv zatiaľ nebol potvrdený (DeLahunta and Glass, 2009).

Pozitívnu odpoveď pri spomalení postupu ochorenia mala podpora svalstva pomocou krátkych prechádzok niekedy kokrát denne, pasívneho cvičenia, masáží a hydroterapie. U psov ktorí podstúpili intenzívnu fyzioterapiu trvalo úplné rozvinutie príznakov v priemere o 255 dní dlhšie ako u psov, ktorí fyzioterapiu nepodstúpili (Kathmann et al., 2006). Celkovo však prognóza pri degeneratívnej myelopatii nie je pozitívna.

#### 4.2.4 Genetické testovanie degeneratívnej myelopatie

Genetické testovanie predispozície na degeneratívnu myelopatiu je dostupné majiteľom v komerčných laboratóriách. Test je založený na detekcii mutácií v SOD 1 gène. –túdie u viac než 100 druhov psov poukázali na priamu súvislosť s mutáciou tohto génu a s rozvinutím ochorenia. Psy homozygoti v mutácii je možné zaradiť do rizikovej skupiny pre rozvoj degeneratívnej myelopatie a určite prenesú chromozóm s mutovanou alelou na svoje potomstvo. Psy heterozygoti majú nízku pravdepodobnosť prejavu ochorenia a mutovanú alelu prenesú na polovicu svojho potomstva. Psy homozygoti bez mutácie majú minimálnu šancu na prepuknutie degeneratívnej myelopatie a na svoje potomstvo vždy prenesú nemutovanú alelu (Coates et al., 2010).

#### 4.2.5 Amyotrofická laterálna skleróza

Amyotrofická laterálna skleróza je skupina ochorení vyskytujúcich sa u dospelých pacientov, progresívne neurodegeneratívne postihujúcich horné i dolné motorické neuróny miechy (Ostrander, 2012). Posledné štúdie predpokladajú poškodenie motorických aj senzorických nervov i malých epidermiálnych senzorických vlákien (Shelton et al., 2012). Toto spôsobuje svalovú slabosť a atrofiu svalstva, postupne pokračujúcu v paralýzu a smrť (Ostrander and Ruvinsky, 2012).

Viac než sto mutácií génu *SOD 1* je zapojených do vzniku a priebehu familiárnej amyotrofickej laterálnej sklerózy. Patologické lézie vyskytujúce sa pri tomto ochorení sú veľmi podobné tým, ktoré sú pozorované pri degeneratívnej myelopatii u psa, čo z neho robí ideálny zvierací model na výskum (Ogawa et al., 2013). Mutácie v *SOD1* géne spôsobujú zmenu konformácie mutantného superoxid dismutáza 1 proteínu, čím dochádza k zmene jeho biologickej aktivity a k podpore tvorby intracelulárnych agregátov (Awano et al., 2008).

Nadmerná produkcia oxidu dusného a zvýšená akumulácia denaturovaných proteínov v neurónoch je jedným zo spoločných znakov familiárnej amyotrofickej sklerózy a degeneratívnej myelopatie u psa. Glutamát je prevládajúca prenosová aminokyselina v centrálnej nervovej sústave. Na membráne bunky sa nachádzajú receptory regulujúce vstup glutamátu do bunky a tým udržiavajú homeostázu synaptického prenosu. Glutamín syntetáza katalizujúca premenu kyseliny glutámovej a amoniaku na glutamín sa nachádza predovšetkým v astrocytoch a oligodendrocytoch v mieche. Zvýšené množstvo glutamínu je pre neuróny toxické. Predpokladá sa, že zvýšenie glutamínu a oxidatívny stres hrajú významnú úlohu pri rozvoji ako familiárnej amyotrofickej sklerózy, tak i degeneratívnej myelopatie (Ogawa et al., 2013).

Psy postihnuté degeneratívnou myelopatiou môžu pomôcť k identifikácii procesov na pozadí degenerácie motorických neurónov ako aj environmentálnych faktorov ovplyvňujúcich vznik a progres amyotrofickej laterálnej sklerózy (Awano et al., 2008).

### 4.3 PCR - Polymerase chain reaction

V posledných štyridsiatich rokoch môžeme pozorovať obrovský nárast a vývoj nových prístrojov a techník v molekulárnej biológii. Pravdepodobne objav filadnej inej techniky nebol taký významný ako polymerázová reazová reakcia - PCR (Innis et al., 1995). Za otca mylienky PCR je považovaný Mullis, ktorý bol za túto metódu v roku 1993 ocenený Nobelovou cenou za chémiu (Bartlett and Stirling., 2003). Dôležitým krokom bola i izolácia enzýmu termostabilnej polymerázy z termofilnej baktérie *Thermus Aquaticus*, čím sa výrazne urýchlil priebeh reakcie, keď sa odstránila nutnosť pridávať jednotlivé komponenty počas reakcie (Saiki et al., 1988).

Jednou z najvýznamnejších vlastností PCR je jej tvárnosť a veľmi široké možnosti aplikácie a modifikácie. PCR je v súčasnosti upravená priamo pre výskum v molekulárnej biológii, na testovanie špecifických transkriptov génov i génovej expzie. Poskytuje nový pohľad na proces transkripcie, a tým kontrolu rastu, diferenciácie a vývoja bunky (Innis et al., 1995).

V súčasnosti sú metódy, ktoré sú založené na PCR, využívané v mnohých odvetviach, ako sú antropológia, forenzné vedy, genomické analýzy, a v medicíne na diagnostiku geneticky podmienených ochorení človeka (Innis et al., 1995).

#### 4.3.1 Princíp metódy PCR

Polymerázová reazová reakcia slúži na amplifikáciu fragmentu DNA alebo RNA (Schochetman, 1988). PCR je in vitro metóda pre enzymatickú syntézu špecifickej DNA sekvencie, využívajúca dva oligonukleotidové primery pre hybridizáciu s protikladnými vláknami, čím sa ohraničí oblasť záujmu v študovanej DNA. Tieto oligonukleotidy prisadnú na separované vlákna templátovej DNA ako primery, nazývané i "rastúci koniec" novo syntetizovaných vlákien. Keď nové vlákno vytvorené pomocou DNA polymerázy presiahne za úroveň opačného primeru, stáva sa novým templátom pre ďalšiu reakciu. Vďaka tomu, keď novovzniknuté vlákno slúži ako templát v ďalšom cykle reakcie, sa množstvo cielej DNA zvyšuje dvojnásobne v každom cykle (Erlich, 1989) (obr.5).

1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024
11	2048
12	4096
13	8192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
<b>CYCLES</b>	<b>COPIES</b>

Obr.5: Počet amplifikovaných fragmentov DNA v jednotlivých cykloch PCR (Rabinow et al., 1996)

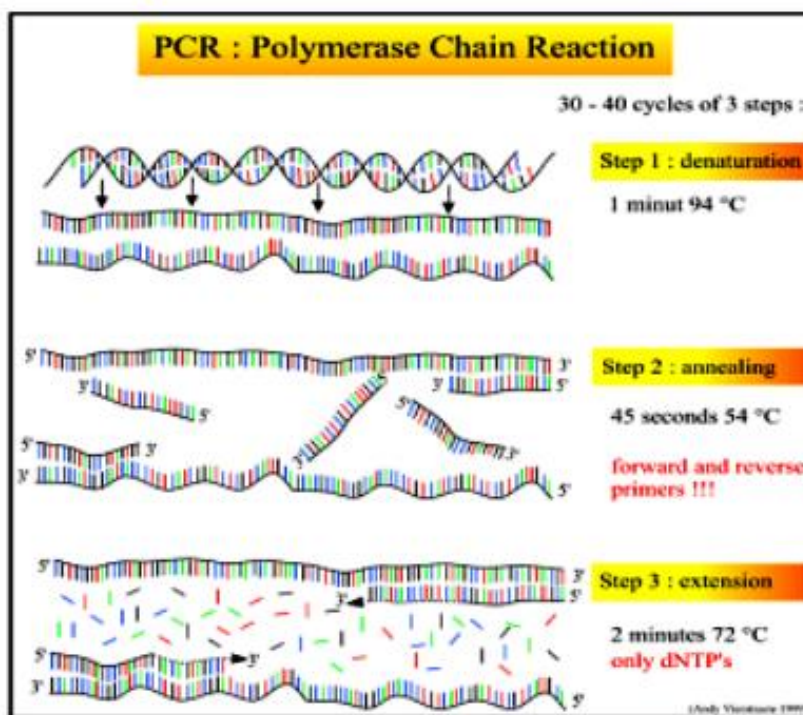
Základom každého cyklu PCR sú 3 procesy (Delidow et al., 1993) (obr. 6):

1. Denaturácia templátovej DNA na jednovláknovú DNA
2. Napojenie primerov na každú ssDNA
3. Syntéza nového vlákna DNA od primeru

Počas denaturácie dochádza k porušeniu vodíkových mostíkov v dvojitom vlákne DNA a následne k jej rozdeleniu na dve jednovláknové molekuly. Najefektívnejší a najjednoduchší spôsob, ako dosiahnu denaturáciu je zahriatie DNA na 95 -100 °C (Schochetman et al., 1988).

V druhom kroku dochádza k pripojeniu primerov na jednovláknové úseky DNA. Primery sú orientované tak, aby následná syntéza DNA zahŕňala oblasť medzi nimi (Primrose and Twyman, 2006). Ide o krátke oligonukleodity o dĺžke 15 -25 nukleotidov s obsahom približne 50 -60 % G-C bází. Napojenie sa na konkrétny úsek DNA je na princípe

komplementarity, vďaka špecifickosti primerov. Pri výbere primerov je dôležité aby tvorili duplex štruktúry alebo vlákna (Chen and Janes, 2002). Hybridizácia jednotlivých vlákien DNA s primerami je dosiahnutá znížením teploty reakčného mixtu na nižšiu teplotu, ktorá sa obvykle pohybuje medzi 40 -65 °C v závislosti od olinukleotidovej sekvencie použitej ako primery (Pelt - Verkuil et al., 2008). V treťom kroku PCR reakcie dochádza k syntéze komplementárneho vlákna DNA od primeru. Polymeráza po nasadení na primer tvorí nové vlákno z deoxynukleotidov prítomných v reakčnej zmesi. Najvyužívanejšou polymerázou je Taq polymeráza, ktorá v zmesi s optimálnym pomerom reakčných látok a pri teplote 72 °C pripojí asi 1000 deoxynukleotidov za minútu (Shehnam, 2012).



Obr. 6: Priebeh polymerázovej reakcie (Shehman, 2012)

Celkovo sa jednotlivé kroky opakujú 25-30 krát. Pri 100% efektívnosti by po 20 cykloch PCR reakcie, do ktorej vstúpili 4 molekuly DNA, vzniklo približne  $2^{20}$  amplifikovaných fragmentov (Ehrlich et al., 1989).

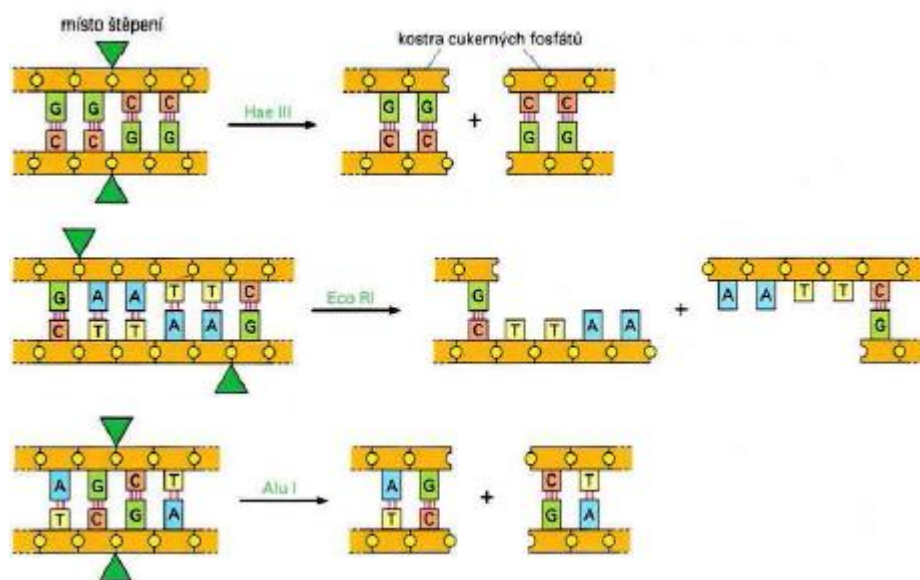
Najväčšou výhodou polymerázovej reakcie je vysoká špecifickosť a relatívne lacné prevedenie. Je však nutné poznať aspoň okrajové sekvencie amplifikovanej oblasti pre navrhnutie primerov. Nevýhodou je chybovosť Taq polymerázy, ktorá sa ale dá nahradiť inou polymerázou s korekčnou aktivitou.

#### 4.3.2 PCR - RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

Metóda PCR-RFLP je založená na štiepení amplifikovaných fragmentov DNA pomocou alelicky špecifických enzýmov (Hui and Bidwell, 1993). Vyuffívané enzýmy - restrik né endonukleázy pochádzajú prevažne z baktérií a rozpoznávajú špecifické miesta na DNA obvykle dlhé 4-8 nukleotidových párov. Tieto oblasti sa nazývajú palindromy a sú charakteristické pre každý restrik ný enzým (Alberts et al., 1998).

Testovaná DNA sekvencia je typická prítomnosťou i absenciou určitého palindromu, potrebného pre detekciu miesta štiepenia restrik ného enzýmu. V prípade mutácie v oblasti palindromu, miesto pre štiepenie zaniká, prípadne vzniká nové. Metóda PCR - RFLP detekuje polymorfizmus v tejto oblasti a následnou separa nou elektroforézou je možné detekovať ve kosti vzniknutých fragmentov (Leonard, 2007).

PCR- RFLP je relatívne rýchla, jednoduchá a finančne nenáročná metóda s reprodukovateľnými výsledkami. Nevýhodou je nutnosť použitia separa nej elektroforézy na zobrazenie veľkosti získaných fragmentov. Typicky používané restrik né enzýmy štiepia DNA na mnohých miestach, a preto pri použití dlhých úsekov DNA vzniká počas elektroforézy veľké množstvo bandov, ktorých odčítanie môže byť nepresné (Filippis et al., 2012).



Obr.7: Ukážka restrik ného štiepenia vybranými enzýmami (Alberts et al., 1998)

## 4.4 Separa ná elektroforéza

Elektroforéza patrí medzi metódy pre separáciu proteínov a fragmentov DNA (Xu, 2008). Princíp metódy je založený na pohybe molekúl DNA nesúcich záporný náboj v jednosmernom elektrickom poli. Rýchlosť pohybu jednotlivých fragmentov je závislá od ich veľkosti, hustoty agarózového gélu a sily elektrického prúdu. Týmto spôsobom je možné separovať rôzne veľké fragmenty DNA na základe rýchlosti pohybu v géle (Sambrook et al., 1989). Dlhé fragmenty sa v agarózovom géle posunú o menšiu vzdialenosť, pretože sú v hustom géle viac spomaľované (Alberts et al., 1998).

DNA nie je v agarózovom ani polyakrylamidovom géle vôbec pozorovateľná, preto je potrebné ju zafarbiť alebo označiť. Na zviditeľnenie DNA sa využíva navedenie fluorescenčných látok a ich následné zobrazenie pod ultrafialovým svetlom, alebo zaštiepenie rádioaktívne značených nukleotidov (najčastejšie pomocou rádioizotopu  $^{32}\text{P}$  vo forme fosfátu) do DNA ešte pred elektroforézou (Alberts et al., 1998). Veľkosť separovaných fragmentov je určená na základe porovnania s veľkosťným markrom (hmotnostný štandard), u ktorého je veľkosť jednotlivých fragmentov presne definovaná.

## 4.5 Sekvenovanie

Sekvenovanie je laboratórna technika umožňujúca stanovenie presného poradia nukleotidov v testovanej DNA. Medzi najvyužívanejšie sekvenovacie metódy v súčasnosti patrí Sangerova sekvenovacia metóda a metóda chemickej degradácie Maxama a Gilberta (Kumar and Garg, 2005).

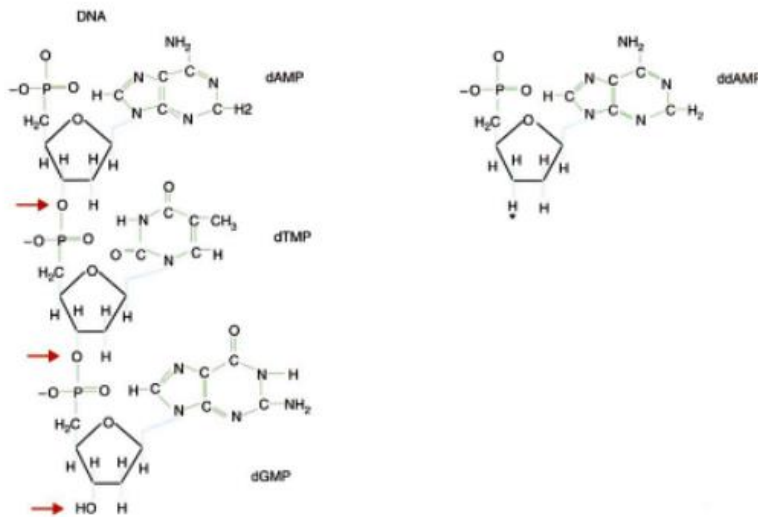
### 4.5.1 Sangerova sekvenovacia metóda

Princíp Sangerovej sekvenovacej metódy je založený na tvorbe komplementárneho vlákna k jednému z dvoch vlákien získaných po denaturácii DNA. Syntéza tohto vlákna prebieha v *in vitro* podmienkach za prítomnosti malého množstva dideoxynukleozid trifosfátov v reaknej zmesi (Serre, 2007). Dideoxynukleotidy sú molekuly odlišujúce sa od deoxynukleotidov prítomnosťou atómu vodíka na 3'uhlíku miesto OH skupiny. Naviazanie týchto molekúl ukončí predĺžovanie reťazca polymerázou, keďže nie je možné vytvorenie fosfodiesterovej väzby s nasledujúcim deoxynukleotidom (Cheng et al., 2010) (Obr. 8). Sangerova sekvenovacia metóda je preto nazývaná i metódou termináciou (Kumar and Garg, 2005). Limitované množstvo dideoxynukleotidov pri začleňovaní do reťazca umožní vznik DNA



fragmentov o rôznej dĺžke (Cheng et al., 2010). Na určenie postupnosti jednotlivých báz sa využíva kapilárna elektroforéza.

Novovytvorené fragmenty je potrebné označiť pre zviditeľnenie na gélovej elektroforéze a ich poznanie laserom v priebehu kapilárnej elektroforézy. Je možné využiť známy primer, dioxynukleotidy alebo dideoxynukleotidy (Serre, 2007). Pre označenie sa využívajú rádioaktívne izotopy, striebro alebo fluorescenčné farbivá.



Obr.8: Porovnanie štruktúry deoxynukleotidov a dideoxynukleotidu (Cheng et al., 2010)

## 5 Materiál a metódy

### 5.1 Odber a izolácia DNA

#### 5.1.1 Odber DNA

Na získanie vzoriek od jednotlivých bernských salašnických psov bola vyufitá neinvazívna metóda odberu epitelálnych buniek z bukálnych slizníc pomocou cytologických kefiek (MedPlus). Psovi nesmela byť minimálne 2 hodiny pred odberom podávaná žiadna potrava a uštieňatok musel byť tiež zamedzený prístup k matke, aby nedošlo ku kontaminácii vzorky materským mliekom. Po odbere bola kefka vložená do papierovej obálky. Vzorky odobraté boli označené menom psa a číslom, pod ktorým boli ďalej spracovávané. Po vyschnutí bola vzorka uložená v mraziacom boxe pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do ďalšieho spracovania.

#### 5.1.2 Izolácia DNA

Izolácia DNA odobratej cytologickou kefkou bola uskutočnená pomocou kitu NukleoSpin Tissue XS (Machery - Nagel), vyrábaného pre tento účel na základe popisu od výrobcu.

Proces izolácie je popísaný v nasledujúcich bodoch:

1. Vybratie cytologickej kefky z papierovej obálky a vloženie do skúmavky.
2. Pridanie  $180\text{ }\mu\text{l}$  pufru T1 a  $25\text{ }\mu\text{l}$  proteínázy K slúfiacich k rozkladu buniek.
3. Premiešanie vzorky pomocou vortexu.
4. Inkubácia vzorky pri teplote  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 45 minút, každých 15 minút premiešanie vzorky.
5. Pridanie  $200\text{ }\mu\text{l}$  pufru B3 a následné premiešanie za pomoci vortexu.
6. Inkubácia vzorky pri teplote  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minút.
7. Vybratie cytologickej kefky zo skúmavky.
8. Pridanie  $210\text{ }\mu\text{l}$  96 % etanolu.
9. Vyzrážanie DNA preklápaním skúmavky.
10. Prepipetovanie vzorky do skúmavky s filtrom.
11. Centrifugácia vzorky na  $11\ 000$  otárok po dobu 1 minúty a následné odliatie preteenej frakcie.
12. Pridanie  $500\text{ }\mu\text{l}$  BW pufru. Opätovná centrifugácia vzorky a odliatie preteenej frakcie.
13. Pridanie  $600\text{ }\mu\text{l}$  B5 pufru, centrifugácia a odliatie preteenej frakcie.

14. Centrifugácia vzorky na 11 000 otá ok po dobu 1 minúty z dôvodu odstránenia zvyškov etanolu.
15. Prenesenie membrány s DNA do istej skúmavky.
16. Pridanie 100 µl pufru BE predhriateho na 70 °C. Po 1 minúte státia nasleduje centrifugácia vzorky na 11 000 otá ok po dobu 1 minúty.
17. Odstránenie filtra, uzavretie skúmavky a odklad vzorky do mraziaceho boxu.

### 5.1.3 Kvantita a kvalita izolovanej DNA

Kvantita a kvalita izolovanej DNA bola meraná pomocou UV - spektrometrie za použitia prístroja NanoPhotometer (Implen). Po zmeraní obsahu množstva DNA bola vzorka nariadená deionizovanou vodou na koncentráciu 10 ng/µl. Kvalita izolovanej DNA bola hodnotená na základe pomeru absorbančie A260/A280, ktorý ideálne dosahuje hodnotu 1,8 - 2,1 a pomeru absorbančie A260/A230. Tieto pomery môžu byť indikátormi kontaminácie vzorky organickými látkami.

## 5.2 PCR - RFLP marker kauzálnej mutácie génu *SOD1* vedúci k degeneratívnej myelopatii u bernského salašického psa

U širokého spektra plemien je známa bodová mutácia *SOD1* génu vedúca k degeneratívnej myelopatii na pozícii c118G>A. Wininger et al., (2011) vo svojej štúdií popísal prípad fenky bernského salašického psa s prejavmi degeneratívnej myelopatie spôsobenými inou bodovou mutáciou v *SOD1* géne. Ide o zámenu 52 bázy - adenínu za tymín. Pri navrhovaní nových markerov na detekciu mutácií génu *SOD1* asociovaných s degeneratívnou myelopatiou bola optimálna a najvhodnejšia teplota určená na základe teplotného gradientu.

### 5.2.1 Voľba restriktívneho enzýmu schopného rozlíšiť alely génu *SOD1*

#### Mutácia 118. bázy *SOD1* génu

Vhodný restriktívny enzým bol zvolený podľa programu Webcutter 2.0, ktorý je voľne dostupný na adrese <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>. Z výstupu vyplýva, že restriktívny enzým *Eco57I* je vhodný na určenie sekvenčného rozdielu medzi nemutovanou a mutovanou alelou. Charakteristické restriktívne miesto pre tento enzým je zobrazené na obrázku.



Obr. 9: Restričné miesto charakteristické pre enzým *Eco57I*

Amplifikovaný fragment o veľkosti 79 bp je špecificky reštrikovaný enzýmom *Eco57I* 16 nukleotidov za rozpoznávanou sekvenciou (CTG AAG) za vzniku 2 fragmentov o veľkosti 17 bp a 62 bp. U mutovanej alely sa nenachádza rozpoznávací sekvencia a enzým nie je schopný takýto fragment rozštiepiť. Keďže je u markera génu *SOD1* známy kodominantný charakter, u heterozygotného jedinca budú po štiepení vzniknúť 3 fragmenty o veľkosti 79 bp, 62 bp a 17 bp.

#### Mutácia 52. bázy *SOD1* génu

Na odhalenie prítomnosti mutácie 52. bázy *SOD1* génu u bernského salašnického psa bol pomocou programu Webcutter 2.0 vybraný vhodný reštrikčný enzým. Fragment získaný po PCR reakcii je enzýmom *BanI* špecificky reštrikovaný na fragmenty rozlíšiteľné elektroforézou. U mutovanej alely vznikli dva nové fragmenty, no u nemutovanej alely nebola prítomná rozpoznávací sekvencia a k rozštiepeniu nedošlo.

### **5.2.2 Použitie PCR - RFLP markera kauzálnej mutácie génu *SOD1***

#### Mutácia 118. bázy *SOD1* génu

Primery použité pre amplifikáciu boli zvolené na základe štúdie publikovanej Awanom, et al (2009). Ide o primery: *SOD1*ORIG F 3' AGTGGGCCTGTTGTGGTATCA 5' a *SOD1*ORIG R 3' CTCCAAACTGATGGACGTGGAAT 5'. Zloženie PCR reakcie pre amplifikáciu je popísané v tabuľke.

Zložka	koncentrácia
DNA	20 ng . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Tris - HCl	10 mM
<i>SODIORIG F</i>	0,4 $\mu\text{M}$
<i>SODIORIG R</i>	0,4 $\mu\text{M}$
dNTP	200 $\mu\text{M}$
BSA	5 $\mu\text{g}$ . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
<i>Taq</i> polymeráza (Roche)	0,5 U . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Obejm	12,5 $\mu\text{l}$
pH	8,8

Tab. 2: Zloženie PCR reakcie pre amplifikáciu PCR - RFLP markera mutácie 118. bázy génu *SOD1*

Na amplifikáciu bol použitý Termocykler C100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad). Teplotný a časový profil jednotlivých fáz amplifikácie je popísaný v tabuľke.

Fáza	Teplota	čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	95 °C	180 sec.	1
Denaturácia	95 °C	30 sec.	30
Annealing	60 °C	40 sec.	
Elongácia	72 °C	40 sec.	
Záverečná elongácia	72 °C	420 sec.	1

Tab. 3: Teplotný a časový profil amplifikácie PCR - RFLP markera mutácie 118. bázy génu *SOD1*

Po amplifikácii PCR - RFLP markera génu *SOD1* vzniká produkt o veľkosti 79 bp. Tento produkt bol následne štiepený restriktívnym enzýmom *Eco57I*. Presné podmienky štiepenia sú popísané v tabuľke.

Zložka	Množstvo
PCR produkt	5,15 $\mu$ l
10 x pufer G (Thermo Scientific)	1,2 $\mu$ l
0,5 mM SAM (Thermo Scientific)	0,24 $\mu$ l
<i>Eco57I</i> (5U . 1 $\mu$ l <sup>-1</sup> ) (Thermo Scientific)	0,5 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	4,91 $\mu$ l

Tab. 4: Podmienky restriktívneho štiepenia pre detekciu polymorfizmu 118. bázy génu *SOD1*

Pre restriktívne štiepenie bol použitý termocykler C100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad). Celý proces prebiehal 16 hodín pri teplote 37 °C.

Na detekciu polymorfizmov bola použitá agarózová elektroforéza. Produkt restriktívneho štiepenia bol separovaný v 5 % agarózovom géle v 1x TBE pufrí. Separácia fragmentov prebiehala pri laboratórnej teplote po dobu 45 minút za stáleho napätia 120 V. DNA fragmenty boli zviditeľnené pomocou pridaného ethídium bromidu pod UV svetlom. Výsledné elektroforeogramy boli zaznamenané použitím systému GelDoc (BioRad) a programu QuantityOne (BioRad).

#### Mutácia 52. bázy *SOD1* génu

Na základe práce publikovanej v roku 2014 tímom vedcov na čele s Zengom boli zvolené vhodné primery na amplifikáciu oblasti v okolí 52. bázy *SOD1* génu. Ide o primery: 5' GCCGTGTGCGTGTGAAG 3' a 5' CCCGCCCTTGCCTTCT 3'. Na amplifikáciu bol použitý Termocykler C100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad). Zloženie, teplotný a časový profil PCR reakcie sú uvedené v tabuľkách.

Zložka	Koncentrácia
DNA	20 ng . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Tris - HCl	10 mM
Nonidet P40	0,08%
SOD 1 52 F	0,8 $\mu$ M
SOD 1 52 R	0,8 $\mu$ M
dNTP	200 $\mu$ M
DMSO	0,6 $\mu$ l . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
BSA	5 ng . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
<i>Taq</i> polymeráza (Thermo Scientific)	1U . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Obejm	12,5 $\mu$ l
pH	8,8

Tab. 5: Zloženie PCR reakcie pre amplifikáciu PCR - RFLP markera mutácie 52. bázy génu *SOD1*

Fáza	Teplota	čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	97 °C	180 sec.	1
Denaturácia	96 °C	50 sec.	42
Annealing	56 °C	40 sec.	
Elongácia	72 °C	40 sec.	
Záverečná elongácia	72 °C	420 sec.	1

Tab. 6: Teplotný a časový profil PCR reakcie pre PCR - RFLP markera mutácie 52. bázy génu *SOD1*

Výsledný fragment získaný amplifikáciou má veľkosť 71 pb. Na čistenie bol následne použitý enzým *Ban I*. Priebeh restriktívneho čistenia je popísaný v nasledujúcej tabuľke.

Zložka	Množstvo
PCR produkt	6 µl
Pufer TANGO	2,6 µl
<i>BanI</i> ( <i>BshNI</i> ) (5U . 1 µl <sup>-1</sup> ) (Thermo Scientific)	3,9 µl
dd H <sub>2</sub> O	3,9 µl

Tab. 7: Podmienky restrikčného štiepenia pre detekciu polymorfizmu mutácie 52. bázy génu *SOD1*

Restrikčné štiepenie prebiehalo v termocykleri C100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad) 12 hodín pri teplote 37 °C a následne 20 minút pri teplote 65 °C. Výsledné fragmenty mali veľkosť 71 bp (u nemutovanej alely, kde nedošlo k štiepeniu), 34 bp a 37 bp.

Vzniknutý produkt bol separovaný v 6 % agarózovom géle v 1x TBE. Separácia fragmentov prebiehala pri laboratórnej teplote po dobu 45 minút za stáleho napätia 120 V. DNA fragmenty boli zviditeľnené pod UV svetlom pomocou pridaného ethídium bromidu. Získané elektroforeogramy boli zaznamenané použitím systému GelDoc (BioRad) a programu QuantityOne (BioRad).

Pre lepšie rozpoznanie fragmentov boli navrhnuté nové primery: MUT52CZU2 F (TCGGTTTGCGTCGGCGTCT) a MUT52CZU2 R (CCCCGCCCTTGCCTTCTG).

Fragment vzniknutý po PCR reakcii mal veľkosť 180 bp. Použitím restrikčného enzýmu *BanI* došlo k rozštiepeniu fragmentov obsahujúcich mutovanú alelu na nové fragmenty o veľkosti 145 bp a 35 bp. Priebeh a zloženie PCR reakcie a restrikčného štiepenia sú popísané v nasledujúcich tabuľkách.



Zložka	Koncentrácia
DNA	20 ng . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Tris - HCl	10 mM
Nonidet P40	0,08%
MUT52CZU2 F	0,8 $\mu$ M
MUT52CZU2 R	0,8 $\mu$ M
dNTP	200 $\mu$ M
DMSO	0,6 $\mu$ l . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
BSA	5 ng . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
<i>Taq</i> polymeráza (Thermo Scientific)	1U . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Obejm	12,5 $\mu$ l
pH	8,8

Tab. 8: Zloženie PCR reakcie pre amplifikáciu PCR - RFLP markera mutácie 52. bázy génu *SOD1*

Fáza	Teplota	čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	97°C	180 sec.	1
Denaturácia	96°C	50 sec.	42
Annealing	63°C	40 sec.	
Elongácia	72°C	70 sec.	
Záverečná elongácia	72°C	420 sec.	1

Tab. 9: Teplotný a časový profil PCR reakcie pre PCR - RFLP markera mutácie 52. bázy génu *SOD1*

Zložka	Množstvo
PCR produkt	6 µl
Pufer TANGO	2,6 µl
<i>BanI</i> ( <i>BshNI</i> ) (5U . 1 µl <sup>-1</sup> ) (Thermo Scientific)	3,9 µl
dd H <sub>2</sub> O	3,9 µl

Tab. 10: Podmienky restrikčného tečenia pre detekciu polymorfizmu mutácie 52. bázy génu *SOD1*

Restrikčné tečenie prebiehalo 14 hodín pri teplote 37 °C a následne 20 minút pri teplote 65 °C. Získané fragmenty boli rozlíšené pomocou elektroforézy v 6 % agarózovom géle v 1x TBE pufrí. Separácia fragmentov prebiehala pri laboratórnej teplote po dobu 45 minút za stáleho napätia 120 V. Fragmenty boli zviditeľnené pod UV svetlom pomocou pridania ethídium bromidu. Elektroforeogramy boli zaznamenané systémom GelDoc (BioRad) a programom QuantityOne (BioRad).

### 5.3 Sekvenácia oblasti *SOD1* génu s výskytom markerov kauzálnej mutácie génu *SOD1*

#### 5.3.1 Amplifikácia fragmentu génu *SOD1* určeného k sekvenácii

Dvojica sekvenčných primerov bola zvolená na základe práce Molekulárna detekcia mutácií zodpovedných za degeneratívnu myelopaiu u psov (Dujková, 2013). Sekvenčné primery boli označené *SOD1EX2SEKV F* (3' TCAAGTCCATGTTCTCCCA 5') a *SOD1EX2SEKV R* (3' TTGGGCATGTTGAGGATTTTC 5').

Zloženie PCR reakcie pre amplifikáciu fragmentu *SOD1* génu určeného k sekvenácii a jej teplotný a časový profil sú uvedené v nasledujúcich tabuľkách. Amplifikácia prebiehala v termocykleri C100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad).

Zložka	Koncentrácia
DNA	20 ng . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Tris - HCl	10 mM
Nonidet P40	0,08%
<i>SODI</i> EX2SEKV F	0,4 $\mu$ M
<i>SODI</i> EX2SEKV R	0,4 $\mu$ M
dNTP	200 $\mu$ M
DMSO	0,6 $\mu$ l . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
BSA	5 ng . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
<i>Taq</i> polymeráza (Thermo Scientific)	0,7 U . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Obejm	12,5 $\mu$ l
pH	8,8

Tab. 11: Zloženie PCR reakcie pre amplifikáciu fragmentu *SODI* génu určeného k sekvenácii

Fáza	Teplota	čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	95 °C	180 sec.	1
Denaturácia	95 °C	30 sec.	35
Annealing	59,6 °C	40 sec.	
Elongácia	72 °C	60 sec.	
Záverečná elongácia	72 °C	420 sec.	1

Tab. 12: Teplotný a časový profil PCR reakcie pre amplifikáciu fragmentu *SODI* génu určeného k sekvenácii

### 5.3.2 Gélová purifikácia PCR produktu markera génu *SODI*

Na vyistenie produktu získaného amplifikáciou od zvyškov nukleotidov bola použitá gélová purifikácia.

Produkty amplifikácie boli separované elektroforézou v 1,5 % agarózovom géle v 1 x TBE pufrí. Separácia prebiehala za laboratórnej teploty, po dobu 50 minút pri jednosmernom elektrickom prúde o sile 120 V. Získaný fragment DNA o veľkosti 79 pb bol z gélu vyrezaný

skalpelom a prenesený do skúmavky. Extrakcia DNA z gélu bola uskutočnená pomocou MiniElute PRC Purification Kit (Qiagene) podľa návodu výrobcu.

Vyrezanie DNA fragmentov z agarózového gélu sterilným skalpelom a ich prenesenie do skúmavky. Postup purifikácie DNA fragmentu z agarózového gélu je popísaný v nasledujúcich bodoch:

1. Zväčšenie gélových fragmentov.
2. Pridanie 3 objemov QG pufru na jeden objem gélu.
3. Inkubácia vzorky približne po dobu 10 minút pri teplote 50 °C. Počas tejto doby pravidelné premiešavanie vzorky až do úplného rozpustenia gélového fragmentu.
4. Pridanie 1 objemu izopropanolu. Vyžráňanie DNA preklápaním skúmavky.
5. Prepipetovanie obsahu skúmavky do filtra inej skúmavky.
6. Centrifugácia na 13 000 otáčok po dobu 1 minúty a následné odliatie pretečenej frakcie.
7. Pridanie 500 µl QG pufru. Centrifugácia na 13 000 otáčok po dobu 1 minúty a následné odliatie pretečenej frakcie.
8. Pridanie 750 µl PE pufru a opätovná centrifugácia.
9. Preklad filtra do novej skúmavky.
10. Pridanie 20 µl H<sub>2</sub>O –peciálne upravenej pre sekvenáciu (pH 7,8). Po minúte státiacentrifugácia na 1 minútu.
11. Odstránenie filtra.

Gélovou purifikáciou PCR produktu markera génu *SOD1* bolo získaných 20 µl roztoku obsahujúceho DNA. Kvalita a kvantita DNA bola zmeraná pomocou prístroja NanoPhotometer (Implen) a následne nariadená vodou s pH 7,8 na koncentráciu 20 ng. µl<sup>-1</sup>.

### **5.3.3 Príprava sekvenacej reakcie**

Na sekvenáciu reakciu bol použitý BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). Zloženie a profil sekvenacej reakcie je popísaný v tabuľkách.

Zložka	Koncentrácia	Objem
PCR produkt	20 ng . $\mu\text{l}^{-1}$	
5x Sequencing Buffer (Life Technologies)	1x	4,0 $\mu\text{l}$
Primer F resp. R (1 pikomol . $\mu\text{l}$ )	3,2 pikomolu . $20 \mu\text{l}^{-1}$	3,2 $\mu\text{l}$
Terminator Ready Reaction Mix (Life Technologies)	2 $\mu\text{l}$ . $20 \mu\text{l}^{-1}$	2,0 $\mu\text{l}$

Tab. 13: Zloženie sekvena nej reakcie

Fáza	Teplota	čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	96 °C	60 sec.	1
Denaturácia	96 °C	10 sec.	25
Annealing	50 °C	5 sec.	
Elongácia	60 °C	240 sec.	

Tab. 14: Profil sekvena nej reakcie

### 5.3.4 Purifikácia produktu sekvena nej reakcie

K získanému produktu sekvena nej reakcie o objeme 20  $\mu\text{l}$  boli pridané 2  $\mu\text{l}$  glykogéne o koncentrácii 20 ng .  $\mu\text{l}^{-1}$  (Thermo Scientific) , 2  $\mu\text{l}$  3M octanu sodného a 50  $\mu\text{l}$  96 % etanolu. Zmes bola inkubovaná pri laboratórnej teplote po dobu 15 minút. Získaný roztok bol centrifugovaný 30 minút na 13 200 otá ok, čím usadené produkty amplifikácie získali podobu zrazeniny. Tekutina nachádzajúca sa v skúmavke bola odpipetovaná. K zrazenine obsahujúcej DNA bolo pridaných 250  $\mu\text{l}$  70 % etanolu. Vzorka bola opäť centrifugovaná na 13 200 otá ok po dobu 15 minút. Proces oplachovania zrazeniny 70 % etanolom bol uskutočnený 2 - krát. Supernatant nachádzajúci sa v skúmavke bol odstránený pomocou pipety. Vzniknutý sediment bol vysušený pri teplote 50 °C približne 45 minút vo vyhriatom bloku Bio TDB - 120 (Biosan). Po vysušení bolo do skúmavky pridaných 15  $\mu\text{l}$  Hi - Di formamidu, pričom došlo k rozpusteniu zrazeniny. Vzorky boli prenesené do polypropylénových stripov a denaturované 5 minút v termocykleri Thermal Cycler C1000<sup>TM</sup> (BioRad) pri teplote 95 °C. Výsledná vzorka bola ochladená na teplotu 0 °C a ďalej vyhodnocovaná za použitia kapilárnej elektroforézy.

### 5.3.5 Rozpoznávanie sekvencií pomocou kapilárnej elektroforézy

Pre sekvenáciu bol použitý genetický analyzátor ABI PRIMS 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Podmienky pre separáciu na kapilárnej elektroforéze sú uvedené v nasledujúcej tabuľke. Sekvencie markera génu *SOD1* boli spracované pomocou programu DNA Sequencing Analysis (Applied Biosystems).

Parametre separácie	
Dĺžka kapiláry	50 cm
Modul	SeqPOP6 (1 ml) E
Polymér	POP6
Virtuálny filter	E
Doba nástriku	30 sekúnd
Napätie pri nástriku	2,5 kV
Teplota pre separáciu	50 °C
Napätie pri separácii	11,3 kV
Doba separácie	120 minút

Tab. 15: Parametre separácie pomocou kapilárnej elektroforézy

## 5.4 Navrhnutie molekulárnych markerov pre detekciu vybraného polymorfizmu génu *SOD1*

### 5.4.1 Inzerčný polymorfizmus v intóne 1 génu *SOD1*

Na základe sekvenácie oblasti exónu 1 génu *SOD1* u psa bol zistený inzert o veľkosti 7 bp vyskytujúci sa u psov nesúcich mutáciu *SOD1:c.52A>T*. Tento inzert sa nachádza 53 bp za mutovanou alelou, a preto je možné ho využiť ako marker výskytu mutácie.

### 5.4.2 Detekcia sekvencií pomocou kapilárnej elektroforézy

Pre sekvenáciu bol použitý genetický analyzátor ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Parametre separácie na analyzátoch sú uvedené v kapitole 4.3.5.

### 5.4.3 Navrhnutie primerov pre amplifikáciu oblasti inzertu určenú na detekciu polymorfizmov pomocou kapilárnej elektroforézy

Pre amplifikáciu oblasti s výskytom inzertu v intróne 1 génu *SOD1* u psa boli použité primery *SOD1*-52MUTDEL F (GCWCCATCCACTTCGTGCAG) a *SOD1*-52MUTDEL R (GCGCGGTGACTCAGCACT). Keďže difúzne polymorfizmy aplikonov boli detekované na základe fragmentačnej analýzy - kapilárnou elektroforézou, bol primer *SOD1*-52MUTDEL F označený na 5' konci fluorescenčnou farbou 6FAM. Zloženie reakčnej zmesi, časový a teplotný profil PCR reakcie je uvedený v nasledujúcich tabuľkách. Amplifikácia prebiehala v termocykleri C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad).

Zložka	Koncentrácia
DNA	20 ng . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Tris - HCl	10 mM
Nonidet P40	0,08%
<i>SOD1</i> -52MUTDEL F (6FAM)	0,4 $\mu$ M
<i>SOD1</i> -52MUTDEL R	0,4 $\mu$ M
dNTP	200 $\mu$ M
DMSO	0,6 $\mu$ l . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
BSA	5 ng . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
<i>Taq</i> polymeráza (Thermo Scientific)	0,7 U . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Obejm	12,5 $\mu$ l
pH	8,8

Tab. 16: Zloženie PCR reakcie pre amplifikáciu oblasti s výskytom inzertu v intróne 1 génu *SOD1*

Fáza	Teplota	čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	96 °C	180 sec.	1
Denaturácia	96 °C	50 sec.	42
Annealing	66 °C	40 sec.	
Elongácia	72 °C	70 sec.	
Záverečná elongácia	72 °C	420 sec.	1

Tab. 17: Teplotný a časový profil PCR reakcie pre amplifikáciu oblasti s výskytom inzertu v intróne 1 génu *SOD1*

Pre detekciu difúznych polymorfizmov bol použitý genetický analyzátor ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Pred separáciou boli produkty získané amplifikáciou nariadené v pomere 1: 59 s ddH<sub>2</sub>O. K 1 µl nariadeného produktu bolo pridaných 15 µl Hi-Di formamidu (Life Technologies) a 0,2 µl veľkosťného štandardu GeneScan<sup>TM</sup> - 600 Liz Size Standard (Life Technologies). Následne bola uskutočnená denaturácia v termocykleri C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad) pri 95 °C po dobu 5 minút. Vzorky boli po denaturácii ochladené na 0°C a spracované fragmentačnou analýzou. Výsledky analýzy boli automaticky spracované v podobe chromatogramu programom GeneMapper 4.1 (Life Technologies).

U jedincov nesúcich obe dominantné alely (nemutované) v mutácii *SOD1:c.52A>T* nebol predpokladaný výskyt inzertu a produkt amplifikovaný pomocou PCR mal veľkosť 215 bp. U jedincov recesívne homozygotných v tejto mutácii vznikala ampliconová veľkosť 208 bp. U heterozygotných jedincov vznikali dva produkty veľkosti 208 a 215 bp.

## 5.5 Sekvenácia okolia oblasti exónu 1 *SOD1* génu

Nukleotidová sekvencia okolia oblasti exónu 1 *SOD1* génu u psa nie je kompletne známa, tieto oblasti sú v celosvetových genomových databázach označené písmenom N. V snahe o doplnenie tejto informácie bol sekvencovaný amplicon získaný PCR reakciou za využitia primerov publikovaných Zengom et al. (2013) 5'CTGCGGGCTGGGGTGG3' a 5'CGCGCGGTGACTCAGCACTC3'. Pre rozlíšenie tejto oblasti boli navrhnuté 2 dvojice primerov - *SOD1*predEX1 F (5'GTTTCTGGGCGTTTTAGAGC3') a *SOD1*predEX1 R (5'GGCCTTCATCTCCATGACTC3') *SOD1*zaEX1 F (5'GCACCTGTGCCCCGGCGC3') a *SOD1*zaEX1 R (5'GGTGACCGCTAACCAATTTCT3'). Pred navrhovaním primerov bola uskutočnená analýza sekvencií v okolí zatiaľ neosekvencovanej časti chromozómu 31, v ktorej



je mnou predpokladaná lokalizácia exónu 1 génu *SOD1*. Za poufítia programu Ensembl bolo zistené, že 658 párov báz lokalizovaných za neosekvenovanou oblasťou smerom k exónu 2 vykazuje 97,57 % sekvenčnú homológiu s úsekom chromozómu 25 u psa. Z týchto dôvodov bol primer *SOD1zaEx1 R* navrhnutý za túto oblasť.

Pre overenie správnosti tejto sekvencie bolo navrhnutých 6 dvojíc primerov - A, B, C, D, E, F, ktorých nukleotidové sekvencie sú uvedené v tabuľke 18. Primery E a F boli rovnako ako primer *SOD1zaEx1R* navrhnuté za oblasť chromozómu 31 vykazujúcu vysokú homológiu s chromozómom 25. Tabuľky 19, 20 a 21 uvádzajú zloženie, teplotný a časový priebeh PCR reakcie. Pre sekvenáciu bol poufítý postup popísaný v kapitole 4.3. Týmto spôsobom boli získané iasto ne sa prekrývajúce sekvencie, ktoré boli zoradené pomocou počítačového programu Bioedit Sequence Alignment Editor.

Názov	Názov primeru	Nukleotidová sekvencia primeru	Veľkosť amplikonu
A	A-SOD1-CZU-F	5'ACAGGGAAGGGCCAAGAGAAC 3'	584 bp
	A-SOD1-CZU-R	5'GCCTATAAGAGCGCGCGG 3'	
B	B-SOD1-CZU-F	5'GTTTCTGGGCGTTTTAGAGC 3'	573 bp
	B-SOD1-CZU-R	5'AGTGCTGAGTCACCGCGC 3'	
C	C-SOD1-CZU-F	5'CTCGCGAGTCATGGAGATGAAG 3'	602 bp
	C-SOD1-CZU-R	5'CTTCCTTCCGCCCGGGAG 3'	
D	D-SOD1-CZU-F	5'CCGAGGCGGGACGTTTCC 3'	454 bp
	D-SOD1-CZU-R	5'ACTCAGACCAAAAACAGGGAAGGAG 3'	
E	E-SOD1-CZU-F	5'GCAGCCCCCGGAGCTAGG 3'	375 bp
	E-SOD1-CZU-R	5'AGTGTTTCCATAGGCTTAGGATCTCC 3'	
F	F-SOD1-CZU-F	5'TCTCAGGAGTCAGAAATGAAACCAT 3'	233 bp
	F-SOD1-CZU-R	5'GTCACGGCAGTTTTCTTAAGCGATAA 3'	

Tab. 18: Nukleotidové sekvencie primerov A, B, C, D, E, F

Zložka	koncentrácia
DNA	20 ng . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
KCl	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 mM
Primer F	0,8 $\mu\text{M}$
Primer R	0,8 $\mu\text{M}$
dATP	250 M
dCTP	250 M
dTTP	250 M
dGTP	125 M
7 ó deáza-dGTP	125 M
Tris-HCl	20 mM
BSA	0,1 mg . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
<i>Pfu</i> polymeráza (Thermo Scientific)	1,0 U . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Triton X-100	0,10%
Tetramethylamonium oxalát (Top Bio)	2mM
pH	8,8

Tab. 19: Zloženie PCR reakcie pre amplifikáciu fragmentov s použitím primerov A, B, C, D, E, F

Fáza	Teplota	as	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	98 °C	120 sec.	1
Denaturácia	98 °C	30 sec.	35
Annealing	65,7 °C	60 sec.	
Elongácia	74 °C	70 sec.	
Záverečná elongácia	74 °C	600 sec.	1

Tab. 20: Teplotný a časový profil PCR reakcie pre amplifikáciu fragmentov s použitím primerov A, B, C, D

Fáza	Teplota	čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	98 °C	120 sec.	1
Denaturácia	98 °C	30 sec.	35
Annealing	63,5 °C	60 sec.	
Elongácia	74 °C	70 sec.	
Záverečná elongácia	74 °C	600 sec.	1

Tab. 21: Teplotný a časový profil PCR reakcie pre amplifikáciu fragmentov s použitím primerov E a F

**ACAGGGAAGGGCCAAGAGAAC**GCGGACTCCGCCGGCCGACCGGGGCGCGGGGCGCGG  
GGCGCGGGCCGACCCACCGAAGAAAAGGGGAGGCCGGGGCTTGTGACGCGCCGACCTCA  
CGCAGCCTCAGAACCCCCCTCCCCCCCCCAAAAAAAAAAACCATGACAAGCAATGAA  
AACGGCCGAAAGCCCCGGCTCGACGCGCCCCCATCTCCAGGAACGGAGGCGCCCGT  
CTTCGCCACGTTTCGTATACCAAGGACACTTGCAAACAAAGCGACTTAGGATATCGGAGG  
CGCGCCACGGATACCTCGCTCTCGCAATCTCGCGGACGTACGGATCGGAAGGGAAAGGC  
CGAATTTTTCCACAGTTCCAT**GTTTCTGGGCGTTTTAGAGC**CGCTGGGCGGAGGGAGCCG  
GCGCCGCGGGGCGCGAGGCTCCCCGCGCGGCCCCCGTGGTCCCGCCCCCGGCCCTCCT  
GGCCACTCACGTGCCGACGCCCCAGGGGCGCGGGCCGGATGCGCGGGGCGGCGATTGGC  
TGCGGGCTGGGGTGGGCGGGGCGCGGGCGCTCCG**GCCTATAAGAGCGCGCGG**CGCGCCCG  
CCTCGGTTTGCCTCGGCGTCTGCTGCGGCGTCCCGCTGCCCTCGGACTGCTGCAGCCGT  
CGGAGCCCGGCCCGGAGCGCGCCCGCC**CTCGCGAGTCATGGAGATGAAG**GCCGTGTGCG  
TGTTGAAGGGCCAGGGCCCGGTGGAGGGC**A**CCATCCACTTCGTGCAGAAGGCAAGGGCG  
GGGCGGAGGCCGGCGGCCGGCGGGGCGGCGCCCGCGCACCTGTGCCCCGGCGCGGC  
GTCCGGTCGGGCCTCGGGCGGTCTCGTACGCCCCGCGGGCGCCGGGTTTGCGGGTTCCG  
CGCCGCCCGAGGCCTGGACCCCGCGGGCGGGGCGGGCGGCCG**AGTGCTGAGTCACCGCGC**G  
GGCCCGGCGGGGGCGGCGGTGCGTGGCGAGGCCTGGGCGGGGGCGCGGGGAAGGCGCG  
CCGGCCCGCCCCCGCGGGTGCGGGGCGTGCGGGGGCCCGCGACGGAGGGCGAGGCCGGC  
TGCCCCGGGGG**CCGAGGCGGGACGTTTC**GCAGCGGCTGGCGGCCCTCCTTGCGGGGTC  
GCTCTGTGGGTCCCGAGGCTCCTGCGGACTCGGAGTGGCGCAGTCCCGGGCCTGGCCCGC  
CCTTGAGGTCGGGGGTGGGGGTGGGGAGTGCGGCAGGGCCACCTGGGGCCGGGCGCAGC  
CGTTACCCCGCGTCCGGG**CTTCCTTTCCGCCCGGGAG**CCCGCAGCCCGCAGCCCGTGGGC  
ACGGCCGGTCCCGCGGCGGGTGCAGC**GCAGCCCCCGGAGCTAGG**GGGGTGGCTTGTGCC  
TCGTGAGTTCAGAGGGTCCTGGGAAACCAGACTCCTGCGACCG**TCTCAGGAGTCAGAAAT**  
**GAAACCAT**CGAATCCCTGAAGTGGTGGTAATGAGTAAAAGTTTGTGTGCGCACAGCGGA  
AGGCGGTCGTGAACCGGGGAGC**ACTCAGACCAAAAACAGGGAAGGAG**GCTGGGGCGGG  
GGGAGTGAGGGGGTGGGTGGGGGCGTATATTGTCCTAAAGCGGCTTAAATGGGGGAGAA  
GGCAGGGACGGGG**GTCACGGCAGTTTTCTTAAGCGATAA**GAAATTGGTTAGCGGTCACC  
ACACCCCGGCCTTGGGAAAC**AGTGTTCCATAGGCTTAGGATCTCC**

Obr. 10: Získaná nukleotidová sekvencia u psa negatívneho v mutácii *SOD1:c.52A>T*. Báza, u ktorej dochádza k mutácii, je označená rámikom. Farebne sú vyznačené oblasti nasadenie jednotlivých primerov: A-fialá, B-modrá, C-fialová, D-zelená, E- červená, F- modrá.

## 5.6 Bioinformatické a štatistické spracovanie dát

### 5.6.1 Bioinformatické spracovanie dát

Pre vyhľadanie publikovaných sekvencií génu SDO1 boli využitú medzinárodnú nukleotidovú databázu Ensembl a NCBI (Cunningham et al., 2015). Porovnanie sekvencií a vyhľadanie polymorfizmov bolo uskutočnené pomocou programu BioEdit (Hall, 1999). Pre navrhovanie primerov bol použitý program Primer3 Input 0.4.0 (Rozen and Skaletsky, 2000). Na navrhnutie PCR-RFLP markera a vyhľadanie restričných miest bol použitý program WebCutter.

### 5.6.2 Vyhodnotenie frekvencií nemutovaných a mutovaných alel génu *SOD1* z pohľadu populačnej genetiky

Keďže obidva použité PCR-RFLP markery vykazujú kodominantný charakter, je možné v rámci hodnotenej populácie rozlíšiť recesívnych a dominantných homozygotov a heterozygotov. Tieto údaje boli vyhodnotené z hľadiska populačnej genetiky.

#### 5.6.2.1 Očakávaná heterozygotnosť - $H_E$

Tento termín je často označovaný ako génová diverzita - ide o heterozygotnosť očakávanú v populácii vzhľadom na pozorované frekvencie alel. Je možné ju vypočítať vzorcom  $H_E = 1 - \sum p_i^2$ , kde  $p_i$  je frekvencia alel typu  $i$  v lokuse (Hoglund et al., 2009).

#### 5.6.2.2 Pozorovaná heterozygotnosť - $H_O$

Pozorovanú heterozygotnosť je možné vypočítať na základe výsledkov testovaných jedincov. Pokiaľ je hodnota pozorovanej heterozygotnosti vyššia ako hodnota očakávanej heterozygotnosti, je možné usudzovať, že v populácii hodnotených jedincov nedochádza k inbreednému páreniu (Van Dyke et al., 2008). Pozorovanú heterozygotnosť je možné vypočítať podľa vzorca (Gillet et al., 2005):  $H_O = \sum_{i < j} P_{ij}$ .

#### 5.6.2.3 Stupeň inbreedingu - $F_{is}$

Chov bernského salašnického psa je v SR na Slovensku chovom riadeným, a teda dochádza k výberu chovných párov majiteľmi a následne poradcom chovu. Z tohto dôvodu je možné predpokladať, že určití jedinci sa uplatňujú v chove častejšie ako iní a hrozí riziko zvýšenia

inbreedingu populácie. Stupeň inbreedingu bol vypočítaný na základe vzorca (Dvořák et al., 2004):  $F_{it} = \frac{H_0 - H_t}{H_0}$

### 5.6.3 Simulácia dopadu úplnej selekcie proti homozygótnym jedincom nesúcim mutované alely génu *SOD1*

Keďže hodnoty získanej a očakávanej heterozygotnosti naznačujú, že testovaná populácia sa nachádza v rovnováhe podľa Hardy-Weinbergovho zákona, bola uskutočnená matematická simulácia postupného znížovania frekvencie mutovanej alely v populácii bernského salašníckeho psa. Frekvencia výskytu recesívnej alely bola znížená úplnou selekciou proti jedincom nesúcim homozygotnú kombináciu alel počas 5, 10, 15 a 20 generácií. Pre výpočet bol zvolený vzorec  $q_n = \frac{q_0}{1+nq_0}$ . Hodnota  $q_0$  sa rovná frekvencii mutovanej alely vo východiskovej populácii a hodnota  $q_n$  zodpovedá frekvencii mutovanej alely po  $n$  (5, 10, 15 a 20) generáciách úplnej selekcie.

### 5.6.4 Porovnanie genotypových a alelických frekvencií kauzálnych mutácií génu *SOD1*

Pre porovnanie frekvencií genotypu a alel u oboch študovaných mutácií medzi skupinami zvierat vytvorených na základe ich pohlavia, veku a pôvodu bolo uskutočnené pomocou neparametrického  $\chi^2$  testu (Excel).

## 6 Výsledky

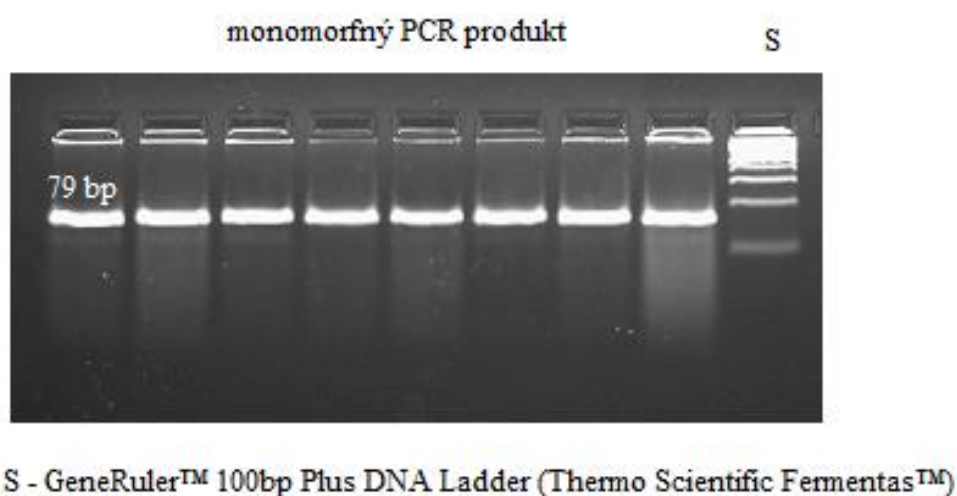
### 6.1 Hodnotenie kvality a kvantity izolovanej DNA

DNA bola získaná odberom cytologickou kefkou z bukálnej sliznice testovaného jedinca a následne izolovaná pomocou kitu NukleoSpin Tissue XS (Machery - Nagel). Keďže výrobca v návode uvádza vhodnosť tohto kitu na izoláciu DNA z buniek bukálnych slizníc, bol predpoklad získania vysokomolekulárnej DNA. V priemere bola zistená výťažnosť 41 920 ng DNA z jednej kefky čo mnohonásobne prevyšuje množstvo potrebné pre PCR reakciu. Prítomnosť kontaminantov bola overená spektrofotometricky - priemerná hodnota parametra 220/260 bola 1,86. Táto hodnota potvrdzuje vysokú čistotu získanej DNA.

### 6.2 Molekulárna analýza mutácie 118. nukleotidovej bázy génu *SOD1*

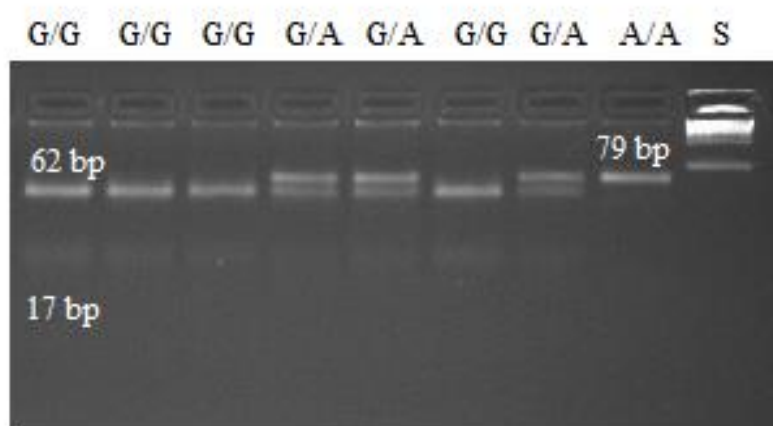
#### 6.2.1 Špecifickosť navrhnutého PCR-RFLP markera

PCR produkt určený na restriktívne štiepenie bol získaný za použitia primerov 5' AGTGGGCCTGTTGTGGTATCA 3' a 5' CTCCAAACTGATGGACGTGGAAT 3' (Awano et al., 2009). Pomocou separačnej elektroforézy bol potvrdený vznik špecifického produktu o dĺžke 79 bp. Výsledok je zobrazený na nasledujúcom obrázku. Tento produkt je monomorfný, čo znamená, že u všetkých testovaných jedincov bez ohľadu na plemeno vznikol rovnako dlhý amplikon.



Obr. 11: Elektroforeogram amplifikovaného markera génu *SOD1* pred restriktívnym štiepením

Vzniknutý PCR produkt bol štiepený restriktívnym enzýmom *Eco57I*. Potvrdila sa špecifickosť navrhnutého PCR-RFLP markera a u jedincov bez výskytu mutovanej alely vznikali 2 fragmenty o veľkosti 62 bp a 17 bp. Naopak u jedincov homozygotných z pohľadu mutovaných alel enzým amplikon neštiepil. U heterozygotov mali vzniknuté fragmenty veľkosti 79 bp, 62 bp a 17 bp. Výsledky restriktívneho štiepenia bolo možné pozorovať po separácii elektroforézou (obr. 12). Alely boli označené na základe nukleotidov, v ktorých dochádza k mutácii. Mutovaná alela bola označená písmenom A a nemutovaná alela písmenom G.



S - GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific Fermentas™)

Obr. 12: Elektroforeogram amplifikovaného markera génu *SOD1* po restriktívnom štiepení

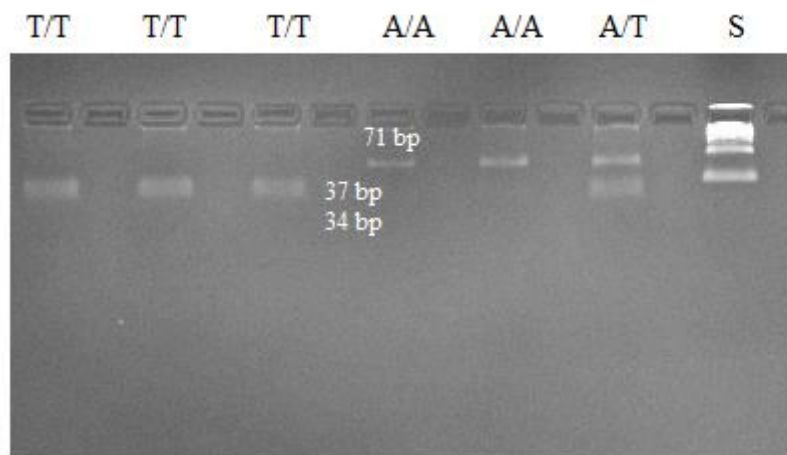
### 6.3 Molekulárna analýza mutácie 52. nukleotidovej bázy *SOD1* génu.

#### 6.3.1 Špecifickosť navrhnutého PCR-RFLP markera

Na základe štúdie publikovanej Zengom et al. (2014) boli použité vhodné primery na amplifikáciu PCR produktu v okolí mutácie 52. nukleotidovej bázy *SOD1* génu u psa. Tieto primery ohraničovali produkt o dĺžke 71 bp, ktorý bol následne štiepený restriktívnym enzýmom *BanI*. U jedincov s mutovanou alelou vznikali dva fragmenty - 34 bp a 37 bp. Odlíšenie fragmentov s rozdielom len 3 bp pomocou separačnej elektroforézy môže byť problematické (obr. 13) a preto boli navrhnuté nové primery lemujúce oblasť 180 bp. V prípade jedinca homozygotného v mutácii došlo po restriktívnom štiepení ku vzniku fragmentov dĺžky 145 bp a 35 bp, u heterozygotného jedinca vznikali fragmenty veľkosti 180 bp, 145 bp

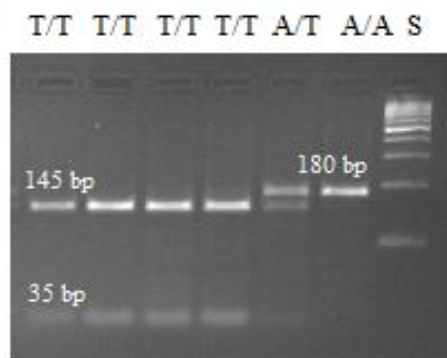


a 35 bp. U jedinca nenesúceho mutovanú alelu k roz-čepeniu ampikonu nedo-šo. Fragmenty získané restrik ným -čepením boli po separácii zvidite nené pod UV svetlom pomocou pridania ethídium bromidu. Mutovaná alela bola ozna ená písmenom T a nemutovaná alela písmenom A. Na nasledujúcom elektroforeograme sú zobrazené v-etky tri vznikajúce genotypy (obr. 14).



S - GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific Fermentas™)

Obr. 13: Elektroforeogram amplifikovaného markera génu *SOD1* po restrik nom -čepení pri použití primerov popísaných Zengom et al. (2014)



S - GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific Fermentas™)

Obr. 14: Elektroforeogram amplifikovaného markera génu *SOD1* po restrik nom -čepení pri použití novonavrhnutých primerov

#### **6.4 Výskyt mutovaných alel *SOD1* génu v populácii testovaných jedincov**

Výskyt mutácie *SOD1:c.118G>A* bol testovaný metódou PCR-RFLP u populácie 303 bernských sala-nických psov a 28 psov plemien ve ký -vaj iarsky sala-nický pes, entlebuchský sala-nický pes a appenzellský sala-nický pes patriacich do skupiny -vaj iarskych sala-nických psov. Rovnaká populácia bola testovaná na mutáciu *SOD1:c.52A>T* metódou PRC-RFLP a pomocou kapilárnej elektroforézy. Analýza sekvencie DNA pomocou kapilárnej elektroforézy bola zvolená na základe zistenia prítomnosti inzertu o ve kosti 79 bp u psov nesúcich mutovanú alelu. Získané výsledky sa u oboch metód zhodovali. Genotypy testovaných jedincov sú uvedené v nasledujúcich tabu kách.

Tab. 23: Preh ad výsledkov testovaných jedincov ó 1. as

	Plemeno	Pohlavie	Veková kategória	Krajina narodenia	Genotyp v mutácii SOD1:c.118G>A	Genotyp v mutácii SOD1:c.52A>T	Genotyp v oblasti inzertu v géne SOD1
1	BSP	F	4	CZ	G/A	A/T	208/215
2	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
3	BSP	F	3	CZ	G/A	A/T	208/215
4	BSP	F	4	CZ	G/G	A/T	208/215
5	BSP	F	4	CZ	G/G	A/T	208/215
6	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
7	BSP	F	2	SK	G/A	A/A	208/208
8	BSP	M	3	SK	G/A	A/A	208/208
9	BSP	F	3	SK	G/A	A/A	208/208
10	BSP	M	3	SK	G/G	A/A	208/208
11	BSP	M	4	SK	G/G	A/A	208/208
12	BSP	F	4	CZ	G/A	A/A	208/208
13	BSP	F	4	SK	G/A	A/T	208/215
14	BSP	M	1	SK	G/G	A/A	208/208
15	BSP	M	1	SK	G/G	A/A	208/208
16	BSP	M	1	SK	G/A	A/A	208/208
17	BSP	F	1	SK	G/G	A/A	208/208
18	BSP	F	1	SK	G/A	A/A	208/208
19	BSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
20	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
21	BSP	M	2	CZ	A/A	A/A	208/208
22	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
23	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
24	BSP	F	3	CZ	G/G	A/T	208/215
25	BSP	F	2	CZ	G/A	A/T	208/215
26	BSP	F	4	INÁ	G/G	A/T	208/215
27	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
28	BSP	F	3	CZ	G/G	A/T	208/215
29	BSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208
30	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
31	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
32	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
33	BSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
34	BSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208
35	BSP	M	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
36	BSP	M	3	CZ	G/G	A/T	208/215
37	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
38	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
39	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
40	BSP	F	2	CZ	A/A	A/A	208/208

Tab. 23: Preh ad výsledkov testovaných jedincov ó 2. as

	Plemeno	Pohlavie	Veková kategória	Krajina narodenia	Genotyp v mutácii SOD1:c.118G>A	Genotyp v mutácii SOD1:c.52A>T	Genotyp v oblasti inzertu v géne SOD1
41	BSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
42	BSP	F	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
43	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
44	BSP	M	3	CZ	G/G	A/T	215/215
45	BSP	M	2	CZ	G/A	A/T	208/215
46	BSP	F	3	SK	G/G	A/A	208/208
47	BSP	M	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
48	BSP	M	3	CZ	G/A	A/A	208/208
49	BSP	F	3	CZ	G/G	A/T	208/215
50	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
51	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
52	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
53	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
54	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
55	BSP	F	4	INÁ	G/A	A/A	208/208
56	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
57	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
58	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
59	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
60	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
61	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
62	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
63	BSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
64	BSP	F	2	INÁ	G/G	A/T	208/215
65	BSP	F	4	INÁ	G/G	A/T	208/215
66	BSP	F	2	INÁ	G/A	A/T	208/215
67	BSP	M	3	INÁ	G/A	A/A	208/208
68	BSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
69	BSP	F	3	CZ	G/G	A/T	208/215
70	BSP	F	3	CZ	A/A	A/A	208/208
71	BSP	M	2	INÁ	A/A	A/A	208/208
72	BSP	F	2	INÁ	G/G	A/T	208/215
73	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
74	BSP	M	3	CZ	G/A	A/A	208/208
75	BSP	M	2	CZ	G/G	T/T	215/215
76	BSP	F	4	CZ	G/A	A/A	208/208
77	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
78	BSP	F	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
79	BSP	F	3	CZ	A/A	A/A	208/208
80	BSP	M	3	CZ	G/A	A/T	208/215

Tab. 23: Preh ad výsledkov testovaných jedincov ó 3. as

	Plemeno	Pohlavie	Veková kategória	Krajina narodenia	Genotyp v mutácii SOD1:c.118G>A	Genotyp v mutácii SOD1:c.52A>T	Genotyp v oblasti inzertu v géne SOD1
81	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
82	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
83	BSP	M	2	INÁ	G/A	A/T	208/215
84	BSP	M	4	CZ	G/A	A/A	208/208
85	BSP	F	2	CZ	A/A	A/A	208/208
86	BSP	M	3	CZ	G/A	A/T	208/215
87	BSP	F	3	CZ	G/G	A/T	208/215
88	BSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/215
89	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
90	BSP	F	2	CZ	G/G	T/T	215/215
91	BSP	F	3	CZ	G/A	A/T	208/215
92	BSP	M	4	CZ	A/A	A/A	208/208
93	BSP	M	2	CZ	G/G	A/T	208/215
94	BSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
95	BSP	M	2	INÁ	G/G	A/A	208/208
96	BSP	M	2	CZ	G/G	A/T	215/215
97	BSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
98	BSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208
99	BSP	F	2	INÁ	G/G	A/A	208/208
100	BSP	F	3	CZ	G/G	A/T	208/215
101	BSP	M	2	CZ	G/G	A/T	208/215
102	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
103	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
104	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
105	BSP	F	2	CZ	A/A	A/A	208/208
106	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
107	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
108	BSP	M	2	CZ	G/A	A/T	208/215
109	BSP	M	3	CZ	G/G	A/T	208/215
110	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
111	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
112	BSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208
113	BSP	F	4	CZ	G/G	A/T	208/215
114	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
115	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
116	BSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
117	BSP	F	3	INÁ	G/G	A/T	208/215
118	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
119	BSP	M	2	CZ	A/A	A/A	208/208
120	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208

Tab. 23: Preh ad výsledkov testovaných jedincov ó 4. as

	Plemeno	Pohlavie	Veková kategória	Krajina narodenia	Genotyp v mutácii SOD1:c.118G>A	Genotyp v mutácii SOD1:c.52A>T	Genotyp v oblasti inzertu v géne SOD1
121	BSP	F	3	CZ	G/G	A/T	208/215
122	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
123	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
124	BSP	F	2	CZ	A/A	A/A	208/208
125	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
126	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
127	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
128	BSP	F	2	INÁ	G/A	A/T	208/215
129	BSP	M	3	INÁ	G/G	A/A	208/208
130	BSP	F	4	CZ	A/A	A/A	208/208
131	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
132	BSP	M	2	CZ	G/G	A/T	208/215
133	BSP	F	3	CZ	G/G	A/T	208/215
134	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
135	BSP	M	3	CZ	G/A	A/A	208/208
136	BSP	F	2	SK	G/G	A/T	208/215
137	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
138	BSP	M	2	CZ	G/G	A/T	208/215
139	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
140	BSP	F	4	CZ	G/A	A/A	208/208
141	BSP	M	4	CZ	G/G	A/A	208/208
142	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
143	BSP	F	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
144	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
145	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
146	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
147	BSP	F	4	CZ	G/G	A/T	208/215
148	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
149	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
150	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
151	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
152	BSP	M	1	CZ	G/G	A/A	208/208
153	BSP	F	1	CZ	G/G	A/A	208/208
154	BSP	M	1	CZ	G/A	A/A	208/208
155	BSP	M	1	CZ	G/A	A/A	208/208
156	BSP	M	1	CZ	G/G	A/A	208/208
157	BSP	F	1	CZ	G/A	A/A	208/208
158	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
159	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
160	BSP	F	4	INÁ	G/A	A/A	208/208

Tab. 23: Preh ad výsledkov testovaných jedincov ó 5. as

	Plemeno	Pohlavie	Veková kategória	Krajina narodenia	Genotyp v mutácii SOD1:c.118G>A	Genotyp v mutácii SOD1:c.52A>T	Genotyp v oblasti inzertu v géne SOD1
161	BSP	M	4	CZ	G/G	A/T	208/215
162	BSP	F	3	CZ	G/A	A/T	208/215
163	BSP	M	1	CZ	G/G	A/A	208/208
164	BSP	M	1	CZ	G/G	A/A	208/208
165	BSP	F	1	CZ	G/G	A/A	208/208
166	BSP	M	1	CZ	G/G	A/A	208/208
167	BSP	F	2	SK	A/A	A/A	208/208
168	BSP	F	2	SK	G/A	A/A	208/208
169	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
170	BSP	M	3	SK	G/G	A/A	208/208
171	BSP	M	1	CZ	G/A	A/A	208/208
172	BSP	F	1	SK	G/A	A/A	208/208
173	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
174	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
175	BSP	F	3	INÁ	G/A	A/A	208/208
176	BSP	F	4	INÁ	G/G	A/A	208/208
177	BSP	F	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
178	BSP	F	4	INÁ	G/G	A/A	208/208
179	BSP	M	4	INÁ	G/G	A/A	208/208
180	BSP	M	4	INÁ	G/G	A/A	208/208
181	BSP	F	2	INÁ	G/G	A/A	208/208
182	BSP	M	1	SK	G/A	A/A	208/208
183	BSP	M	1	SK	G/A	A/A	208/208
184	BSP	M	1	SK	A/A	A/A	208/208
185	BSP	M	1	SK	G/A	A/A	208/208
186	BSP	F	1	SK	G/A	A/A	208/208
187	BSP	M	1	SK	A/A	A/A	208/208
188	BSP	F	1	SK	G/A	A/A	208/208
189	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
190	BSP	M	4	CZ	G/G	A/A	208/208
191	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
192	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
193	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
194	BSP	F	1	SK	G/G	A/A	208/208
195	BSP	F	1	SK	G/A	A/A	208/208
196	BSP	F	3	INÁ	G/G	A/A	208/208
197	BSP	M	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
198	BSP	F	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
199	BSP	F	4	INÁ	G/G	A/A	208/208
200	BSP	F	3	INÁ	G/A	A/T	208/215

Tab. 23: Preh ad výsledkov testovaných jedincov ó 6. as

	Plemeno	Pohlavie	Veková kategória	Krajina narodenia	Genotyp v mutácii SOD1:c.118G>A	Genotyp v mutácii SOD1:c.52A>T	Genotyp v oblasti inzertu v géne SOD1
201	BSP	F	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
202	BSP	M	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
203	BSP	F	4	INÁ	A/A	A/A	208/208
204	BSP	F	3	CZ	G/A	A/T	208/215
205	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
206	BSP	M	2	CZ	G/G	A/T	208/215
207	BSP	M	3	INÁ	G/A	A/A	208/208
208	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
209	BSP	F	3	INÁ	G/A	A/A	208/208
210	BSP	M	1	CZ	G/A	A/A	208/208
211	BSP	F	1	CZ	G/A	A/A	208/208
212	BSP	M	1	CZ	G/A	A/A	208/208
213	BSP	F	1	CZ	G/A	A/A	208/208
214	BSP	F	1	CZ	A/A	A/A	208/208
215	BSP	M	4	CZ	G/G	A/A	208/208
216	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
217	BSP	F	4	CZ	G/A	A/A	208/208
218	BSP	F	3	CZ	G/G	A/T	208/215
219	BSP	M	4	CZ	G/A	A/A	208/208
220	BSP	F	3	CZ	A/A	A/A	208/208
221	BSP	F	1	CZ	G/A	A/A	208/208
222	BSP	F	4	CZ	G/A	A/A	208/208
223	BSP	M	3	CZ	G/A	A/A	208/208
224	BSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208
225	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
226	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
227	BSP	F	2	CZ	G/A	A/T	208/215
228	BSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
229	BSP	M	1	CZ	G/A	A/A	208/208
230	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
231	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
232	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
233	BSP	F	1	INÁ	G/G	A/A	208/208
234	BSP	F	1	CZ	G/G	A/T	208/215
235	BSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
236	BSP	M	3	CZ	G/A	A/T	208/215
237	BSP	M	3	CZ	G/G	T/T	215/215
238	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
239	BSP	F	1	CZ	G/G	A/A	208/208
240	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215



Tab. 23: Preh ad výsledkov testovaných jedincov ó 7. as

	Plemeno	Pohlavie	Veková kategória	Krajina narodenia	Genotyp v mutácii SOD1:c.118G>A	Genotyp v mutácii SOD1:c.52A>T	Genotyp v oblasti inzertu v géne SOD1
241	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
242	BSP	F	4	CZ	G/G	A/T	208/215
243	BSP	M	3	INÁ	G/A	A/T	208/215
244	BSP	M	2	INÁ	G/G	A/A	208/208
245	BSP	M	1	INÁ	G/G	A/A	208/208
246	BSP	M	2	CZ	G/A	A/T	208/215
247	BSP	F	4	CZ	G/A	A/A	208/208
248	BSP	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
249	BSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208
250	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
251	BSP	M	3	CZ	G/G	A/T	208/215
252	BSP	M	1	SK	G/A	A/A	208/208
253	BSP	F	3	CZ	A/A	A/A	208/208
254	BSP	M	3	CZ	G/A	A/A	208/208
255	BSP	F	4	CZ	G/A	A/A	208/208
256	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
257	BSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208
258	BSP	M	1	CZ	G/A	A/A	208/208
259	BSP	M	2	CZ	G/A	A/T	208/215
260	BSP	F	1	CZ	G/A	A/A	208/208
261	BSP	M	2	CZ	G/A	A/T	208/215
262	BSP	F	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
263	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
264	BSP	M	3	CZ	G/G	A/T	208/215
265	BSP	M	3	CZ	G/A	A/A	208/208
266	BSP	F	3	CZ	G/G	A/T	208/215
267	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
268	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
269	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
270	BSP	M	2	INÁ	G/A	A/A	208/208
271	BSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
272	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
273	BSP	F	2	CZ	G/G	A/T	208/215
274	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
275	BSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
276	BSP	F	1	CZ	G/G	A/A	208/208
277	BSP	F	1	CZ	G/A	A/T	208/215
278	BSP	F	1	CZ	G/G	A/A	208/208
279	BSP	M	1	CZ	G/G	A/A	208/208
280	BSP	M	1	CZ	G/G	A/T	208/215

Tab. 23: Preh ad výsledkov testovaných jedincov ó 8. as

	Plemeno	Pohlavie	Veková kategória	Krajina narodenia	Genotyp v mutácii SOD1:c.118G>A	Genotyp v mutácii SOD1:c.52A>T	Genotyp v oblasti inzertu v géne SOD1
281	BSP	M	1	CZ	G/A	A/A	208/208
282	BSP	M	1	CZ	G/A	A/A	208/208
283	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
284	BSP	F	2	SK	G/G	A/T	208/215
285	BSP	F	1	CZ	G/A	A/A	208/208
286	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
287	BSP	F	1	CZ	G/G	A/T	208/215
288	BSP	M	2	INÁ	G/G	A/T	208/215
289	BSP	F	4	CZ	G/A	A/T	208/215
290	BSP	M	2	CZ	G/G	A/T	208/215
291	BSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
292	BSP	M	2	CZ	G/G	T/T	215/215
293	BSP	F	2	CZ	G/A	A/T	208/215
294	BSP	F	2	CZ	G/G	T/T	215/215
295	BSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
296	BSP	F	3	SK	G/G	A/A	208/208
297	BSP	F	2	SK	G/G	A/A	208/208
298	BSP	F	3	SK	G/A	A/A	208/208
299	BSP	F	3	SK	G/A	A/A	208/208
300	BSP	M	2	SK	G/G	A/A	208/208
301	BSP	F	3	CZ	G/A	A/A	208/208
302	BSP	F	4	CZ	G/A	A/A	208/208
303	BSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208

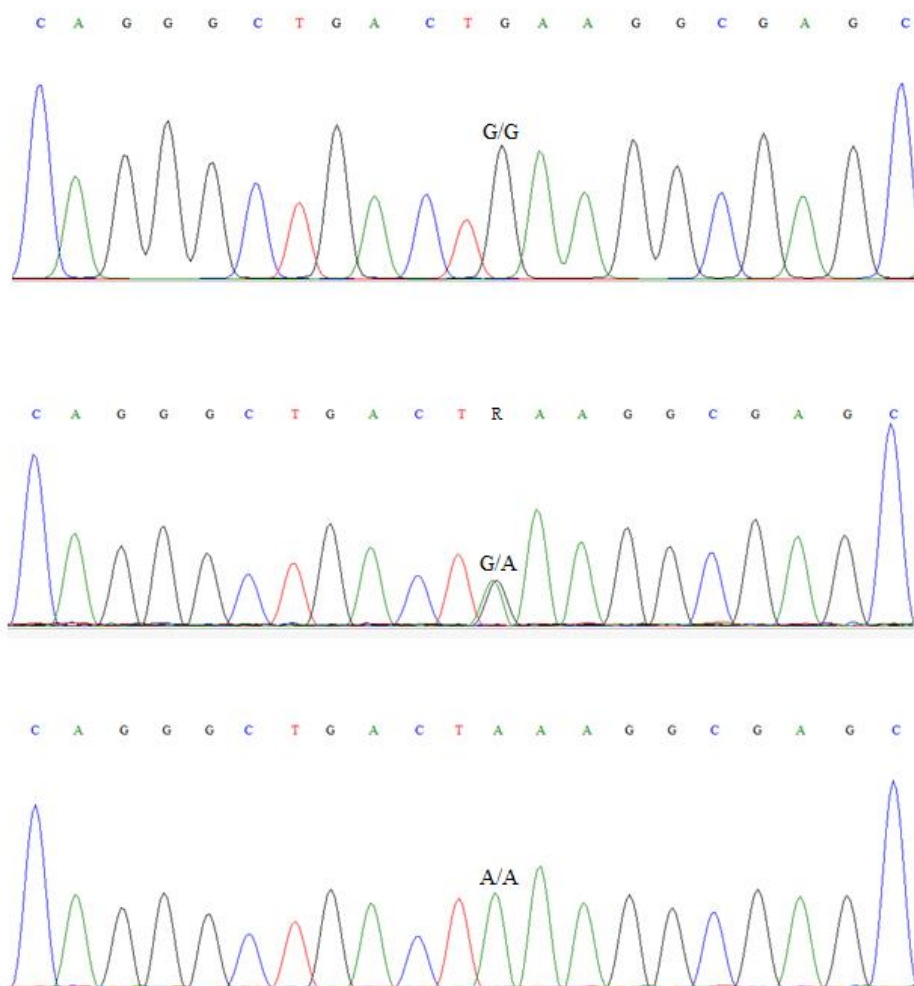
Tab. 23: Preh ad výsledkov testovaných jedincov ó 9. as

	Plemeno	Pohlavie	Veková kategória	Krajina narodenia	Genotyp v mutácii SOD1:c.118G>A	Genotyp v mutácii SOD1:c.52A>T	Genotyp v oblasti inzertu v géne SOD1
1	A	F	4	CZ	G/G	A/A	208/208
2	A	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
3	A	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
4	A	F	2	SK	G/G	A/A	208/208
5	A	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
6	A	F	2	PL	G/G	A/A	208/208
7	A	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
8	ET	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208
9	ET	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
10	ET	F	1	CZ	G/G	A/A	208/208
11	ET	M	1	CZ	G/G	A/A	208/208
12	ET	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
13	ET	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
14	ET	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
15	ET	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
16	ET	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
17	VSSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
18	VSSP	M	2	CZ	G/A	A/A	208/208
19	VSSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
20	VSSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
21	VSSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208
22	VSSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208
23	VSSP	M	3	CZ	G/G	A/A	208/208
24	VSSP	F	2	CZ	G/G	A/A	208/208
25	VSSP	F	3	CZ	G/G	A/A	208/208
26	VSSP	M	2	SK	G/G	A/A	208/208
27	VSSP	F	2	CZ	G/A	A/A	208/208
28	VSSP	M	2	CZ	G/G	A/A	208/208

## 6.5 Sekvena ná analýza exónu 1 a exónu 2 génu *SOD1*

### 6.5.1 Porovnanie sekvencií exónu 2 u vybraných zástupcov bernského sala-nického psa

V rámci modelovej populácie boli vybraní referenční jedinci na sekvenáciu. Keďže flefiadny z testovaných jedincov neprejavoval príznaky degeneratívnej myelopatie, boli jedinci zvolení na základe výsledkov PRC-RFLP. Kontrola pomocou sekvenácie bola uskutočnená u všetkých jedincov určených na základe restriktívneho štiepenia ako homozygotných v mutovanej alele. U všetkých osekvenovaných psov sa potvrdil genotyp predpokladaný po PCR-RFLP teste. Nasledujúci obrázok ukazuje úseky exónu 2 *SOD1* génu v oblasti výskytu kauzálnej mutácie *SOD1*:c.118G>A asociovanej so vznikom degeneratívnej myelopatie.



Obr. 15: Oblasť exónu 2 *SOD1* génu u bernského sala-nického psa s výskytom mutovanej alely asociovanej s degeneratívnou myelopatiou

### 6.5.2 Porovnanie aminokyselinovej sekvencie proteínu kódovaného exómom 2 *SOD1* génu u psa

Nukleotidové sekvencie získané sekvenáciou oblastí exómu 1 a 2 *SOD1* génu boli spracované programom BioEdit Version 7.0.9.0, ktorý simuloval transláciu týchto oblastí. Sekvencie aminokyselín kódovaných exómom 2 *SOD1* génu, u jedincov nesúcich homozygotnú zostavu mutovanej alebo nemutovanej alely, sú zobrazené na obrázku.

#### Genotyp G/G

```
1 GGA AGT GGG CCT GTT GTG GTA TCA GGA ACC ATT ACA 36
1 Gly Ser Gly Pro Val Val Val Ser Gly Thr Ile Thr
37 GGG CTG ACT GAA GGC GAG CAT GGA TTC CAC GTC CAT 72
13 Gly Leu Thr Glu Gly Glu His Gly Phe His Val His
73 CAG TTT GGA GAT AAT ACA CAA 93
25 Gln Phe Gly Asp Asn Thr Gln
```

#### Genotyp A/A

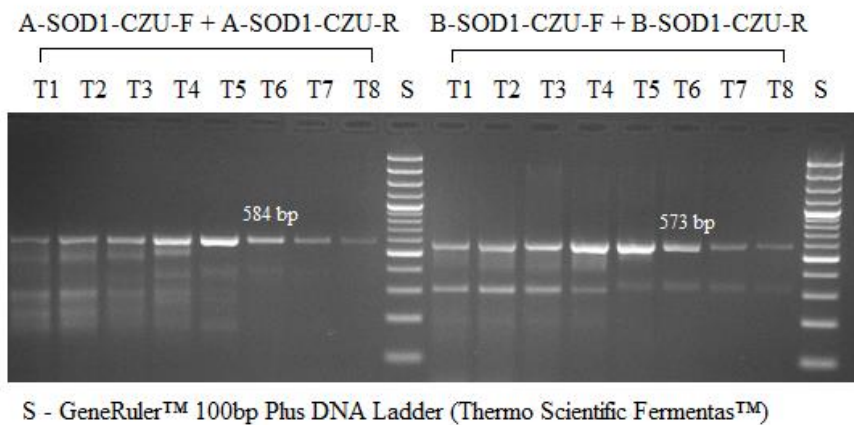
```
1 GGA AGT GGG CCT GTT GTG GTA TCA GGA ACC ATT ACA 36
1 Gly Ser Gly Pro Val Val Val Ser Gly Thr Ile Thr
37 GGG CTG ACT AAA GGC GAG CAT GGA TTC CAC GTC CAT 72
13 Gly Leu Thr Lys Gly Glu His Gly Phe His Val His
73 CAG TTT GGA GAT AAT ACA CAA 93
25 Gln Phe Gly Asp Asn Thr Gln
```

Obr 16: Poradie aminokyselín v proteíne kódovanom exómom 2 *SOD1* génu u psa

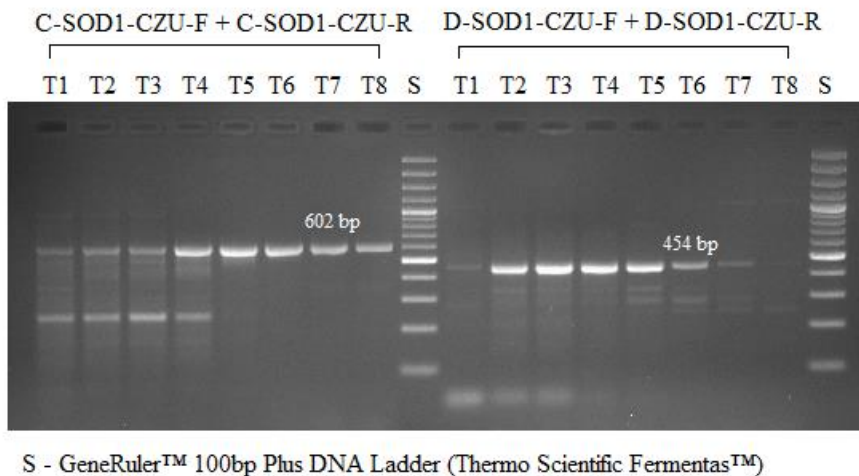
Získané poradie aminokyselín potvrdzuje zámenu aminokyselín v prípade výskytu mutovanej alely - vznik lyzínu miesto kyseliny glutámovej. Tieto výsledky sú úplne totožné s ostatnými štúdiami zameranými na genetické podmienenie degeneratívnej myelopatie (Awano et al., 2008; Zeng et al., 2014).

## 6.6 Sekvenácia oblasti okolia exónu 1 *SOD1* génu

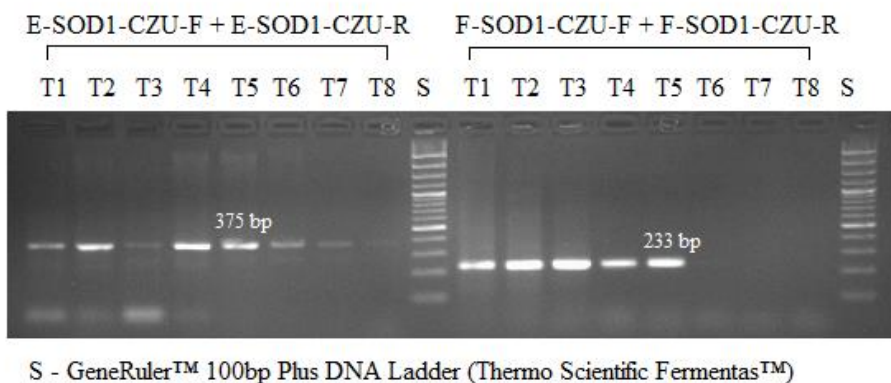
Pre amplifikáciu okolia exónu 1 *SOD1* génu bolo navrhnutých 6 primerov - A, B, C, D, E, F - ktorých nukleotidové sekvencie sú uvedené v tabu ke 18. Úspešnosť amplifikácie a veľkosť vzniknutých fragmentov bola preukázaná separačnou elektroforézou. Získané elektroforeogramy ukazujúce amplicony vzniknuté po jednotlivých kombináciách primerov sú zobrazené na nasledujúcich obrázkoch (elektroforeogramy sú výsledkom teplotného gradientu).



Obr. 17: Elektroforeogram fragmentov vznikajúcich po amplifikácii primerov A-*SOD1*-CZU-F + A-*SOD1*-CZU-R a p B-*SOD1*-CZU-F + B-*SOD1*-CZU-R



Obr. 18: Elektroforeogram fragmentov vznikajúcich po amplifikácii primerov C-*SOD1*-CZU-F + C-*SOD1*-CZU-R a p D-*SOD1*-CZU-F + D-*SOD1*-CZU-R



Obr. 19: Elektroforeogram fragmentov vznikajúcich po amplifikácii primerov A-*SOD1*-CZU-F + A-*SOD1*-CZU-R a p E-*SOD1*-CZU-F + F-*SOD1*-CZU-R

Poradie nukleotidových báz v okolí oblasti exónu 1 *SOD1* génu u psa bolo ur ené zoradením sekvencií získaných sekvenáciou amplikonov vzniknutých PCR reakciou pomocou počítačového programu Bioedit Sequence Alignment Editor. Táto oblasť bola osekvenovaná u dvoch vybraných zástupcov plemena bernský salašnícky pes. Jeden z týchto psov je považovaný za negatívneho a druhý za pozitívneho v mutácii *SOD1*:c.52A>T. Získaná sekvencia je zobrazená na obrázku 20 a 21.

ACAGGGAAGGGCCAAGAGAACGCGGACTCCGCCGGCCGGACCGGGGCGCGGGGCGCGG  
GGCGCGGGCCGACCCACCGAAGAAAAGGGGAGGCCGGGGCTTGTGACGCGCCGACCTCA  
CGCAGCCTCAGAACCCCCCTCCCCCCCCCAAAAAAAAAACCATGACAAGCAATGAA  
AACGGCCGAAAGCCCCGGCTCGACGCGCCCCCATCTCCCAGGAACGGAGGCGCCCGT  
CTTCGCCACGTTTCGTATACCAAGGACACTTGCAAACAAAGCGACTTAGGATATCGGAGG  
CGCGCCACGGATACCTCGCTCTCGCAATCTCGCGGACGTACGGATCGGAAGGGAAAGGC  
CGAATTTTTCCACAGTTCCATGTTTCTGGGCGTTTTAGAGCCGCTGGGCGGAGGGAGCCG  
GCGCCGCGGGGCGCGAGGCTCCCCGCGCGGCCCCCGTGGTCCCGCCCCCGGCCCTCCT  
GGCCACTCACGTGCCGACGCCCCAGGGGCGCGGGCCGGATGCGCGGGGCGGCGATTGGC  
TGCGGGCTGGGGTGGGCGGGGCGCGGGCGCTCCGGCCTATAAGAGCGCGCGGGCGCGCCCG  
CCTCGGTTTGCCTCGGCGTCTGCTGCGGGCGTCTCCGCTGCCCTCGGACTGCTGCAGCCGT  
CGGAGCCCGGCCGGAGCGCGCCCGCCCTCGCGAGTCATGGAGATGAAGGCCGTGTGGC  
TGTTGAAGGGCCAGGGCCCGGTGGAGGGCA|CCATCCACTTCGTGCAGAAGGCAAGGGCG  
GGGCGGAGGCCGGCGGCCGGCGGGGCGGGCGCCCGCGCACCTGTGCCCGGCGCGGC  
GTCCGGTCGGGCCTCGGGCGGTCTCGTACGCCCCGCGGGCGCCGGGTTTGCGGGTTCG  
CGCCGCCCGAGGCCTGGACCCCGCGGGGGGCGGGCGGCCGAGTGCTGAGTCACCGCGCG  
GGCCCGGCGGGGGCGGCGGTGCGTGGCGAGGCCTGGGCGGGGGCGCGGGGAAGGCGCG  
CCGGCCGCCCCCGCGGGTGCGGGGCGTGCGGGGGCCCGCGACGGAGGGCGAGGCCGGC  
TGCCCCGGGGGCGAGGCGGGACGTTTCCGCAGCGGCTGGCGGCCCTCCTTGCGGGGTC  
GCTCTGTGGGTCCCAGGCTCCTGCGGACTCGGAGTGGCGCAGTCCCGGGCCTGGCCCGC  
CCTTGAGGTCGGGGGTGGGGGTGGGGAGTGCGGCAGGGCCACCTGGGGCCGGGCGCAGC  
CGTTACCCCGCGTTCGGGGCTTCTTTCCGCCCGGGAGCCCGCAGCCCGCAGCCCGTGGGC  
ACGGCCGGTCCC CGGGCGGGTGCAGCGCAGCCCCGGAGCTAGGGGGGTGGCTTGTGCC  
TCGTGAGTTCAGAGGGTCTGGGAAACCAGACTCCTGCGACCGTCTCAGGAGTCAGAAAT  
GAAACCATCGAATCCCTGAAGTGGTGGTAATGAGTAAAAGTTTGTGTGCGCACAGCGGA  
AGGCGGTTCGTGAACCGGGGAGCACTCAGACCAAAAACAGGGAAGGAGGCTGGGGCGGG  
GGGAGTGAGGGGGTGGGTGGGGGCGTATATTGTCCTAAAGCGGCTTAAATGGGGGAGAA  
GGCAGGGACGGGGGTCACGGCAGTTTTCTTAAGCGATAAGAAATTGGTTAGCGGTCACC  
ACACCCCGGCCTTGGGAAACAGTGTTTCCATAGGCTTAGGATCTCC

Obr. 20: Získaná nukleotidová sekvencia u psa negatívneho v mutácii *SOD1:c.52A>T*. Farebne je oznaená sekvencia nukleotidov, ktorá nie je popísaná v databáze Ensembl. Alela, u ktorej dochádza k mutácii, je vyznaená rámkom. Oblasť exónu 1 *SOD1* génu je oznaená filtou farbou

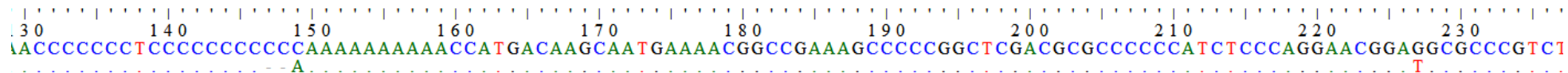


ACAGGGAAGGGCCAAGAGAACGCGGACTCCGCCGGCCGGACCGGGGCGCGGGGCGCGG  
 GGCGCGGGCCGACCCACCGAAGAAAAGGGGAGGCCGGGGCTTGTGACGCGCCGACCTCA  
 CGCAGCCTCAGAACCCCCCTCCCCCCCCAAAAAACCATGACAAGCAATGAAAA  
 CGGCCGAAAGCCCCGGCTCGACGCGCCCCCATCTCCAGGAACGGATGCGCCCGTCTT  
 CGCCACGTTCGTATCACCAAGGACACTTGCAAACAAAGCGACTTAGGATATCGGAGGCG  
 CGCCACGATACCTCGCTCTCGCAATCTCGCGGACGTACGGATCGGAAGGGAAAGGCCG  
 AATTTTTCCACAGTTCATGTTTCTGGGCGTTTTAGAGCCGCTGGGCGGAGGGAGCCGGC  
 GCCGCGGGGCGCGAGGCTCCCCGCGCGGCCCCCGTGGTCCCGCCCCCGGCCCTCCTGG  
 CCACTCACGTGCCGACGCCCCAGGGGCGCGGGCCGGATGCGCGGGCGGCGATTGGCTG  
 CGGGCTGGGGTGGGCGGGGCGCGGCGCTCCGGCCTATAAGAGCGCGCGGCGCGCCCGCC  
 TCGGTTTGCCTCGGCGTCTGCTGCGGCGTCTCCGCTGCCCTCGGACTGCTGCAGCCGTCG  
 GAGCCCGGCCCGGAGCGCGCCCGCCCTCGCGAGTCATGGAGATGAAGGCCGTGTGCGTG  
 TTGAAGGGCCAGGGCCCCGGTGGAGGGGCTCCATCCACTTCGTGCAGAAGGCAAGGGCGGG  
 GCGGAGGCCGCGCGCCGGCGGCCGGCGGGGCGGCGCCCGCGCACCTGTGCCCCGGC  
 GCGGCGTCCGGTCCGGCCTCGGGCGGTCTCGTACGCCCCCGCGGCGCCGGGTTTGGCG  
 GTTCGCGCCGCCGAGGCCTGGACCCCGCGGCGGGGCGGCGGCCGAGTGCTGAGTCACC  
 GCGCGGGCCCGCGGGGGCGGCGGTGCGTGGCGAGGCCTGGGCGGGGGCGCGGGGAAG  
 GCGCGCCGGCCGCCCGCGGGTGCGGGGCGTGCGGGGGCCCGCGACGGAGGGCGAGG  
 CCGGCTGCCCCGGGGCCGAGGCGGGACGTTTCCGCAGCGGCTGGCGGCCCTCCTTGCG  
 GGGTCGCTCTGTGGTCCCGAGGCTCCTGCGGACTCGGAGTGGCGCAGTCCCGGGCCTGG  
 CCCGCCCTTGAGGTCGGGGGTGGGGGTGGGGAGTGCGGCAGGGCCACCTGGGGCCGGGC  
 GCAGCCGTTACCCCGCGTCGGGGCTTCTTTCCGCCCGGGAGCCCGCAGCCCGCAGCCCG  
 TGGGCACGGCCGGTCCCGCGGCGGGTGCAGCGCAGCCCCGGAGCTAGGGGGGTGGCTT  
 GTGCCTCGTGAGTTCAGAGGGTCTGGGAAACCAGACTCCTGCGACCGTCTCAGGAGTCA  
 GAAATGAAACCATCGAATCCCTGAAGTGGTGGTAATGAGTAAAAGTTTGTGTGCGACA  
 GCGGAAGGCGGTCGTGAACCGGGGAGCACTCAGACCAAAAACAGGGAAGGAGGCTGGG  
 GCGGGGGGAGTGAGGGGGTGGGTGGGGGCGTATATTGTCCTAAAGCGGCTTAAATGGGG  
 GAGAAGGCAGGGACGGGGGTCACGGCAGTTTTCTTAAGCGATAAGAAATTGGTTAGCGG  
 TCACCACACCCCGGCCTTGGGAAACAGTGTTCATAGGCTTAGGATCTCC

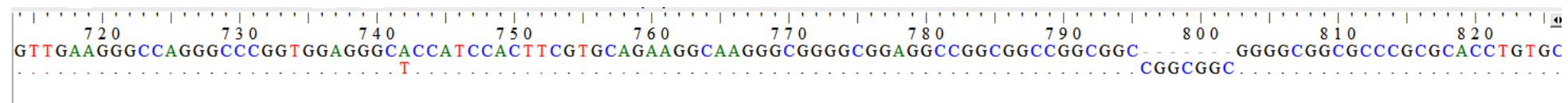
Obr. 21: Získaná nukleotidová sekvencia u psa pozitívneho v mutácii *SOD1:c.52A>T*. Farebne je oznaená sekvencia nukleotidov, ktorá nie je popísaná v databáze Ensembl. Mutovaná alela je vyznaená rámkom. Oblasť exónu 1 *SOD1* génu je oznaená fliťou farbou

Sekvencia oznaená na obrázku 22 je uvedená v celosvetovej databáze Ensembl ako vyskytujúca sa na 31. a 25. chromozóme v genome psa. Prítomnosť tejto oblasti v získanej sekvencii nebola preukázaná. Dôvodom môže byť nasadenie primerov v doteraz neznámej





Obr. 24: SNP nachádzajúce sa v novoosekvenovanej oblasti *SOD1* génu u psa



Obr. 23: Oblasť *SOD1* génu s výskytom mutácie *SOD1*:c.52A>T. Na obrázku je pozorovateľný SNP a inzerť nachádzajúci sa u psa s mutáciou

### 6.6.1 Porovnanie aminokyselinovej sekvencie proteínu kódovaného exómom 1 *SOD1* génu u psa

Rovnako ako u exónu 2 bola i u exónu 1 simulovaná translácia získanej nukleotidovej sekvencie pomocou programu BioEdit Version 7.0.9.0. Poradie aminokyselín v proteíne u jedinca bez mutovanej alely a jedinca s dvomi mutovanými alelami je zobrazený na obrázku 25.

#### Genotyp A/A

1 ATG GAG ATG AAG GCC GTG TGC GTG TTG AAG GGC CAG 36  
1 Met Glu Met Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Thr

37 GGC CCG GTG GAG GGC ACC ATC CAC TTC GTG CAG AAG 72  
13 Gly Pro Val Glu Gly Thr Ile His Phe Val Glu Lys

#### Genotyp T/T

1 ATG GAG ATG AAG GCC GTG TGC GTG TTG AAG GGC CAG 36  
1 Met Glu Met Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Thr

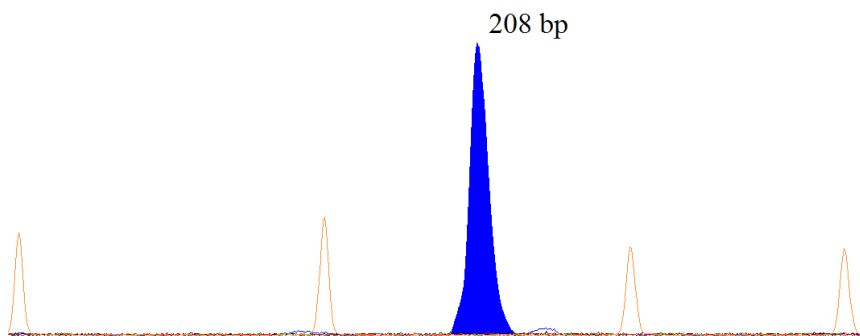
37 GGC CCG GTG GAG GGC TCC ATC CAC TTC GTG CAG AAG 72  
13 Gly Pro Val Glu Gly Ser Ile His Phe Val Glu Lys

Obr. 25: Poradie aminokyselín v proteíne kódovanom exómom 1 *SOD1* génu u psa.

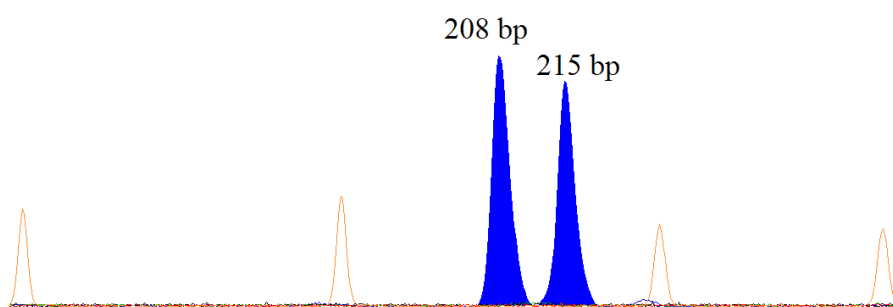
Z obrázku je zjavné, že v prípade výskytu mutácie dochádza k zámene aminokyseliny threonín za serín. Tento výsledok sa zhoduje s výsledkami publikovanými Wininger, et al.,om (2014).

### 6.7 Dĺžkový polymorfizmus navrhnutého markeru inzertu v intróne 1 génu *SOD1* stanovený kapilárnou elektroforézou

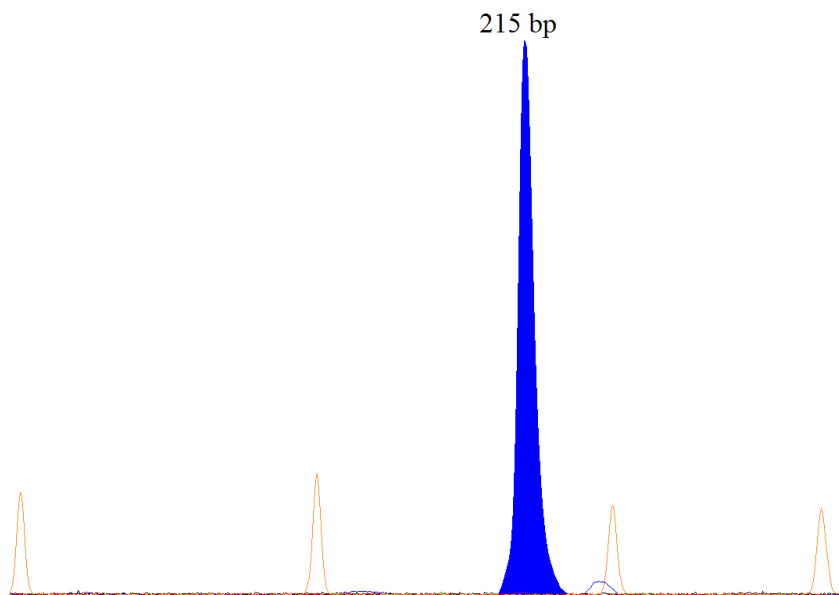
Na základe sekvenácie okolia exónu 1 génu *SOD1* bol navrhnutý marker pre detekciu inzertu v intróne 1 génu *SOD1*. Na nasledujúcich obrázkoch sú zobrazené výstupy z kapilárnej elektroforézy. Jednotlivé píky ukazujú rozdiel vo veľkosti alel navrhnutého markeru. Predpoklad, že popísaný inzert sa bude vyskytovať u jedincov s mutovanou 52. nukleotidovou bázou *SOD1* génu bol potvrdený ako správny.



Obr. 26: Výstup kapilárnej elektrofrézy pre navrhnutý marker inzertu v intróne 1 génu *SOD1*  
- alely 208/208



Obr. 27: Výstup kapilárnej elektrofrézy pre navrhnutý marker inzertu v intróne 1 génu *SOD1*  
- alely 208/215



Obr. 28: Výstup kapilárnej elektrofrézy pre navrhnutý marker inzertu v intróne 1 génu *SOD1*  
- alely 215/215

## 6.8 Frekvencie výskytu mutovaných alel génu *SOD1* v testovanej populácii psov a ich hodnotenie na základe popula nej genetiky

Na štatistické vyhodnotenie boli testovaní jedinci rozdelení do skupín podľa plemena, pohlavia (F+M), veku (1- do 1 roku, 2 - 1 a 3 roky, 3 - 3 a 6 rokov, 4 - nad 6 rokov) a krajiny pôvodu (R+SK+INÁ).

### 6.8.1 Mutácia 118. nukleotidovej bázy SOD génu

Mutované alely *SOD1* génu sa vyskytli u zástupcov viacerých plemien patriacich do skupiny vajciarskych salašníckych psov. Po etnospôsobnosti výskytu mutovanej alely je zobrazená v tabuľkách 25 a 26. Mutácia je označovaná podľa vyskytujúcej sa nukleotidovej bázy - A, nemutovaná báza - G.

Plemeno	Genotyp	Skutočná početnosť výskytu	Frekvencia výskytu
BSP	G/G	156	0,51485
	G/A	129	0,42574
	A/A	18	0,05941
VSSP	G/G	25	0,89286
ET	G/A	3	0,10714
AP	A/A	0	0,00000

Tab. 25: Skutočná početnosť a relatívne frekvencie výskytu mutácie *SOD1*:c.118G>A

Plemeno	Alela	Charakter dedičnosti	Frekvencia výskytu
BSP	G	Dominantný	0,72772
	A	Recesívny	0,27228
VSSP	G	Dominantný	0,94643
ET, AP	A	Recesívny	0,05357

Tab. 26: Alelické frekvencie markeru génu *SOD1*

Na základe genotypových a alelických frekvencií boli vypočítané hodnoty heterozygótnosti testovanej populácie. U populácie bernského salašníckeho psa bola pozorovaná heterozygotnosť rovnajúca sa 0,42574 a očakávaná heterozygotnosť bola na základe Hardy-Weinbergovho zákona 0,39628. U ostatných plemien skupiny vajciarskych salašníckych

psov bola pozorovaná heterozygotnosť 0,10714 a očakávaná heterozygotnosť bola 0,39628. Rozdiely medzi očakávanou a pozorovanou heterozygotnosťou sú v rámci oboch skúmaných populácií veľmi malé, a preto je možné tieto populácie považovať za rovnovážne podľa Hardy-Weinbergovho zákona.

Získané hodnoty heterozygotnosti sú bližšie k výpočtu stupňa inbreedingu ( $F_{is}$ ), ktorý pre tento marker u BSP má hodnotu 0,07434. Na základe veľmi nízkej hodnoty  $F_{is}$  je možné usúdiť, že modelová populácia nie je inbreedná.

### 6.8.2 Mutácia 52. nukleotidovej bázy *SOD1* génu

Mutácia 52. nukleotidovej bázy génu *SOD1* u psa bola testovaná na rovnakej populácii – vajciarskych salašníckych psov ako mutácia 118. nukleotidovej bázy *SOD1* génu. Mutovaná alela bola detekovaná len u plemena bernský salašícky pes, čo sa zhoduje s predpokladom, že skúmaná mutácia je typická len pre toto plemeno (Zeng et al., 2014). Mutácia je typu SNP, a preto je vyznačená priamo nukleotidovou bázou, ktorá sa v genotypoch nachádza. U nemutovanej alely je to A, u mutovanej T. Po etnospisovom výskytu mutovanej alely je zobrazená v tabuľkách 27 a 28.

Plemeno	Genotyp	Skutočný počet výskytu	Frekvencia výskytu
BSP	A/A	223	0,73597
	A/T	75	0,24752
	T/T	5	0,01650
VSSP	A/A	28	1,00000
ET	A/T	0	0,00000
AP	T/T	0	0,00000

Tab. 27: Skutočný počet etnosti a relatívne frekvencie výskytu mutácie *SOD1:c.52A>T*

Plemeno	Alela	Charakter dedičnosti	Frekvencia výskytu
BSP	A	Dominantný	0,85974
	T	Recesívny	0,14026
VSSP	A	Dominantný	1,00000
ET, AP	T	Recesívny	0,00000

Tab. 28: Alelické frekvencie markeru génu *SOD1*

Genotypové a alelické percentuálne frekvencie boli použité na výpočet hodnôt heterozygotnosti. U plemena bernský salašnícky pes sa pozorovaná heterozygotnosť rovnala 0,24752 a očakávaná heterozygotnosť bola 0,24118. Vzhľadom na veľmi malý rozdiel medzi očakávanou a pozorovanou heterozygotnosťou je možné usudzovať, že táto populácia je podľa Hardy-Weinbergovho zákona v rovnováhe.

Z hodnôt heterozygotnosti bol vypočítaný stupeň inbreedingu v rámci testovaného markeru, ktorý dosiahol hodnotu 0,02631. Takto nízka hodnota znamená, že testovaná populácia nie je inbreedna.

### 6.8.3 <sup>TM</sup> Statistické vyhodnotenie rozdielov medzi vytvorenými skupinami

<sup>TM</sup> Statistické vyhodnotenie rozdielov bolo uskutočnené pomocou stanovenia pravdepodobnosti zhody očakávaných a pozorovaných percentuálnych frekvencií jednotlivých genotypov a alel medzi celou testovanou populáciou (CP) a vytvorenými skupinami a u skupín medzi sebou.

Skupina	Genotypy	Alely
	Pravdepodobnosť zhody (p)	
CP x F	0,99966	0,99821
CP x M	0,99908	0,99707
F x M	0,99768	0,99527

Tab. 29: Výsledky p u parametra výskytu mutácie *SOD1:c.118G>A* u skupín podľa pohlavia

Skupina	Genotypy	Alely
	Pravdepodobnosť zhody (p)	
CP x CR	0,99766	0,96801
CP x SK	0,96857	0,86406
CP x INÁ	0,98081	0,93815
CR x SK	0,95104	0,82902
CR x INÁ	0,96579	0,90425
SK x INÁ	0,98685	0,92801

Tab. 30: Výsledky p u parametra výskytu mutácie *SOD1:c.118G>A* u skupín podľa pôvodu



Skupina	Genotypy	Alely
	Pravdepodobnos zhody (p)	
CP x 1	0,97629	0,90299
CP x 2	0,99702	0,95812
CP x 3	0,99574	0,95014
CP x 4	0,97015	0,89635
1 x 2	0,98769	0,94750
1 x 3	0,95601	0,86104
1 x 4	0,89653	0,81083
2 x 3	0,98630	0,91065
2 x 4	0,95217	0,85848
3 x 4	0,98066	0,94405

Tab. 31: Výsledky p u parametra výskytu mutácie *SOD1*:c.118G>A u skupín pod a veku

Skupina	Genotypy	Alely
	Pravdepodobnos zhody (p)	
CP x F	0,99817	0,99230
CP x M	0,99511	0,98741
F x M	0,98372	0,97990

Tab. 32: Výsledky p u parametra výskytu mutácie *SOD1*:c.52A>T u skupín pod a pohlavia

Skupina	Genotypy	Alely
	Pravdepodobnos zhody (p)	
CP x CR	0,99750	0,96138
CP x SK	0,92482	0,78484
CP x INÁ	0,99164	0,96494
CR x SK	0,90575	0,75902
CR x INÁ	0,98704	0,92975
SK x INÁ	Nie je možné stanovi	0,70255

Tab. 33: Výsledky p u parametra výskytu mutácie *SOD1*:c.52A>T u skupín pod a pôvodu

Skupina	Genotypy	Alely
	Pravdepodobnosť zhody (p)	
CP x 1	0,91719	0,77459
CP x 2	0,97973	0,89304
CP x 3	0,99686	0,97763
CP x 4	0,98967	0,93569
1 x 2	Nie je možné stanoviť	0,46016
1 x 3	Nie je možné stanoviť	0,58108
1 x 4	Nie je možné stanoviť	0,71810
2 x 3	0,98894	0,92448
2 x 4	0,96289	0,84803
3 x 4	0,98651	0,91579

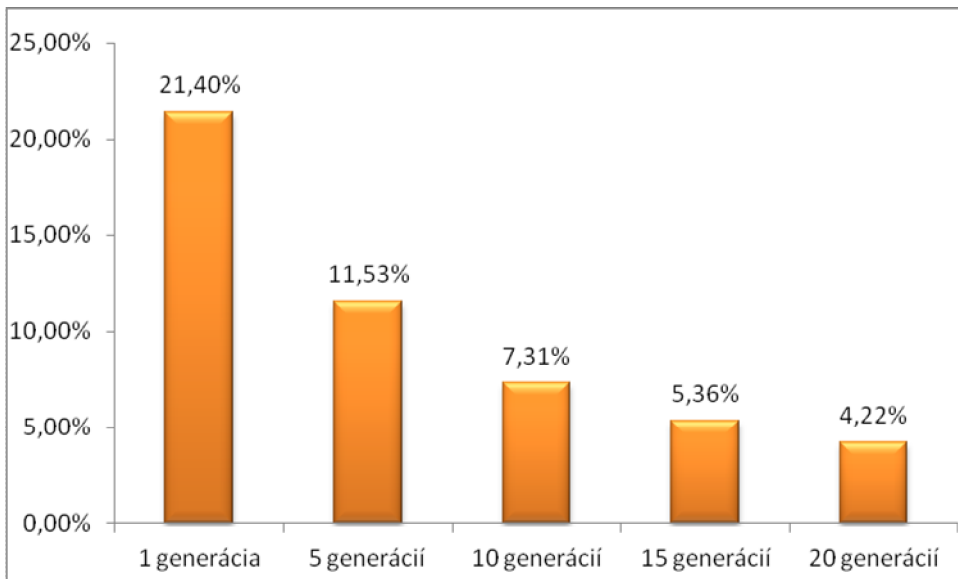
Tab. 34: Výsledky p u parametra výskytu mutácie *SOD1:c.52A>T* u skupín pod a veku

Z tabuliek 29 - 34 vyplýva, že medzi porovnávanými skupinami nie je žiadny štatisticky priekazný rozdiel. Vysvetlením môže byť fakt, že tieto mutácie sú asociované so vznikom degeneratívnej myelopatie, ktorá sa prejavuje až vo vyššom veku psa a z toho dôvodu nefunguje prirodzená selekcia týchto jedincov. I napriek možnosti testovať výskyt kauzálnych mutácií génu *SOD1* nie je tento test zaradený ako kritérium pre uchovanie bernského salašníckeho psa nikde na svete, takže v chove neexistuje ani výraznejšia umelá selekcia.

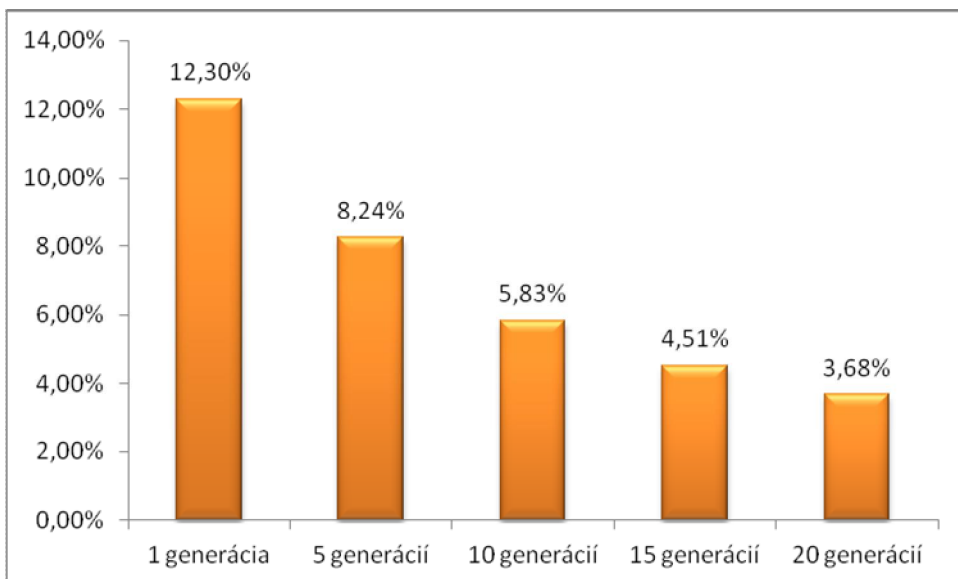
#### 6.8.4 Frekvencie výskytu mutovaných alel génu *SOD1* v testovanej populácii psov pri vedení úplnej selekcie proti mutovanej alele

Stanovy klubu švajčiarskych salašníckych psov v SR a na Slovensku nestanovujú ako jednu z podmienok pre uchovanie jedinca test na mutácie génu *SOD1* asociované s výskytom degeneratívnej myelopatie, takže výskyt tohto ochorenia nie je regulovaný. Preto bola navrhnutá modelová situácia popisujúca frekvenciu výskytu mutovanej alely v populácii bernského salašníckeho psa v prípade vedenia úplnej selekcie proti mutovanej alele počas 5, 10, 15 a 20 generácií. Graf 1 popisuje úplnú selekciu proti recesívnym homozygótom v mutácii *SOD1:c.118G>A* a graf 2 ukazuje vplyv úplnej selekcie proti recesívnym heterozygótom v mutácii *SOD1:c.52A>T*. Z grafu 1 je zjavné, že už po 1 generácii úplnej selekcie proti mutovanej alele by sa jej výskyt znížil na 21,4 % zo súčasných 27,22 %. Graf 2

ukazuje možné zníženie výskytu mutovanej alely ufl po 5 generáciách na 8,24% zo sú asných 14,02 %.



Graf 1: Dopad úplnej selekcie proti recesívnym homozygótom v mutácii *SOD1:c.118G>A* na výskyt mutovanej alely v populácii bernského sala-nického psa.



Graf 2: Dopad úplnej selekcie proti recesívnym homozygótom v mutácii *SOD1:c.52A>T* na výskyt mutovanej alely v populácii bernského sala-nického psa.

## 7 Diskusia

### 7.1 Voľba modelového plemena

Degeneratívna myelopatia bola prvýkrát popísaná v roku 1973 u nemeckého ovčáka (Averill et al., 1973), no v súčasnosti je známa u širokej škály plemien. Presný spôsob účinného mechanizmu tohto ochorenia nie je známy a jediným potvrdeným faktorom je kauzálna mutácia 118. nukleotidovej bázy génu *SOD1*. Wininger, et al. (2011) popísal mutáciu 52. nukleotidovej bázy *SOD1* génu charakteristickú len pre plemeno bernský salašnícky pes. Pre veľký záujem zo strany Slovenského klubu výcvikových salašnických psov a českého klubu výcvikových salašnických psov o problematiku výskytu degeneratívnej myelopatie v chove som si zvolila ako modelové plemeno práve bernského salašnického psa. Výber plemena tak rozšíril modelové plemená (česko-slovenský vlčák, rodézsky ridgeback) testované na výskyt mutácií génu *SOD1* na katedre genetiky českej zemědělské univerzity v Prahe. Zaradenie plemena bernský salašnický pes do výskumu génu *SOD1* považujem za významné práve z dôvodu teoretickej možnosti kumulácie dvoch kauzálnych mutácií génu *SOD1*. Získané výsledky genetických testov na DM umožnia majiteľom zostaviť vhodné príparovacie plány, a tým obmedziť výskyt mutovanej alely v chove.

### 7.2 Izolácia DNA a hodnotenie jej kvality a kvantity

Izolácia DNA je úvodným krokom väčšiny genetických štúdií. Najobvyklejším zdrojom je krv alebo bunky bukalných slizníc (Milne et al., 2006). Bunky z bukalných slizníc pri správnych podmienkach odolávajú rastu baktérií a rozpadu nukleových kyselín, preto je možné považovať ich za stabilné celé týždne až mesiace (Harty et al., 2000).

Vzorky DNA určené na spracovanie v rámci mojej diplomovej práce boli odobraté z bukalných slizníc jedincov za použitia cytologických kefiek. Tento spôsob je relatívne jednoduchý, bezbolestný (Milne et al., 2006) a psy tak nie sú vystavené stresovej situácii. Na rozdiel od odberu krvi ide o neinvazívnu metódu, ktorú môžu uskutočniť samotní majitelia psov a nie je potrebná prítomnosť veterinára. Odber DNA z bukalných slizníc je považovaný za spoľahlivý spôsob a je popísaný v množstve štúdií zaoberajúcich sa genotypom psa (Houf et al., 2008; Imesa et al., 2012; Mealey et al., 2005).

Metódy izolácie DNA sú v posledných rokoch považované za rutinné techniky, a preto množstvo uznávaných autorov nepopisuje zdroj ani spôsob izolácie DNA (Green et al., 2002; Wininger et al., 2001). Awano, et al. (2008) zaoberajúci sa problematikou *SOD1* génu uvádza, že DNA použitá v jeho štúdií pochádza zo zbierok izolovanej DNA. S množstvom dostupných kitov na extrakciu a čistenie DNA je možné tento spôsob získavania DNA považovať za najpoužívanejší (Wolfgramm et al., 2009). Výhodou využitia komerčného kitu je absolútna stabilita podmienok a rýchlosti izolácie.

Vo svojej diplomovej práci som DNA izolovala podľa popisu uvedeného výrobcou NukleoSpin Tissue XS (Machery - Nagel). Použitie tohto kitu nebolo popísané v ľadnej dostupnej štúdií týkajúcej sa detekcie mutácií *SOD1* génu u psa. Autori venujúci sa problematike genomu psa využili iné komerčné kity pracujúce obdobným spôsobom - napr. QIAamp® Tissue Kit (QIAGEN) (Pfeiffer et al., 2004) alebo IsoQuick extraction kit (Orca Research Inc.) (Vilá et al., 2003).

Z priemernej výkonnosti a parametrov istoty je možné usúdiť, že získaná DNA bola vysoko kvalitná, a teda platí predpoklad, že izolácia DNA pomocou komerčného kitu je považovaná za vhodný spôsob získania DNA adekvátnej kvality a kvantity pre PCR reakciu krátkych a stredne dlhých DNA fragmentov (King et al., 2002).

## **7.3 Detekcia kauzálnych mutácií *SOD1* génu u plemena bernský salašnícky pes**

### **7.3.1 Metóda PCR - RFLP**

Vznik degeneratívnej myelopatie je bernského salašníckeho psa asociovaný s dvomi kauzálnymi mutáciami. Awano, et al. (2008) vo svojej štúdií popísal mutáciu *SOD1:c.118G>A* spôsobujúcu tvorbu lyzínu miesto kyseliny glutámovej. Wininger, et al. (2011) popísal druhú substitučnú mutáciu - zámenu 52. nukleotidovej bázy tymínu za adenín, a tým zámenu aminokyseliny lyzín za threonín. Na detekciu oboch mutácií bola zvolená metóda PCR-RFLP.

Na amplifikáciu oblasti s výskytom mutácie 118. nukleotidovej bázy bola zvolená dvojica primerov navrhnutá Awanom, et al. (2008). Získaný amplicon má veľkosť 79 bp. Poznatok, že v prípade výskytu mutovanej bázy dôjde k zániku rozpoznávacej sekvencie pre enzým *Eco57I*. bol kúrovo pri vo be restrikné enzýmu. Predpoklad vhodnosti *Eco57I* od

spolnosti Fermentas sa potvrdil a v prípade jedinca s nemutovanými alelami bol PCR produkt roztiepený na dva fragmenty o dĺžke 62 bp a 17 bp. Vzhľadom na malú veľkosť získaných fragmentov, bol pre fragmentačnú analýzu použitý 5 % agarózový gél. V R a na Slovensku je možné testovať mutáciu *SOD1:c.118G>A* i v komerčných laboratóriách Laboklin (<http://www.laboklin.cz/>) alebo Slovgen (<http://www.slovgen.sk/>). Keďže ide o komerčné pracoviská nie je známa metóda detekcie mutácie.

Primery na amplifikáciu oblasti s výskytom mutácie 52. nukleotidovej bázy boli zvolené na základe práce Distribúcia *SOD1* alel pôvodne asociovanými s degeneratívnou myelopatiou u psa publikovanej v roku 2014 tímom vedcov na čele s Zengom, pričom získaný fragment mal veľkosť 71 bp. Tieto primery boli pravdepodobne navrhnuté tak, aby obidva nasadali do exónu 1 génu *SOD1*. Vzhľadom na to, že celková dĺžka exónu 1 *SOD1* génu je 72 bp, existovali značné limity pre navrhnutie týchto primerov. Fragment o tejto veľkosti nie je možné považovať za optimálny na restriktívne štiepenie. Zeng, et al. (2014) vo svojej pilotnej práci využil pre detekciu mutácie úplne inú stratégiu. Vyššie uvedené primery použil v technike RT-PCR, kde veľkosť ampliconov nepredstavovala tak zásadný problém ako u metódy restriktívneho štiepenia, ktoré som si zvolila ja. Exón 1 je náročne amplifikovateľný z hľadiska vyššieho zastúpenia G-C párov báz. Tento problém som vyriešila pridaním DMSO a Enhanceru TMA oxalát (Top Bio) do reakčnej zmesi. Pre zvýšenie účinnosti denaturácie templátovej DNA som použila iníciačnú denaturačnú teplotu 97,0 °C a v jednotlivých cykloch PCR bola templátová DNA denaturovaná pri 96,0 °C. Táto teplota je o 2 °C vyššia než optimálna denaturačná teplota doporučená výrobcom enzýmu (Thermo Scientific Fermentas<sup>®</sup>). Experimentálne sa potvrdilo, že i takéto zvýšenie nespôsobovalo inhibíciu amplifikačnej reakcie. Pri štandardnej denaturačnej teplote 94 °C amplifikácia neprebiehala. Príčinou je pravdepodobne to, že vysoké zastúpenie G-C párov báz sa nachádza rovnako v intóne oddeľujúcom exón 1 a exón 2 a v 5' upstream oblasti. Tento predpoklad bol potvrdený kompletným osekvenovaním okolia exónu 1 génu *SOD1*. Pomocou programu Webcutter 2.0 bol vybraný vhodný restriktívny enzým *BanI*. Správnosť výberu sa potvrdila vznikom dvoch fragmentov o dĺžke 34 bp a 37 bp u jedincov s obidvomi alelami postihnutými mutáciou. Pre oddelenie takto krátkych produktov restriktívneho štiepenia bolo potrebné použiť 6% agarózový gél, ktorý vzhľadom na rýchlosť polymerizácie je dosť náročne pripraviť. Ani použitie takto koncentrovaného gélu neumožnilo kvalitné oddelenie fragmentov veľkosti 37 bp a 34 bp. Tento výsledok je jasne dokumentovaný na obrázku 13. Pre lepšiu rozlíšiteľnosť fragmentov boli navrhnuté nové primery (tcggtttgcgtcggcgtct a

ccccgcccttgcccttctg) lemujúce produkt o ve kosti 180 bp, ktorý bol pomocou restrikingu rozdelený na dva fragmenty o ve kosti 145 bp a 35 bp. Pre fragmentačnú analýzu bol použitý 6 % agarózový gel. Pre amplifikáciu tohto nového PCR-RFLP markera bolo potrebné použiť zvýšenie denaturačnej teploty rovnako ako u primerov publikovaných Zengom et al. (2012).

Výsledky restrikingu oboch testovaných mutácií potvrdzujú hypotézu, že popísané bodové mutácie vedú ku vzniku alebo zániku sekvencií dôležitých pre rozpoznanie restrikingovým enzýmom.

Výsledky detekcie oboch mutácií boli oznámené majiteľom testovaných psov a z dôvodu maximálnej objektivity získaných výsledkov boli PCR amplikony heterozygotov a homozygotov nesúcich mutáciu sekvenované.

### 7.3.2 Metóda Sangerovej sekvenácie

Na overenie genotypu jedincov, u ktorých sa na elektroforeograme ukázal predpoklad na výskyt mutovanej alely, bola zvolená metóda sekvenácie.

Keďže produkt získaný s využitím primerov zvolených na PCR-RFLP u mutácie *SOD1:c.118G>A* bol príliš krátky na priamu sekvenáciu, boli použité nové primery. Vzhľadom na predpoklad vysokej homológie v *SOD1* géne u psov jednotlivých plemien som zvolila primery, ktoré navrhla Dujková (2013) amplifikujúce fragment o ve kosti 79 bp. Tento predpoklad sa ukázal správny a potvrdil výskyt identickej mutácie v 2. exóne *SOD1* génu u bernského salašnického psa, ako popisujú vo svojich odborných prácach Awano et al. (2008) a Green et al. (2002) a ktorá je asociovaná s degeneratívnou myelopatiou.

Rovnakým spôsobom bola pomocou Sangerovej sekvenácie preukázaná prítomnosť mutácie *SOD1:c.52A>T*. Táto analýza tiež potvrdila, že výsledky restrikingu plne korepondovali so sekvenčnými polymorfizmami, ktoré popísal Wininger et al. (2011). Sekvenčná analýza mutácie *SOD1:c.52A>T* viedla k zisteniu, že na začiatku intrónu oddeľujúceho exón 1 a exón 2 je u všetkých jedincov nesúcich mutovanú alelu prítomný inzert 7 bp. Táto skutočnosť sa stala základnou hypotézou, že je možné navrhnúť marker detekujúci tento inzert, ktorý vykazuje 100 % koreláciu s výskytom kauzálnej mutácie. Sekvenčná analýza mutácie *SOD1:c.52A>T*.

Na základe štúdií (Shelton et al., 2012; Awano et al., 2008, Wininger et al., 2011) je možné predpokladať, že u bernského salašnického psa obe tieto mutácie budú viesť ku zmene poradia aminokyselín v polypeptidovom reťazci (lyzín namiesto glutámovej kyseliny a serínu miesto threonínu) rovnako ako u iných popísaných plemien.

#### **7.4 Detekcia dĺžkového polymorfizmu v oblasti intrónu 1 *SOD1* génu**

Pri sekvenácii okolia exónu 1 génu *SOD1* bol zistený výskyt dĺžkového polymorfizmu v oblasti intrónu 1. Tento polymorfizmus sa vyskytol u jedinca postihnutého mutáciou 52. nukleotidovej bázy v oboch alelách génu. Preto bol vyslovený predpoklad súvislosti mutácie *SOD1*:c. 52A>T a prítomnosti inzertu. Z tohto dôvodu som sa rozhodla navrhnúť vhodný marker, ktorý by odhalil dĺžkový polymorfizmus v tomto úseku génu *SOD1* u bernského salašnického psa.

Pri navrhovaní vhodných primerov pre amplifikáciu daného úseku bola zistená prítomnosť vysokého počtu G-C párov báz, preto som si zvolila rovnaký metodický postup, aký použili Ito et al. (2004) a Niimi et al. (2001) pri štúdiu dopamínového receptora DRD4. Tento postup umožnil úspešnú amplifikáciu požadovaného fragmentu o veľkosti 208 bp alebo 215 bp, podľa prítomnosti či neprítomnosti inzertu. Všetky vzorky boli resekvenované pomocou kapilárnej elektroforézy. Fragment o veľkosti 215 bp sa vyskytoval u jedincov s prítomnosťou mutovanej alely 52. nukleotidovej bázy. Získané výsledky sa teda absolútne zhodovali s genotypmi určenými pomocou metódy PCR-RFLP, čo potvrdilo hypotézu súvislosti prítomnosti mutácie *SOD1*:c. 52A>T a inzertu 7 bp v 1. intróne génu *SOD1*. Výsledky testu tohto markeru plne korešpondovali s hodnotením prítomnosti mutovanej alely pomocou PCR-RFLP markeru. Bola tak potvrdená hypotéza, že všetci jedinci u ktorých je na 1 chromozóme prítomná mutovaná alela *SOD1*:c.52A>T nesú súčasne i spomenutý inzerť 7 bp v intróne 1. Tento výsledok podľa môjho názoru potvrdzuje i pilotné experimenty Greena et al. (2002), ktorý identifikoval jednotlivé exóny génu *SOD1*. Úplná korelácia medzi výskytom mutovanej alely a prítomnosti inzertu je podľa môjho názoru výsledkom toho, že pri správne fungujúcom crossing-overu a meióze nedochádza k rekombinácii v rámci exónových a intrónových častí jedného génu. To znamená, že nie je možné predpokladať, že by vznik gamety nesúcej pôvodnú nemutovanú sekvenciu exónu 1 a inzerciu v intróne 1 alebo naopak bol spôsobený crossing-overom. Výsledky získané pri riešení diplomovej práce túto teóriu plne potvrdzujú.



## 7.5 Sekvenácia okolia exónu 1 génu *SOD1*

V roku 2004 bola prvýkrát publikovaná sekvencia genomu psa (Mellersh, 2002). V súčasnosti je známe usporiadanie nukleotidových báz približne 99 % celkového psieho genomu. Neznáme oblasti sú v svetových genomových databázach, ako je Ensembl, označované písmenom N. Gén *SOD1* je u psa lokalizovaný na 31. chromozóme (Breen et al., 2001). Keďže nukleotidová sekvencia exónu 1 *SOD1* génu, ktorú popisuje Green et al. (2002), nebola v databáze Ensembl lokalizovaná, bol vyslovený predpoklad, že exón 1 a časť intrónu 1 *SOD1* génu sa nachádza v zatiaľ neosekvenovanej časti genomu pred exónom 2.

Pre overenie tohto predpokladu boli navrhnuté 2 dvojice primerov. Primer *SOD1*predEX1 F bol navrhnutý pred neznámou oblasťou, primery *SOD1*predEX1 R a *SOD1*zaEX1 F boli navrhnuté do exónu 1. Na základe analýzy sekvencií pri srovnávaní oblastí bola zistená 97,57 % homológia úseku 658 bp pred exónom 2 na 31. chromozóme s úsekom umiestneným na 25. chromozóme. Pre zabezpečenie špecifickosti bol primer *SOD1*zaEX1 R navrhnutý ďalej za túto oblasť. Pre sekvenáciu boli zvolení dvaja jedinci plemena bernský salašnícky pes, jeden z nich považovaný za pozitívneho a druhý za negatívneho v mutácii *SOD1*:c. 52A>T. Pre overenie tejto sekvencie boli navrhnuté kombinácie primerov A, B, C, D, E a F, ktorých nukleotidové sekvencie sú zaznamenané v tabuľke 18. Uskutočnená amplifikácia potvrdzuje hypotézu, že Pfu termostabilné polymerázy sú schopné amplifikovať úsek DNA s vysokým zastúpením G-C párov báz.

V prípade použitia primerov A, B, C, D bola veľkosť amplikonu odhadnutá na základe elektroforézy (obr. 17 a 18) v plnej súlade s veľkosťami amplikonov predpokladaných pri navrhovaní primerov. Tento predpoklad bol jednoznačne potvrdený i vlastným sekvenovaním PCR produktov. Na druhej strane amplikony pri použití primerov E a F vykazovali približne o 700 bp menšiu veľkosť oproti predpokladu (obr. 19). I tento výsledok bol potvrdený vlastnou sekvenáciou. Pomocou vyhľadávacej funkcie databázy Ensembl bolo potvrdené, že získaným amplikomom chýba približne 660 bp, ktoré v databáze Ensembl nasledujú bezprostredne za neosekvenovanou (N) oblasťou chromozómu 31. Táto oblasť dosahovala vysokú homológiu s úsekom 25. chromozómu. Je možné, že navrhnuté primery teoreticky nemuseli byť dostatočne špecifické a prisadali do neznámej časti génu, a teda ešte pred túto oblasť. Táto teória by znamenala, že sekvencie pre nasadenie reverzných E a F primerov sa vyskytujú ešte v jednej kópii bližšie k exónu 1. Domnievam sa, že pravdepodobnosť výskytu dvoch vysoko komplementárnych sekvencií k navrhnutým primerom je veľmi nízka. Tomuto

vysvetleniu nasveduje i zná špecifikácia pri amplifikácii, ktorá je zjavná z obrázku 19. Pri amplifikácii sekvenovaných produktov bolo zámerne poufíté PCR predlfovanie 150 sekúnd. Táto doba by teoreticky umofla amplifikáciu výrazne vä ťch produktov nefl 375 bp i 233 bp. Z obrázku 19 je jasné, ťe takého podmienky amplifikácie nevedli ku vzniku nešpecifických fragmentov. O vysokej špecifickosti vzniku 375 bp i 233 bp produktov sved í i výborná kvalita ich sekvenácie. Vysokú špecifickos ť nasadenia reverzových primerov podporuje i to, ťe pri kombinácii týchto primerov s forwardovými primerami A, B a D vznikali amplikony, ktoré boli tiefl kratšie pribliťne o 700 bp oproti o akávaniu. Pomocou primerov E a F boli hodnotené i alšie plemená, na ktoré diplomová práca nie je zameraná. Ilo o 5 zástupcov plemien rodzsky ridgeback, eskoslovenský vl iak, border teriér a labradorský retriever. U v-etkých testovaných plemien boli získané amplikony rovnakej ve kosti (375 bp i 233 bp) ako u bernského sala-nického psa.

Sekvencia génu *SOD1* uvedená v databáze Ensembl a NCBI vychádza z medzinárodného projektu sekvenácie psieho genomu realizovaného u feny boxera (Lindblad-Toh et al., 2005). Je teoreticky moťné, ťe pri zostavovaní tejto prvotnej celogenomickej sekvencie psa mohlo dôjs k nepresnostiam pri prepojovaní jednotlivých fragmentov alebo je moťné sa prikloni k teórii, ťe 700 bp uvedených v sekvencii boxera (Lindblad-Toh et al., 2005) bola sekvencia, ktorá bola charakteristická iba pre konkrétneho jedinca. Zaujímavým zistením je, ťe táto sekvencia je vysoko homológna s oblas ou chromozómu 25. Nie je moťné teoreticky vylú i , ťe u sekvenovanej feny boxera (Lindblad-Toh et al., 2005) mohlo dôjs k duplikácii asti 25. chromozómu napríklad z dôvodu aktivity retroelementov (Schmidt et al., 2012).

Výsledná sekvencia poskladaná pomocou programu Bioedit Sequence Alignment Editor na základe iasto ne sa prekrývajúcich fragmentov potvrdila predpoklad výskytu exónu 1 génu *SOD1* v tejto oblasti, rovnako sa jeho nukleotidová ťruktúra zhodovala s tým, o uvádza Green et al. (2002). U jedinca považovaného za pozitívneho v mutácii *SOD1*:c. 52A>T sa tento predpoklad potvrdil.

Medzi sekvenciami získanými od testovaných jedincov bolo pozorovaných nieko ko polymorfizmov. U jedinca nesúceho ufl popisovanú mutáciu 52. nukleotidovej bázy (Wininger et al., 2011) sa vyskytol inzert 7 bp v oblasti intrónu 1 génu *SOD1*. U jedinca bez mutovanej alely bol úsek nukleotidov CGGCGGC zopakovaný dvakrát, zatia o u jedinca s mutovanou alelou bol zopakovaný trikrát. Je moťné predpoklada , ťe tento inzert vznikol v minulosti chybou polymerázy pri replikácii bunky a bol prená-aný na potomstvo spolu s

mutáciou. Na základe predpokladu súvislosti medzi inzertom a mutáciou *SOD1*:c. 52A>T bol navrhnutý metodický postup na detekciu dĺžkového polymorfizmu pomocou kapilárnej elektroforézy, ktorý je diskutovaný v predloženej časti kapitoly. Resekvenácia testovanej populácie jednoznačne nepotvrdila existenciu predpokladanej súvislosti. Inzert je lokalizovaný v oblasti intrónu 1 génu *SOD1* a nezasahuje teda priamo do poradia aminokyselín vo vznikajúcom proteíne, ale môže mať vplyv na zostrih (splicing) (Su et al., 2012) alebo reguláciu expzie génu *SOD1*. Pre potvrdenie alebo vyvrátenie tejto teórie by bolo potrebné uskutočniť ďalšie precíznych analýz vychádzajúcich zo sekvencie cDNA u psov postihnutých degeneratívnou myelopatiou. U rovnakého jedinca boli tiež popísané dva SNP - záměna 149. nukleotidovej bázy od začiatku sekvenovanej oblasti cytozín za adenín, a 227. nukleotidovej bázy od začiatku sekvenovanej oblasti, guanín za tymín. Táto oblasť nie je priamou súčasťou génu, a preto je možné predpokladať, že na vznik a funkciu proteínu nemá vplyv.

## **7.6 Analýza kauzálnych mutácií génu *SOD1* asociovaných s degeneratívnou myelopatiou z hľadiska populačnej genetiky**

### **7.6.1 Variabilita a frekvencia alel génu *SOD1* u plemien skupiny ťvaj iarskych salaŕníckych psov**

Ako už bolo uvedené, vznik degeneratívnej myelopatie je u psa asociovaný s dvomi kauzálnymi mutáciami *SOD1* génu. U plemien, kde ochorenie bolo diagnostikované, sa autori zhodujú na prítomnosti mutácie 118. nukleotidovej bázy nachádzajúcej sa v 2. exóne (Awano et al., 2008; Green et al., 2002). V roku 2011 uviedol Wininger et al. prípadovú ťtúdiu fený bernského salaŕníckeho psa s prejavom DM bez postihnutia mutáciou *SOD1*:c. 118G>A. Táto ťtúdia popísala inú kauzálnu mutáciu - *SOD1*:c. 52A>T, ktorá je rovnako spájaná so vznikom DM. V súčasnej dobe je prítomnosť tejto mutácie potvrdená len u plemena bernský salaŕnícky pes.

V rámci diplomovej práce som hodnotila populáciu 303 bernských salaŕníckych psov a 28 psov iných plemien patriacich do skupiny ťvaj iarskych salaŕníckych psov.

#### Mutácia *SOD1*:c. 118G>A

Molekulárne analýzy oblasti génu s výskytom mutácie *SOD1*:c. 118G>A odhalili v rámci testovanej populácie BSP 129 heterozygótov a 18 homozygótov v mutovanej alele. 42,57 %

testovanej populácie teda tvorili prenášači (G/A) a 5,94 % jedinci nesúci obe mutované alely. Z výsledkov analýzy je možné uviesť, že frekvencia výskytu mutovanej alely v populácii je 27,22 %. Rozsiahla štúdia urobená Zengom et al. (2014) popisuje rozloženie alel *SOD1* génu súvisiacich s výskytom DM u skupiny 2 413 psov. Zastúpenie heterozygótov v tejto skupine bolo 46,08 % a recesívnych homozygótov 14,91 %. Celková frekvencia výskytu alely v tejto populácii dosiahla 38 %. Keďže Zeng et al. uskutočnil svoj výskum na univerzite Missouri v Columbii v USA, je možné predpokladať, že ním testovaná populácia je zložená väčšinou zo psov pochádzajúcich z USA, zatiaľ čo mnou skúmaná populácia je zložená prevažne z jedincov pôvodom zo Slovenskej alebo Českej republiky. Výsledky oboch štúdií ukázali približne rovnaký počet heterozygótov ale štúdia Zenga et al. uvádza až o 8,97 % viac jedincov homozygótnych v mutovanej alele. Rozdiel vo výsledkoch jednotlivých štúdií môže byť spôsobený oddelením týchto populácií a malou početnosťou importu zvierat z USA do ČR, či z ČR do USA. Dôvodom vyššej frekvencie mutovanej alely v populácii z USA môžu byť aj vo nejšie podmienky chovu a častejší výskyt príbuzenskej plemenitby v chove BSP v USA.

V skupine ostatných plemien radených medzi vývojárske salašnícke psy bolo zistených 25 jedincov genotypu G/G a 3 jedinci nesúci mutovanú alelu v heterozygótnej forme. Jedinec homozygótny pre mutovanú alelu (A/A) nebol zistený. Predpokladám, že v prípade uskutočnenia štúdie s väčším množstvom testovaných psov týchto plemien by sa vzhľadom na prítomnosť recesívnej alely v populácii takýto jedinec vyskytol.

#### Mutácia *SOD1*:c. 52A>T

Génová analýza výskytu mutácie *SOD1*:c. 52A>T v modelovej populácii plemena bernský salašnícky pes zistila prítomnosť 223 jedincov bez mutovanej alely, 75 jedincov nesúcich jednu mutovanú a jednu nemutovanú alelu a 5 jedincov nesúcich obe mutované alely. Percentuálne zastúpenie heterozygótov v testovanej skupine bolo 24,75 % a recesívnych homozygótov 1,65 %. Z týchto hodnôt bola vypočítaná frekvencia výskytu mutovanej alely - 14,02 %. Zeng et al. (2014) v rámci svojej štúdie testoval psy aj na mutáciu 52. nukleotidovej bázy *SOD1*. Ide o 912 jedincov plemena BSP z populácie v USA totožných s jedincami uvedenými v predchádzajúcej kapitole. 59 psov bolo heterozygótnych a 2 jedince, vrátane feny publikovanej Winingerom et al. (2011), boli recesívne homozygótné. Frekvencia mutovanej alely v tejto populácii dosahuje 3,5 %. Výrazne vyšší počet heterozygótov a homozygótov v mutovanej alele v mnou testovanej populácii je možné odôvodniť týmto

existenciou spoločného predka medzi týmito jedincami. Je teda vysoko pravdepodobné, že niektorý v minulosti často využívaný krycí pes bol nositeľom homozygotnej varianty mutácie *SOD1:c. 52A>T*.

U zástupcov ostatných plemien patriacich do skupiny –vaj iarskych sala–níckych psov nebol zaznamenaný výskyt mutovanej alely. Zeng et al. (2014) nepotvrdil výskyt mutovanej alely v skupine 701 psov 56 rôznych plemien (okrem BSP). Tieto štúdie potvrdzujú hypotézu, že mutácia *SOD1:c. 52A>T* je charakteristická pre plemeno bernský sala–nícky pes.

Preto u plemien skupiny –vaj iarskych sala–níckych psov (okrem BSP) nebola uskutočnená štatistická ani populačná analýza pre riziko vzniku chyby vyplývajúcej z nereprezentatívnosti výberového súboru o malej početnosti zástupcov ostatných plemien. Preto je možné vysloviť hypotézu, že mutácia *SOD1:c. 52A>T* vznikla až po oddelení plemena bernský sala–nícky pes od ostatných plemien psov patriacich do skupiny –vaj iarskych sala–níckych psov. Naopak mutácia *SOD1:c. 118G>A* sa vyskytuje u širokej škály plemien (Coates et al., 2010). Pri riešení diplomovej práce sa potvrdilo, že mutované alely boli prítomné u viacerých plemien psov radených do skupiny –vaj iarskych sala–níckych psov. Je teda možné predpokladať, že mutácia *SOD1:c. 118G>A* je z evolučného hľadiska staršia než mutácia *SOD1:c. 52A>T*.

Bol vyslovený predpoklad, že degeneratívna myelopatia by sa mohla prejavovať u jedincov heterozygotných v oboch kauzálnych mutáciách v prípade, že sa postihnuté alely nachádzajú na rôznych chromozómoch. Takúto situáciu popisuje i Zeng et al. (2014) u 4 psov s prejavom príznakov typických pre DM.

### **7.6.2 Hodnotenie frekvencie výskytu mutovaných alel génu *SOD1* v testovanej populácii psov pri vedení úplnej selekcie proti mutovanej alele**

V diplomovej práci bola navrhnutá modelová situácia ukazujúca pokles frekvencie výskytu mutovaných alel *SOD1* génu v prípade vedenia prísnej selekcie proti týmto alelám. Z grafov 1 a 2 uvedených vo výsledkoch tejto práce je zrejme výrazný pokles frekvencie výskytu mutovanej alely v prípade, že by selekcia prebiehala po dobu 20 generácií. U mutácie *SOD1:c. 118G>A* by výskyt mutovanej alely poklesol o 23 % a u mutácie *SOD1:c. 52A>T* o 10,34 %. Pre možnosť úspešnej selekcie by sa genetický test na tieto mutácie musel stať povinnou súčasťou vyšetrení pri uchovnení zvierat.

## 8 Záver

V úvode tejto diplomovej práce boli navrhnuté vedecké hypotézy, ktoré boli touto prácou potvrdené a je možné ich považovať za platné.

Získané výsledky možno zhrnúť do nasledujúcich bodov:

- Za úspešnej spolupráce s Klubom švajčiarskych salašnických psov na Slovensku a v Rakúsku bolo pre štúdium kauzálnych mutácií *SOD1* génu asociovaných s degeneratívnou myelopatiou získaných 303 vzoriek DNA od zástupcov plemena bernský salašnický pes a 28 vzoriek DNA od zástupcov ostatných plemien patriacich do skupiny švajčiarskych salašnických psov.
- Na základe informácií z odborných publikácií bol navrhnutý metodický postup PCR-RFLP na detekciu markera mutácie 118. nukleotidovej bázy *SOD1* génu. Špecifickosť tohto markera bola overená pomocou sekvenácie. Vyuffitie dvojice primerov navrhnutých Awanom et al. (2008) a restrikčného enzýmu *Eco57I* sa ukázalo ako správne.
- Sekvenácia vybraných jedincov potvrdila výskyt mutácie *SOD1*:c. 118G>A u plemena bernský salašnický pes rovnako ako aj u ostatných testovaných plemien.
- Na základe štúdie publikovanej Winingerom et al. (2011) bol navrhnutý metodický postup PCR-RFLP na detekciu mutácie 52. nukleotidovej bázy nachádzajúcej sa v 1. exóne *SOD1* génu. Správnosť tohto markera bola overená sekvenáciou.
- Údaje získané sekvenáciou oblastí v okolí mutácií *SOD1*:c. 118G>A a *SOD1*:c. 52A>T boli spracované pomocou počítačového programu simulujúceho ich transláciu. Poradie aminokyselín v simulovanom peptidovom reťazci potvrdilo, že obe mutácie majú vplyv na štruktúru, a teda i na funkciu vzniknutého proteínu.
- Testovaní jedinci boli rozdelení do skupín na základe pohlavia, krajiny pôvodu a veku. Získané frekvencie jednotlivých genotypov a alel nepreukázali žiadne štatisticky významné rozdiely medzi skupinami.
- Za pomoci termostabilnej polymerázy bola osekvenovaná oblasť okolia exónu 1 génu *SOD1*, ktorej sekvencia nie je uvedená v medzinárodnej genomovej databáze

Ensembl. V získanej nukleotidovej sekvencii bol zistený výskyt inzertu v oblasti intrónu 1 *SOD1* génu, a preto bol navrhnutý nový metodický postup na detekciu tohto inzertu pomocou kapilárnej elektroforézy.

- Výsledky získané v tejto diplomovej práci boli oznámené majiteľom testovaných zvierat.

Táto diplomová práca oboznámila majiteľov psov plemena bernský salašnický pes s ochorením degeneratívna myelopatia a jeho genetickým podmienením. Po spracovaní vzoriek DNA záujemcov o túto problematiku výrazne vzrástol a množstvo z nich súhlasilo so zverejnením výsledku i napriek tomu, že kluby švajčiarskych salašnických psov v SR a na Slovensku nestanovujú test na mutácie *SOD1* génu ako podmienku pre uchovanie psa. Údaje a grafy uvedené v kapitole výsledky poukazujú na možnosť, ako relatívne rýchlo znížiť výskyt mutovanej alely. Zo strany majiteľov je preto zvýšená snaha o výber vhodných párov, a tým o obmedzenie výskytu degeneratívnej myelopatie v chove.

## 9 Zoznam citovanej literatúry

- Ackerman, L. J. 2001. The Genetic Connection: A Guide to Health Problems in Purebred Dogs. American Animal Hosp Assoc. Colorado. USA. p. 329. ISBN: 1583261575.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A. 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. Joint Bone Spine. 74 (4). p.3246329.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy bunenej biológie. Espero Publishing. Ústí nad Labem. p.1503. ISBN: 80-902906-2-0.
- Averill, D. R., 1973. Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. J Am Vet Med Assoc. 162 (12). p.1045-1051.
- Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. C., Taylor, J. F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P. A., Olby, N. J., Shelton, G. D., Khan, S., O'Brien, D. P., Lindblad-Toh, K., Coates, J. R. 2009. Genome-wide association analysis reveals a *SOD1* mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. PNAS. 106 (8). p. 2794 - 2799.
- Baker, P. G., Brass, A. 1998. Recent developments in biological sequence databases. Curr. Opin. Biotechnol. 9 (1). p. 54-58.
- Bartlett, J. M. S., Stirling, D. 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. Methods in Molecular Biology. 226. p. 3-6.
- Biancoa, A. M., Marcuzzia, A., Zanina, V., Girardellia, M., Vucha, J., Crovella, S. 2013. Database tools in genetic diseases research. Genomics. 101 (2). p. 75-85.
- Birney, E., Andrews, D., Caccamo, M., Chen, Y., Clark, J. E., L., Coates, G., Cox, T., Cunningham, F., Curwen, V., Cutts, T., Down, T., Durbin, R., Fernandez-Suarez, X. M., Flicek, P., Graf, S., Hammond, M., Herrero, J., Howe, K., Iyer, V., Jekosch, K., Kahari, A., Kasprzyk, A., Keefe, D., Kokocinski, F., Kulesha, E., London, D., Longden, I., Melsopp, C., Meidl, P., Overduin, B., Parker, A., Proctor, G., Prlic, A., Rae, M., Rios, D., Redmond, S., Schuster, M., Sealy, I., Searle, S., Severin, J., Slater, G., Smedley, D., Smith, J., Stabenau, A., Stalker, J., Trevanion, S., Ureta-Vidal, A., Vogel, J., White, S., Woodwark, C., Hubbard, T. J. 2006. Ensembl 2006. Nucleic Acids Res. 34. p. 5566561.



Breen, M., Jouquand, S., Renier, C., Mellersh, C. S., Hitte, C., Holmes, N. G., Cheron, A., Suter, N., Vignaux, F., Bristow, A. E., Priat, C., McCann, E., Andre, C., Boundy, S., Gitsham, P., Thomas, R., Bridge, W. L., Spriggs, H. F., Ryder, E. J., Curson, A., Sampson, J., Ostrander, E. A., Binns, M. M., Galibert, F. 2001. Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiationhybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. *Genome Res.* 11. p. 178461795.

Case, L. P. 2013. *The Dog: Its Behavior, Nutrition, and Health.* John Wiley & Sons. USA. p. 497. ISBN: 1118701232.

Clark , R. D. 2014. *Medical, Genetic & Behavioral Risk Factors of Bernese Mountain Dogs.* Xlibris Corporation. Bloomington. p. 24. ISBA: 1499043066.

Coates , J. R., Wininger , F. A. 2010. Canine degenerative myelopathy. *Vet clin Small Anim.* 40 (5). p. 929-950.

Crapo, J. D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J. W., Chang, L. Y. 1992. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (21). p. 10405610409.

Crispin, S. M. 2009. *Notes on Veterinary Ophthalmology.* John Wiley & Sons. USA. p.384. ISBN: 1405145447.

Cunningham, F., Amode, M. R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P. Coates , G., Fitzgerald, S., Gil, L., Girón, C. G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S. E., Janacek, S. H., Johnson, N., Juettemann, T., Kähäri, A. K., Keenan, S., Martin, F. J., Maurel, T., McLaren, W., Murphy, D. N., Nag, R., Overduin, B., Parker, A., Patricio, M., Perry, E., Pignatelli, M., Riat, H. S., Sheppard, D., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Wilder, S. P., Zadissa, A., Aken, B. L., Birney, A., Harrow, J., Kinsella, R., Muffato, M., Ruffier, M., Searle, S. M. J., Spudich, G., Trevanion, S. J., Yates, A., Zerbino, D. R., Flicek, P. 2015. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Research.* 43. p. 662-669.

Davies, K. J. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J Biol Chem.* Vol. 262. p. 989569901.

DeLahunta , A., Glass, E. 2009. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology.* 3.th edition. Elsevier Health Sciences. St. Luis. Missouri. p. 600. ISBN: 0721667066.

- Delidow, B. C., Lynch, J. P., Peluso, J. J., White, B. A. 1993. Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular Biology*. 15. p. 1-29.
- Deng, H. X., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W. Y., Getzoff, E. D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R. P. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*. 261 (5124). p. 1047-1051.
- Erlich, H. A. 1989. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology*. 9 (6). p. 437-447.
- Filippis, I., McKee, M. L. 2012. *Molecular Typing in Bacterial Infections*. Springer Science & Business Media. New York. USA. p. 484. ISBN: 1627031855.
- Gottipati, S. 2008. *Modulation of Manganese Superoxide Dismutase Activity by 17-beta Estradiol*. ProQuest. USA. p. 65. ISBN: 1109019327.
- Green , S. L., Tolwani, R. J., Varma, S., Quignon, P., Galibert, F., Cork, L. C. 2002. Structure, Chromosomal Location, and Analysis of the Canine Cu/Zn Superoxide Dismutase (*SOD1*). *Gene. J Hered.* 93 (2). p. 119-124.
- Greenlund, L. J. S., Deckwerth, T. L., Johnson, E. M. 1995. Superoxide dismutase delay neuronal apoptosis: A role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*. 14 (2). p. 303-315.
- G nter, B. 2001. *Bernský sala-nický pes*. Timy Partners. Bratislava. p. 125. ISBN: 8080650179.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41. 95-98.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186. p. 1685.
- Hample, P., Ludington, M., Kling, K., Grandin, T., LaDuke, W., Hillman, J., Gaitskill, M., Trachtenberg, P. 2007. *The Nature of Dogs*. Simon and Schuster. New York. p. 168. ISBN: 1416542876.

- Harper, L. 2004. Bernese Mountain Dog. Kennel Club Books. New Jersey. p. 160. ISBN: 1593782896.
- Harty, L. C., Garcia-Closas, M., Rothman, N., Reid, Y. A., Tucker, M. A., Hartge, P. 2000. Collection of buccal cell DNA using treated cards. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9. p. 5016506.
- Hsu, J. L., Visner, G. A., Burr, I. A., Nick, H. S. 1992. Rat copper/zinc superoxide dismutase gene: isolation, characterization, and species comparison. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 186. p. 9366943.
- Hui, K. M., Bidwell, J. L. 1993. Handbook of HLA Typing Techniques. CRC Press. p. 432. ISBN: 0849305586.
- Chen, B. Y., Janes, H. W. 2002. PCR Cloning Protocols. Springer Science & Business Media. New York. USA. p.460. ISBN: 1592591779.
- Cheng, L., Davidson, D. D., Zhang, D. Y., Parks, J. A. 2010. Molecular Genetic Pathology. Springer Science & Business Media. New York. USA. p. 800. ISBN: 1597454052.
- Imesa, D. L., Wictumb, E. J., Allard, M. W., Sacks, B. N. 2012. Identification of single nucleotide polymorphisms within the mtDNA genome of the domestic dog to discriminate individuals with common HVI haplotypes. *Forensic Science International: Genetics.* 6 (5). p. 6306639.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. T. 1995. PCR Strategies. Academic Press. San Diego. California. p. 373. ISBN: 0080538541.
- Ito, H., Nara H., Murayama, M. I., Shimada, M. K., Koshimura, A., Ueda, Y., Kitawa, H., Takeuchi, Y., Mori, Y., Murayama, Y., Morita, M., Iwasaki, T., Ôta K., Tanabe, Y., Ito, S. 2004. Allele frequency Distribution of the Canine Dopamine Receptor D4 Gene Exon III and I in 23 Breeds. *Journal of Veterinary Medical Science.* 66 (7). p. 815 ó 820.
- Kathmann, I., Cizinauskas, S., Doherr, M. G., Steffen, F., Jaggy, A. 2006. Daily controlled physiotherapy increases survival time in dogs with suspected degenerative myelopathy . *Journal of veterinary internal medicine.* 20 (4). p. 927-932.

Kersey, P. J., Lawson, D., Birney, E., Derwent, P. S., Haimel, M., Herrero, J., Keenan, S., Kerhornou, A., Koscielny, G., Kahari, A., Kinsella, R. J., Kulesha, E., Maheswari, U., Megy, K., Nuhn, M., Proctor, G., Staines, D., Valentin, F., Vilella, A. J., Yates, A. 2010. Ensembl Genomes: extending Ensembl across the taxonomic space. *Nucleic Acids Res.* 38. p. 5636-569.

King, I. B., Satia-Abouta, J., Thornquist, M. D., Bigler, J., Patterson, R. E., Kristal, A. R., Shattuck, A. L., Potter, J. D., White, E. 2002. Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 11. p.113061133.

Kumar, A., Garg, N. 2005. *Genetic Engineering*. Nova Publishers. New York. USA. p. 207. ISBN: 9781594547539.

Leonard, D. G. B. 2007. *Molecular Pathology in Clinical Practice*. Springer Science & Business Media. New York. USA. p. 600. ISBN: 0387332278.

Levanon, D., Lieman-Hurwitz, J., Dafni, N., Wigderson, M., Sherman, L., Bernstein, Y., Laver-Rudich, Z., Danciger, E., Stein, O., Groner, Y. 1985. Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBO J.* 4 (1). p. 77684.

Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., deJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, Ch.-W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, Ch., Kim, L., Koepfli, K.-P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M. J., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C., Lander, E. S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature.* 438 (8). 803-819.

Maloy, S., Hughes, K. 2013. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 2nd Edition. Elsevier Science & Technology Books. USA. p. 4368. ISBN: 0123749840.

Matthews, N. S., DeLahunta, A., 1985. Degenerative myelopathy in an adult miniature poodle. *Journal of American veterinary medical association.* 186 (11). p. 1213-1215.

- McCord, J. M., Fridovich, I. 1969 Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244 (22). p. 6049-6055.
- Mealey, K. L., Munyard, K. A., Bentjen, S. A. 2005. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Veterinary Parasitology.* 131 (3-4). p. 193-196.
- Mellersh, C. 2008. Give a dog a genome. *The Veterinary Journal.* 178 (1). p. 46-52.
- Miao, L., St. Clair, D. K. 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 47. (4). p. 344-356.
- Milne, E., Van Bockxmeer, F. M., Robertson, L., Brisbane, J. M., Ashton, L. J., Scott, R. J., Armstrong, B. K. 2006. Buccal DNA Collection: Comparison of Buccal Swabs with FTA Cards. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15. p. 816.
- Niemann, S., Broom, W. J., Brown, R. H. 2007. Analysis of a genetic defect in the TATA box of the *SOD1* gene in a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve.* 36 (5). p. 704-707.
- Niimi, Y., Murayama, M. I., Kato, K., Matsuura, N., Murayama, Y., Ito, S., Momoi, Y., Konno, K., Iwasaki, T. 2001. Breed Differences in Allele Frequency of the Dopamine Receptor D4 Gene in Dogs. *The Journal of Heredity.* 92 (5), 433-436.
- Ogawa, M., Uchida, K., Yamato, O., Inaba, M., Uddin, M. M., Nakayama, H. 2013. Neuronal Loss and Decreased GLT-1 Expression Observed in the Spinal Cord of Pembroke Welsh Corgi Dogs With Canine Degenerative Myelopathy. *Veterinary Pathology.* 51 (3). p. 591-602.
- Ostrander, E. A., Ruvinsky, A. 2012. *The Genetics of the Dog.* 2nd edition. CABI publishing. Oxfordshire. United Kingdom. p. 537. ISBN: 1845939409.
- Pelt-Verkuil, E., Belkum, A., Hays, J. P. 2008. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification.* Springer Science & Business Media. New York. USA. p. 342. ISBN: 1402062419.
- Pfeiffer, I., Völkela, I., Täubert, H., Brenig, B. 2004. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Science International.* 141 (2-3). p. 149-151.

- Polizopoulou, Z. S., Koutinas, A. F., Patsikas, M. N., Soubasis, N. 2008. Evaluation of proposed therapeutic protocol in 12 dogs with tentative degenerative myelopathy. *Acta Veterinaria Hungarica*. 56(3). p. 293-301.
- Primrose, S. B., Twyman, R. M. 2006. Principles of gene manipulation and genomics. 7th edition. Blackwell Publishing. Oxford. United Kingdom. p. 672. ISBN: 978-1-4051-3544-3.
- Riggsbee, N. 2007. Bernese Mountain Dogs: Everything about Purchase, Care, Nutrition, Behavior and Training. Barron's Educational Series. New York. USA. p. 95. ISBN: 0764135929.
- Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*. 132. 365 ó 386.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239 (4839). p. 4876491.
- Sarsour, E. H. 2006. Manganese Superoxide Dismutase Regulates Entry Into and Exit from the Mammalian Cell Cycle. ProQuest. USA. p.118. ISBN: 0542796015.
- Serre, J. L. 2007. Diagnostic Techniques in Genetics. John Wiley & Sons. UK. p. 270. ISBN: 0470870265.
- Shehnam, S. 2012. Polymerase Chain Reaction. Lulu Publishing. UK. p. 72. ISBN: 9781105728938.
- Shelton, G. D., Johnson, G. C., O'Brien, D. P., Katz, M. L., Pesayco, J. P., Chang, B. J., Mizisin, A. P., Coates, J. R. 2012. Degenerative myelopathy associated with a missense mutation in the superoxide dismutase 1 (*SOD1*) gene progresses to peripheral neuropathy in Pembroke Welsh Corgis and Boxers. *Journal of the neurological sciences*. 318 (1-2). p. 55-64.
- Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A. F., Teixeira, M., Valentine, J. S. 2014. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical Rev*. 114 (7). p. 385463918.
- Schmutz, S. M., Cornwell, D., Moker, J. S., Troyer, D. L. 1996. Physical mapping of *SOD1* to bovine chromosome 1. *Cytogenet. Cell Genet*. 72 (1). p. 37639.

- Schochetman, G., Ou, CH., Jones, W. K. 1988. Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Infectious Diseases*. 158 (6). p. 1154-1157.
- Smith, S. H. 1995. *The New Bernese Mountain Dog*. Wiley. USA. p. 272. ISBN: 0876050755.
- Su, Z., Gu, X. 2012. Revisit on the evolutionary relationship between alternative splicing and gene duplication. *Gene*. 504 (1). p. 102-106.
- Turner, B. J., Talbot, K. 2008. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant *SOD1*-mediated familial ALS. *Prog. Neurobiol.* 85 (1). p. 946134.
- Vilá, C., Walker, C., Sundqvist, A. K., Flagstad, O., Andersone, Z., Casulli, A., Kojota, I., Valdmann, H., Halverson, J., Ellegren, H. 2003. Combined use of maternal, paternal and biparental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity*. 90 (1). p. 17-24.
- Wininger, F. A., Zeng, R., Johnson, G. S., Katz, M. L., Johnson, G. C., Bush, W. W., Jarboe, J. M., Coates, J. R. 2011. Degenerative Myelopathy in a Bernese Mountain Dog with a Novel *SOD1* Missense Mutation. *J Vet intern Med.* 25 (5). p. 1166-1170.
- Wiseman, H., Halliwell, B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 313 . p. 17629.
- Wolfgramm, E. V., Carvalho, F. M., Aguiar, V. R. C., Sartori, N. P., Hirschfeld-Campolongo, G. C. H., Tsutsumida, W. M., Louro, I. D. 2009. Simplified buccal DNA extraction with FTA® Elute Cards. *Forensic Science International: Genetics*. 3 (2). p. 1256127.
- Xu, A. 2008. *Development in Electrophoresis: Instrumentation for Two-dimensional Gel Electrophoresis of Protein Separation and Application of Capillary Electrophoresis in Microbioanalysis*. ProQuest. Iowa. USA. p. 118 ISBN: 0549688404.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., Folz, R. J. 2002. Superoxide Dismutase multigene family: a comparison of the Cu-Zn-SOD (*SOD1*), Mn.SOD (*SOD2*) and EC-SOD (*SOD3*) gene structures, evolution and expression. *Free Radic Biol Med.* 33 (3). p. 3376349.
- Zeng, R., Coates, J. R., Johnson, G. C., Hansen, L., Awano, T., Kolichski, A., Ivansson, E., Perloski, M., Lindblad-Toh, K., O'Brien, D. P., Guo, J., Katz, M. L., Johnson, G. S. 2014.

Breed Distribution of *SOD1* Alleles Previously Associated with Canine Degenerative Myelopathy. *J Vet Intern Med.* 28 (2). p. 515-521.

Zhang , Y., Zhao, W., Zhang , H. J., Domann, F. E., Oberley, L. W. 2002. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Journal of Cancer Research.* 62 (4). p. 1205-1212.

Barschi, M. 2006. Bernese Mountain Dog Club of Great Britain & Margret Bärtschi, 2006. [cit.2015-01-25].

Dostupné z

<[http://www.bmdinfo.org/bmdhistory/2006\\_Bartschi\\_BMDCGB\\_Centenary.pdf](http://www.bmdinfo.org/bmdhistory/2006_Bartschi_BMDCGB_Centenary.pdf)>.

Obr. 1: Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A. 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine.* 74 (4). p.3246-329.

Obr. 2: Zelko, I. N., Mariani, T. J., Folz, R. J. 2002. Superoxide Dismutase multigene family: a comparison of the Cu-Zn-SOD (*SOD1*), Mn.SOD (*SOD2*) and EC-SOD (*SOD3*) gene structures, evolution and expression. *Free Radic Biol Med.* 33. p. 3376-349.

Obr. 3: Miao, L., St. Clair, D. K. 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 47. (4). p. 3446-356.

Obr. 4: Green , S. L., Tolwani, R. J., Varma, S., Quignon, P., Galibert, F., Cork, L. C. 2002. Structure, Chromosomal Location, and Analysis of the Canine Cu/Zn Superoxide Dismutase (*SOD1*). *Gene. J Hered.* 93 (2). p. 119-124.

Obr. 5: Rabinow, P. 1996. Making PCR: A Story of Biotechnology. University of Chicago Press. Chicago. USA. p. 190. ISBN: 0226701476.

Obr. 6: Shehnam, S. 2012. Polymerase Chain Reaction. Lulu Publishing. UK. p. 72. ISBN: 9781105728938.

Obr. 7: Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy bune nej biologie. Espero Publishing. Ústí nad Labem. p.1503. ISBN: 80-902906-2-0.



Obr. 8: Chen, B. Y., Janes, H. W. 2002. PCR Cloning Protocols. Humana Press. New Jersey. USA. p. 460. ISBN: 1592591779.

Tab. 1: Morgan , B. R., Coates , J. R., Johnsn, G. C., Shelton, G. D., Katz, M. L. 2014. Characterization of thoracic motor and sensory neurons and spinal nerve roots in canine degenerative myelopathy, a potential disease model of amyotrophic lateral sclerosis. Journal of neurological Research. 92 (4). p. 531-541.

## 10 Zoznam poufítých skratiek

A - adenín

ALS - amyotrofická laterálna skleróza

bp - base pair (po at párov báz v molekule DNA)

BSP - bernský sala-nický pes

C- cytozín

cDNA - complementary DNA (DNA vzniknutá spätným prepisom z RNA)

ddH<sub>2</sub>O - dvakrát deionizovaná voda

DM - degeneratívna myelopatia

DNA - deoxyribonukleová kyselina

Ensembl - mezinárodní nukleotidová databáze

FCI - mezinárodní kynologická federácia (Fédération Cynologique Internationale)

G - guanín

NCBI - nukleotidová databáza mezinárodního centra pre biotechnologické informácie (National Center for Biotechnology Information)

ng - nanogram ( $10^{-9}$  g)

PCR - polymerase chain reaction (polymerázová re azová reakcia)

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism (d flkový polymorfizmus restrik ných polymorfizmov)

RNA - ribonukleová kyselina

ROS - reactive oxygen species (reaktívne formy kyslíka)

SNP single nucleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfizmus)

*SOD1* - superoxid dismutáza 1

T- tymín

TBE Tris-borátový pufer

TE Tris-EDTA pufer

l - mikrolitr ( $10^{-6}$  litra)

## **11 Prílohy**

Príloha 1: Pufry a roztoky použité p i elektroforetickej separácii DNA markera

Príloha 2: Obrazová dokumentácia plemena bernský sala-nický pes

## 11.1 Príloha1: Pufry a roztoky poufíté p i elektroforetickej separácii DNA markera ó upravené pod a Sambrook et al., (1989)

### Naná-ací pufer NP

- 0,25 % brómfenolová modrá ó sodná so (Serva, SRN)
- 0,25 % xylencyanolová modrá FF (Sigma, USA)
- 15,0 % ficol (Sigma, USA)
- Rozpustené v ddH<sub>2</sub>O
- Uchovávané p i 4 °C

### 10 x TBE pufer

- 450 mM Tris-kyselina boritá (Sigma, USA), pH 8,0
- 10 mM EDTA (Sigma, USA)
- Uchovávané p i 4 °C

### 1 x TBE pufer

- Nariedenie 10 x TBE pufru ddH<sub>2</sub>O
- Uchovávané p i 4 °C

### Zásobný roztok ethídium bromidu

- 10 mg ethídium bromidu (Sigma, USA)
- 1 ml ddH<sub>2</sub>O
- Uchovávané p i 4 °C

### Elektrodoový pufer

- 1500 ml 1 x TBE
- 75 µl zásobního roztoku ethídium bromidu

## 11.2 Príloha 2: Obrazová dokumentácia plemena bernský sala-nický pes

Fotografie sú zverejnené so súhlasom Hany Chovancovej, chovateľky bernských sala-nických psov.



