

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Alelická variabilita genu pro dopaminový receptor (*DRD4*)
u vybraných plemen psů využívaných pro asistenční účely**

Bakalářská práce

Anna Rybová

Zoorehabilitace a asistenční aktivity se zvířaty

Vedoucí práce doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Alelická variabilita genu pro dopaminový receptor (*DRD4*) u vybraných plemen psů využívaných pro asistenční účely" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16. července 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Dr. Ing. Pavlovi Vejlovi a Ing. Daniele Čílové za odborné vedení, pomoc, ochotu a cenné připomínky při zpracování této bakalářské práce. Zvláštní poděkování náleží také mému příteli Adamovi, který se mnou kvůli této práci probděl nejednu noc, pomáhal mi nacházet ta správná slova a staral se o mé psy ve chvílích nejnutnějších.

Alelická variabilita genu pro dopaminový receptor (*DRD4*) u vybraných plemen psů využívaných pro asistenční účely

Souhrn

Předmětem této práce bylo posouzení genetické variability genu *DRD4* u vybraných plemen psů, běžně využívaných pro asistenční účely. Předpokládá se, že zmíněný gen může mít vliv na psychické vlastnosti jedinců u zvířat i člověka.

Úvodní teoretická část byla věnována popisu konkrétních zkoumaných plemen a jejich využití v asistenčních aktivitách. Dále byly shrnuty vědecké poznatky týkající se genu *DRD4* a fungování dopaminového receptoru D4, který je tímto genem kódován. Následoval souhrn závěrů nejvýznamnějších studií, které se problematikou genu *DRD4* u psů v minulosti již zabývaly.

V experimentální části byl určen genotyp 50 vzorků německých ovčáků. Celá kolekce psů pocházela z chovatelské stanice Policie ČR, jednalo se tedy o psy pracovní upotřebené, chované v homogenních podmínkách. Zkoumaný vzorek zahrnoval psy i feny. Jednotlivé alely byly identifikovány pomocí metody PCR a kapilární elektroforézy postupem, který ve své práci navrhli Ito et al. (2004). Přesný postup a podmínky amplifikací včetně použitých primerů je možné nalézt v metodické části této práce.

U zkoumaného vzorku německých ovčáků byly nalezeny celkem 4 alely shodné s těmi, které ve své práci u německých ovčáků identifikovali Ito et al. (2004). Konkrétně se jednalo o alely 435, 447a, 447b a 498, přičemž alela 447a u tohoto vzorku populace výrazně dominovala (79 %). Této alele bylo v práci autorů Hejjas et al. (2007) přisuzováno vyšší skóre pro aktivitu-impulzivitu.

Výsledky německých ovčáků byly χ^2 -testem porovnány s dostupnými daty 50 jedinců plemene bearded kolie a 50 jedinců border kolie. Tento test neodhalil ve frekvenci alel mezi plemeny žádnou podobnost. Byla tedy potvrzena hypotéza, že frekvence alel exonu III genu *DRD4* jsou pro každé plemeno unikátní.

Otestována byla také podobnost zjištěných frekvencí alel u německého ovčáka s předchozími pracemi. Tyto frekvence nevykazovaly žádnou podobnost, což mohlo být zapříčiněno příliš malým testovaným vzorkem.

Znalost vztahu mezi žádanými povahovými kvalitami psa a jejich genetickým základem by mohla výrazně zefektivnit proces selekce vhodných jedinců pro pracovní upotřebení v různých odvětvích.

Klíčová slova: asistenční psi, aktivita-impulzivita, dopamin, gen *DRD4*, německý ovčák

Allelic variability of the dopamine receptor gene (*DRD4*) in selected breeds of assistance dogs

Summary

The goal of this bachelor thesis was to assess genetic variability of *DRD4* gene in selected dog breeds commonly used as service dogs. The aforementioned gene is considered to have influence on psychical traits of individuals, in both animals and human.

Theoretical introduction was focused on description of concrete examined breeds and their use in animal-assisted activities. The following section summarized scientific findings concerning the *DRD4* gene and the functioning of the D4 dopamine receptor, which is being coded by this gene. Subsequent part summarized the most significant studies which had dealt with *DRD4* gene in dogs in past.

Experimental part of the thesis determined genotype of 50 samples of German Shepherds. The whole collection originates from the breeding kennel of Policie ČR, all the tested individuals were therefore police service dogs raised in homogenous conditions. Both dogs and bitches were included in the sample. Individual alleles were identified using the PCR method and capillary electrophoresis, by methodology suggested by Ito et al. (2004). The exact procedure and conditions of amplifications, including used primers, are to be found in the methodological part of this thesis.

In the examined sample of German Shepherd there were found 4 alleles, same as the ones described in the work of Ito et al. (2004). The alleles were 435, 447a, 447b and 498, of which allele 447a showed significant domination (79 %). In the work of Hejjas et al. (2007), a higher score of activity-impulsivity is attributed to the lastly mentioned allele.

The χ^2 -test was used to compare results of German Shepherd to available data of 50 individuals of bearded collie breed and 50 border collies. This test has not shown any similarities in the frequency of alleles between the three breeds. Therefore, stated findings confirmed the hypothesis that the frequencies of alleles of exon III of gene *DRD4* are unique for each breed.

In addition, the similarity of found frequencies in German Shepherd was tested with previous studies. These frequencies have not shown any similarity which could have been caused by a small test sample.

The knowledge of the relationship between desired personality traits and their genetic basis could make the process of selecting individuals best suited for a specific type of work significantly more efficient.

Keywords: service dogs, activity-impulsivity, dopamine, *DRD4* gene, German Shepherd

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce.....	9
2.1 Vědecké hypotézy	9
2.2 Cíl bakalářské práce	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Asistenční pes.....	10
3.1.1 Dělení asistenčních psů.....	10
3.1.2 Výběr asistenčních psů	11
3.1.3 Charakteristika vybraných plemen asistenčních psů	11
3.1.3.1 Bearded kolie.....	11
3.1.3.2 Border kolie	12
3.1.3.3 Německý ovčák	13
3.2 Dopamin.....	13
3.2.1 Objev.....	13
3.2.2 Syntéza, skladování a uvolňování.....	14
3.3 Dopaminové receptory.....	15
3.3.1 Typy.....	15
3.3.2 D4 receptor	16
3.4 Variabilita genu <i>DRD4</i> u lidí.....	17
3.4.1 ADHD.....	18
3.5 Variabilita genu <i>DRD4</i> u psů	18
3.6 Metody molekulární biologie	22
3.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	22
3.6.1.1 Princip polymerázové řetězové reakce	23
3.6.2 Restrikční štěpení PCR produktů.....	24
3.6.3 Gelová elektroforéza.....	25
3.6.4 Kapilární elektroforéza	25
4 Metodika	26
4.1 Zkoumané genotypy.....	26
4.2 Izolace DNA	26

4.3	Amplifikace a fragmentační analýza	26
4.3.1	Primery pro PCR.....	26
4.3.2	První amplifikace	27
4.3.3	Fragmentační analýza alel genu <i>DRD4</i>	28
4.3.4	Druhá amplifikace.....	28
5	Výsledky	30
5.1	Statistické vyhodnocení	34
6	Diskuze	37
7	Závěr.....	39
8	Literatura.....	40
9	Seznam obrázků a tabulek	I
9.1	Seznam obrázků	I
9.2	Seznam tabulek.....	I

1 Úvod

Asistenční psi se dostávají do povědomí stále většího okruhu lidí a poptávka po nich v posledních letech vysoce roste. Jsou to psi, kteří prošli speciálním výcvikem, aby mohli svým pánům pomoci překonávat překážky, které jim do běžného života staví jejich postižení.

Spektrum využití asistenčních psů je opravdu široké. Svým majitelům mohou pomáhat s elementárními úkony, jako je například podávání věcí nebo otevírání dveří, ale důležitou roli mohou mít i ti, kteří své pány na první pohled pouze doprovází. Jedná se o psy, kteří jsou schopni upozornit na blížící se epileptický záchvat či migrénu, postižený člověk pak může včas užít medikaci a těmto stavům i zcela předejít.

Psi asistenti bývají pro své majitele nepostradatelnými společníky a na jejich bedra je kladena velká zodpovědnost. Ze samotné podstaty jejich práce jasně vyplývá, že se pro tuto roli nehodí každý pes.

Jedinec, který se má stát asistenčním psem, musí splňovat celou řadu požadavků fyzického i povahového charakteru. Právě problémové chování je jedním z nejčastějších důvodů pro vyřazení psa z výcviku. Není proto náhoda, že organizace zabývající se výcvikem asistenčních psů hledají efektivní způsoby, jak určit, zda je jedinec pro práci vhodný.

V této bakalářské práci se budu zabývat variabilitou genu *DRD4* a jejím vztahem k povahovým vlastnostem vybraných plemen psů využívaných pro asistenční účely.

Mutace genu *DRD4* ovlivňují aktivitu, impulsivitu a schopnost soustředit se u celé řady savců, včetně psů (Hejjas et al. 2007).

Variabilita v genu *DRD4* je důkladně zkoumána i v lidské medicíně, kde je dáována do souvislosti s hyperkinetickou poruchou (ADHD – Attention Deficit Hyperactivity Disorder) (Faraone et al. 2005).

Experimentální část práce se bude zabývat zkoumáním polymorfismu exonu III genu *DRD4* u plemene německý ovčák. Zjištěné výsledky plemene německý ovčák budou následně porovnány s výstupy studie publikované Hejjas et al. (2007) a s výsledky dalších plemen psů využívaných k asistenčním účelům, konkrétně s plemeny bearded collie a border kolie.

2 Cíl práce

2.1 Vědecké hypotézy

Řešení bakalářské práce vychází z aktuálně dostupných poznatků v oblasti vztahu molekulární genetiky, konkrétně exonu III genu *DRD4*, k povahovým vlastnostem psů. Práce staví na následujících hypotézách:

- Exon III genu *DRD4* kódujícího dopaminový receptor vykazuje mnohotný alelismus.
- Frekvence jednotlivých alel je ovlivněna plemennou příslušností.
- Psychické vlastnosti psa mnohou být ovlivňovány strukturou dopaminového receptoru.

2.2 Cíl bakalářské práce

Cílem bakalářské práce bylo vypracování ucelené literární rešerše zaměřené na polymorfismus genu *DRD4* a na jeho vliv na povahové vlastnosti psů, jako je například schopnost soustředit se, impulzivita a aktivita. Experimentální část práce byla zaměřena na molekulární detekci alelických kombinací genu *DRD4* u plemene německý ovčák a následné porovnání rozdílů mezi 3 plemeny psů využívaných pro asistenční účely (border kolie, bearded kolie a německý ovčák) z hlediska frekvencí jednotlivých alel genu *DRD4*.

3 Literární rešerše

3.1 Asistenční pes

Asistenčním psem se rozumí pes, který je speciálně vycvičen k tomu, aby byl schopen provádět úkony, kterými usnadňuje každodenní život jedinci s handicapem, zvyšuje tak nezávislost postižené osoby a stává se důležitým prostředkem sociální integrace (Rintala et al. 2008; Audrestch et al. 2015; Parenti et al. 2015).

Skutečný význam asistenčních psů ale tuto definici dalece přesahuje. Jako důsledek pořízení asistenčního psa je často uváděn významný nárůst sociálních interakcí, zlepšení mentálního i fyzického stavu, zvýšení sebedůvěry a pocitu bezpečí. Díky této přidané hodnotě je využití speciálně trénovaných psů vhodné i u lidí se zvláštními potřebami, kteří nejsou indisponováni fyzicky (Walther et al. 2017).

3.1.1 Dělení asistenčních psů

Terminologie v oblasti asistenčních psů bohužel není v současné době jednotná. Mezinárodně uznávaného termínu se zatím dočkali pouze asistenční psi pro osoby se zrakovým postižením, tedy psi vodící. Galetová (2008) uvádí, že na území České republiky společnosti, které psy cvičí, rozdělují asistenční psy dle druhu zdravotního handicapu uživatele služby na:

- A) Vodící psy pro osoby se zrakovým postižením
- B) Asistenční psy pro osoby s tělesným postižením – tyto psy je možné nazývat také servisními psy pro osoby používající invalidní vozík a pro osoby s kombinovaným postižením (tělesné postižení a další přidružené).
- C) Balanční psy – pro osoby s poruchou rovnováhy či tělesným postižením, které se pohybují výhradně pomocí francouzských holí, chodítek apod. Díky speciálnímu postroji pomáhá pes při „vybalancování“ chůze, nástupu do autobusu apod.
- D) Signální psy pro neslyšící osoby – jsou vycvičeni k upozorňování na zvuky v jejich okolí (budík, zvonek, plačící dítě apod.).
- E) Signální psy pro osoby se záchvatovitým onemocněním – upozorňují osoby na blížící se záchvat nebo okolí osoby při záchvatu. V zahraničí se setkáváme s označením „Seizure Alert Dogs“.
- F) Signální psy pro „alergiky“ – jsou vycvičeni k tomu, aby upozornili osobu na přítomnost pachů, které způsobují postižené osobě záchvaty astmatického typu.
- G) Šikovné společníky – asistenční psy jejichž pánem není přímo postižený, ale osoba pečující o postiženého. Tito psi jsou umístováni do domácností s těžce postiženými osobami. Pes pomáhá pečující osobě například otevírat dveře, když přenáší dítě do jiné místnosti apod. Významnou součástí práce těchto psů tvoří také domácí canisterapie.
- H) Vodící psy pro pacienty se ztrátami paměti – tyto psi jsou vycvičeni v orientaci v okolí bydliště natolik, aby dokázali postiženou osobu bezpečně dovést domů, pokud není schopna se sama zorientovat.

- I) Psy poskytující emocionální podporu – psi určené osobám trpícím psychickými poruchami, kvůli kterým se obávají samy vycházet z domova a zapojovat se do běžného života. Pes snižuje dezorientaci, zvyšuje pocit bezpečí v neznámém prostoru apod.
- J) Terapeutické psy – zvládají základní poslušnost, umí aportovat různé předměty a jiné hry, trpělivě snášejí dotyky a dokážou upozornit na nestandardní chování osoby zdravotně postižené.

3.1.2 Výběr asistenčních psů

Výběr psa pro asistenční účely je práce nesoucí s sebou velkou míru zodpovědnosti. Pes je vybírán pro konkrétního zdravotně postiženého člověka a náročný výcvik se přizpůsobuje jeho individuálním potřebám. Do vytipovaného šteněte jsou během prvních dvou let jeho života investovány vysoké finanční a časové prostředky. Cena asistenčního psa se v České republice pohybuje kolem částky 200 000 Kč. Je proto žádoucí, aby se jedinec jako asistenční pes prokázal (Galetová 2008).

Nejčastěji uváděným důvodem k vyřazení psa z tréninku pro asistenční účely bývá problematické chování. Organizace zabývající se výcvikem psů si proto vytvářejí vlastní techniky pro hodnocení psů a brzkou detekci behaviorálních problémů, které by mohly psa v pozdějších fázích tréninku z výcviku vyřadit (Duffy et al. 2012).

Cílená selekce a chov fyzicky zdravých a povahově vhodných jedinců by umožnila organizacím efektivněji alokovat jejich zdroje, snížit náklady na výcvik a zvýšit dostupnost asistenčních psů pro ty, kteří je potřebují (Parenti et al. 2015).

3.1.3 Charakteristika vybraných plemen asistenčních psů

Pro asistenční účely se dnes využívá celá škála plemen. Některá plemena jsou ale pro výcvik využívána hojněji, a to především díky jejich vhodné morfologii a behaviorálním sklonům, které často souvisí s původním využitím plemene (Parenti et al. 2015).

Velmi populární jsou například psi ze skupiny retrívrů, a to především pro jejich stálý temperament, snadnou trénovatelnost a predispozici přinášet objekty (Weiss & Greenberg 1997).

Vedle retrívrů a labradorů jsou dalšími často využívanými plemeny například němečtí ovčáci, bernardýni, kolie a kokršpanělé (Parenti et al. 2015).

3.1.3.1 Bearded kolie

Bearded kolie jsou psi původem ze Skotska, kde byli využíváni k práci u ovcí a skotu v hornatém terénu. Kohoutková výška může dosahovat až 56 cm. Jsou to velmi pozorní, živí, inteligentní a pracovití psi, kteří by neměli jevit známky nervozity či agresivity (FCI 2015).

Vzhledem k jejich přátelské a ochotné povaze najdou dnes využití především v různých psích sportech a jako psi společníci (Vazdová 2016).



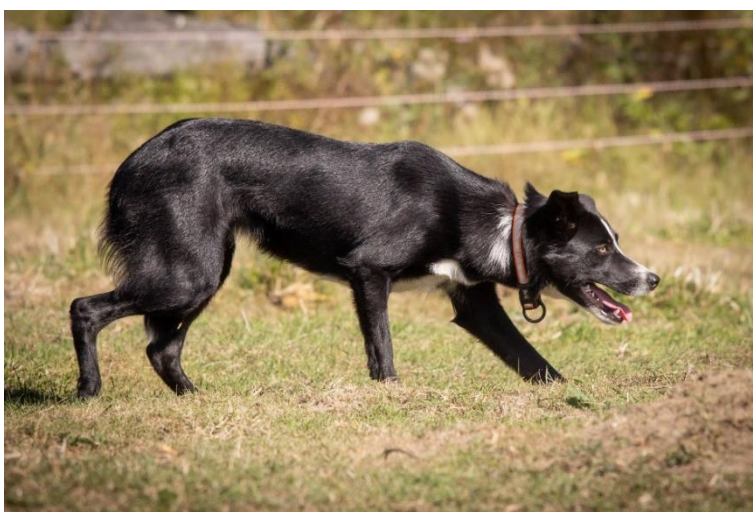
Obrázek 1: Bearded kolie
Se svolením autora – Lukáš Skalický

3.1.3.2 Border kolie

Border kolie jsou středně velcí psi s kohoutkovou výškou kolem 50 cm. Standard FCI (2009) povoluje 2 varianty srsti středně dlouhou a krátkou. Mohou mít rozličné barvy, nikdy by ale neměla převažovat bílá.

To, co dělá border kolie skutečně jedinečnými, je jejich povaha. Selekcce do chovu probíhala po celé generace čistě na základě pracovních schopností a upotřebitelnosti psů, což vedlo k vyšlechtění inteligentních, tvrdě pracujících, mrštných a rychlých psů s vrozenými předpoklady pro práci se zvířaty. Border kolie je velmi živé, pozorné a poslušné plemeno. (Tučímková 2019).

Tito psi se dnes využívají v celé řadě kynologických sportů a disciplín. Je nutno podotknout, že díky svému zápalu pro práci a touze zavděčit se psovodovi většině těchto odvětví zcela dominují (Tučímková 2019).



Obrázek 2: Border kolie – Goji the Great ISDS 00/364379
Se svolením autora – Lenka Strnadová

3.1.3.3 Německý ovčák

Standard FCI (2010) popisuje německého ovčáka jako všestranně upotřebitelného silného psa střední velikosti, kohoutové výšky od 55 do 65 cm, obdélníkového formátu.

Povaha německých ovčáků by měla být zcela vyrovnaná a dobromyslná. Psi by měli být pozorní, lehce ovladatelní, vzhledem k jejich využití (strážní, služební, obranářští a pastevečtí psi) by ale měli disponovat odvahou, bojovností a tvrdostí (FCI 2010).



Obrázek 3: Německý ovčák – Ares Slovraj
Se svolením autora – Ingrid Remetová

3.2 Dopamin

Dopamin (3-hydroxytyramin) je katecholamin plnicí úlohu hormonu a neurotransmiteru. Jedná se o hlavní neurotransmiter v mozku savců, kde také ovlivňuje celou řadu funkcí včetně pohybové aktivity, kognice, emocí, motivace, přijímání potravy či regulace endokrinních aktivit (Missale et al. 1998; Wong et al. 2000).

Mimo centrální nervovou soustavu nachází dopamin také uplatnění v perifériích, kde pomáhá regulovat kardiovaskulární funkce, sekreci hormonů, cévní tonus, funkci ledvin a hybnost zažívacího traktu (Missale et al. 1998).

3.2.1 Objev

Dopamin byl poprvé syntetizován v roce 1910 dvěma na sobě nezávislými dvojicemi vědců Mannichem & Jacobsohnem a Bargerem & Ewinsem (Blaschko 1942). V té době byl ovšem dopamin považován pouze za prekursor adrenalinu a noradrenalinu, jeho funkce neurotransmiteru byla prokázána až později (Carlsson 1958).

Doktor Arvid Carlsson dokázal, že je tento katecholamin přirozenou součástí mozku, zmapoval jeho distribuci a zdůraznil jeho neobvykle vysokou koncentraci v bazálních gangliích. V roce 1960 dokonce vyslovil domněnku, že by se mohlo jednat o neurotransmiter, nicméně tato hypotéza byla odbornou veřejností ze začátku v podstatě jednohlasně odmítána. O 40 let výzkumu později byla ale Carlssonovi za jeho objev udělena Nobelova cena za lékařství a fyziologii (Iversen & Iversen 2007).

Dopaminový systém se stal předmětem mnoha studií především po tom, co začal být dáván do souvislosti s celou řadou patologických stavů jako je například Parkinsonova choroba, schizofrenie či Turretův syndrom (Missale et al. 1998).

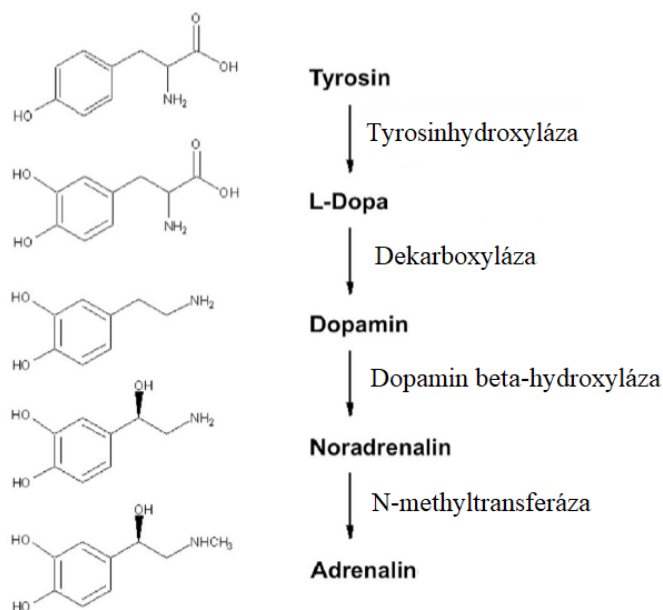
3.2.2 Syntéza, skladování a uvolňování

Za výchozí látku pro syntézu dopaminu je považována neesenciální aminokyselina tyrosin. Tyrosin je transportován do dopaminergních neuronů, kde je pomocí tyrosin hydroxylázy přeměňován na sloučeninu L-DOPA. L-DOPA (či levopoda) je přímým prekurzorem dopaminu. Z dopaminu se dále může tvořit noradrenalin a adrenalin (Bressan & Crippa 2005).

V neuronech je dopamin transportován z cytoplazmy do speciálních vezikul, kde je skladován. Dopamin ale může vznikat také přímo v dendritech, kde může být kromě vezikul uchováván také v hladkém endoplazmatickém retikulu (Bressan & Crippa 2005).

Po vzniku akčního potenciálu splynou vezikuly s neuronální membránou a procesem exocytózy je vyprázdněn obsah vezikul do synapse (Bressan & Crippa 2005).

Terminální zakončení dopaminových neuronů disponuje vychytávacími mechanismy, které jsou nezbytné pro dokončení procesu přenosu nervového vzruchu a zachování homeostázy. Vychytávání dopaminu je umožněno díky membráně s vysokou afinitou, která je schopna transportovat dopamin oběma směry v závislosti na jeho koncentračním gradientu (Elsworth & Roth 1997).

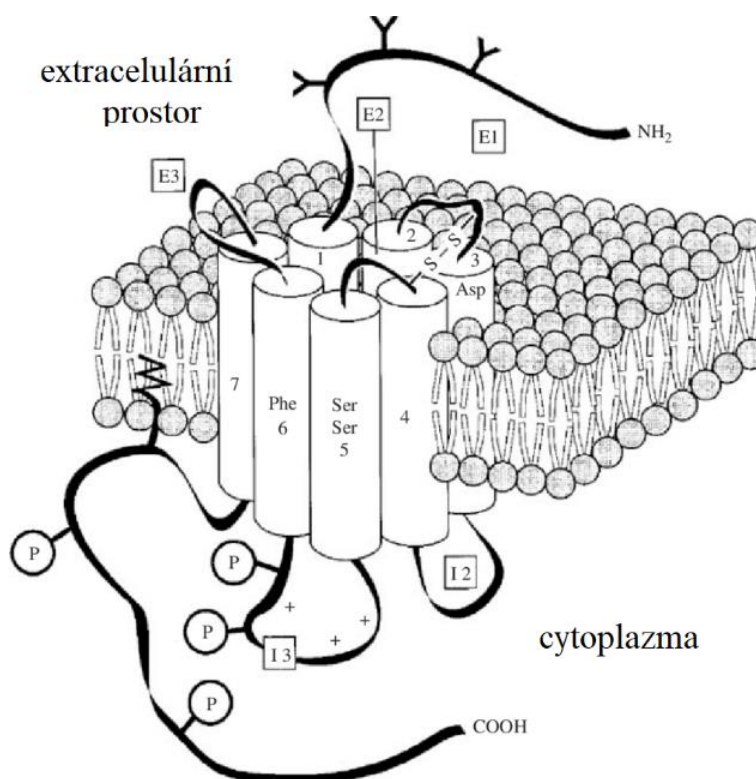


Obrázek 4: Schéma syntézy dopaminu a jeho přeměny na adrenalin

Zdroj: Cosentino et al. 2015

3.3 Dopaminové receptory

Různé fyziologické účinky dopaminu jsou umožněny díky existenci vícero typů receptorů schopných ho vázat. Analýzou primární struktury dopaminových receptorů bylo odhaleno, že všechny typy patří do skupiny receptorů spřažených s G proteinem se sedmi membránovými doménami. Jednotlivé typy receptorů se od sebe liší především délkou COOH konce a stavbou třetí intracelulární kličky (Missale et al. 1998).



Obrázek 5: Struktura dopaminového receptoru

Zdroj: Missale et al. 1998

3.3.1 Typy

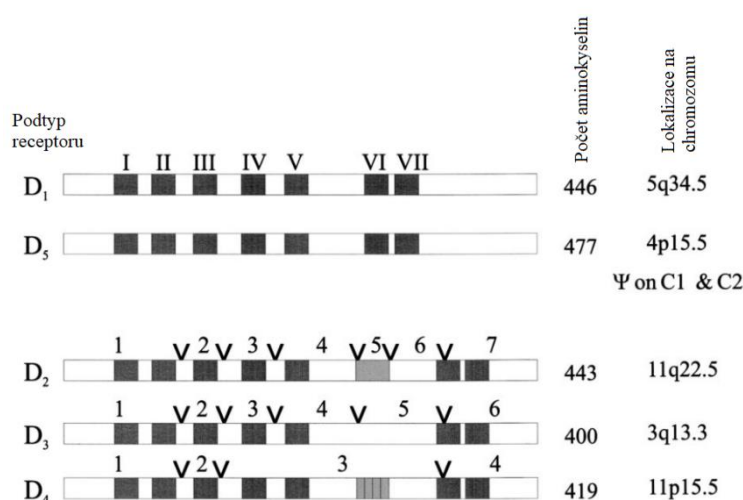
První důkazy o přítomnosti dopaminových receptorů v CNS přišly v roce 1972. V roce 1979 Kebabian & Calne rozdělili dopaminové receptory na dva typy. D1 receptory stimulují adenylátcyklázu a D2 receptory bez tohoto účinku (Jaber et al. 1996; Missale et al. 1998). V roce 1980 bylo dokázáno, že D2 receptory adenylátcyklázu přímo inhibují (Jaber et al. 1996; Elsworth & Roth 1997). Současně probíhající studie prokázaly přítomnost dvou typů receptorů se shodnými vlastnostmi také v periferních tkáních (Missale et al. 1998).

Ačkoliv je nám v současné době známo celkem 5 různých druhů dopaminových receptorů, koncept klasifikace na D1 a D2 receptory z roku 1979 je stále platný. K receptorům D1 a D5/D1b je referováno jako k receptorům typu D1 a receptory D2, D3 a D4 jsou označovány jako receptory typu D2 (Missale et al. 1998).

Receptory typu D1, neboli D1-like receptors, spojuje také to, že se jedná pouze o receptory postsynaptické, které jsou kódovány geny bez intronů. Geny bez intronů jsou zároveň typické pro receptory spřažené s G proteinem (Missale et al. 1998).

D2-like receptory jsou oproti tomu pre i postsynaptické, a v genech, které je kódují, je obsažen různý počet intronů. Konkrétně je to u genu pro receptor D2 6 intronů, u genu pro D3 receptor 5 intronů a 3 introny u D4 receptoru. Zároveň platí, že gen pro D3 receptor postrádá šestý intron receptoru D2 a gen pro D4 čtvrtý a pátý intron receptoru D3 (Missale et al 1998).

Na obrázku 6 je znázorněna struktura genů kódujících podtypy dopaminových receptorů. Sedm hydrofobních úseků typických pro receptory spřažené s G proteinem je vyznačeno tmavě šedou a očíslováno římskými číslicemi. Pozice intronů v kódující části genomické sekvence je označena písmenem V a exony jsou označeny arabskými číslicemi. Světle šedá část u genu pro receptor D2 označuje alternativní splicing úseku čítajícího 29 aminokyselin exonu V. Světle šedé tandemově se opakující úseky u genu pro receptor D4 značí pozici repetitivního polymorfismu, který je přítomný u lidí (Oak et al. 2000).



Obrázek 6: Strukturální organizace genů kódujících podtypy dopaminových receptorů
Zdroj: Oak et al. 2000

3.3.2 D4 receptor

Dopaminové D4 receptory se vyskytují v různých částech mozku, ačkoliv v poměrně malém množství porovnáme-li je například s výskytem receptorů D2 (Missale et al. 1998; Oak et al. 2000). Nejhojněji se receptory D4 vyskytují na sítnici, v mozkové kůře, amygdale, hypothalamu a hypofýze (Oak et al. 2000).

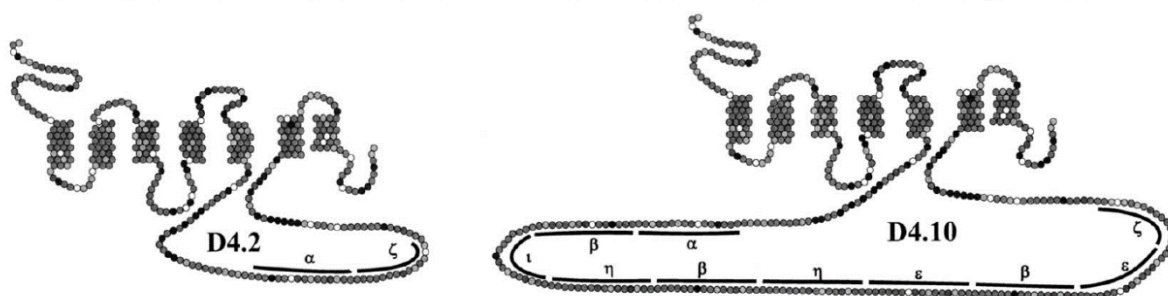
Studie na primátech naznačují, že D4 receptory jsou součástí neuronů mozkové kůry, které jsou zapojeny do pyramidové dráhy, i těch, které v této dráze zapojené nejsou. Většina nepyramidových neuronů obsahujících D4 receptory je schopna produkce kyseliny gama-aminomáselné (Oak et al. 2000).

Výskyt D4 receptorů ale není vázaný pouze na centrální nervovou soustavu, tyto receptory byly také pozorovány v hojném množství v srdečních předsíních, lymfocytech a ve sběrných kanálcích ledvin (Oak et al. 2000).

3.4 Variabilita genu *DRD4* u lidí

Lidský gen kódující dopaminový receptor D4 (*DRD4*) je lokalizován v telomerické oblasti chromozomu 11p a vykazuje extrémně vysokou míru variability (Gelernter et al. 1992; Wong et al. 2000; Ding et al. 2001).

Velká část této diverzity je důsledkem hypervariabilní oblasti *DRD4* genu kódující třetí cytoplazmatickou kličku receptoru D4. Tato oblast obsahuje 2 (2R) až 11 (11R) tandemových repetitivních 48 komplementárních párů bází (bp), jejichž výsledkem je 32-176 aminokyselin ve variabilní oblasti třetí cytoplazmatické kličky receptoru, což je znázorněno na Obrázku 7 (Van Tol et al. 1992; Wong et al. 2000; Ding et al. 2001). Frekvence těchto alel se v populacích velmi výrazně liší (Ding et al. 2001).



Obrázek 7: Schéma znázorňující variabilitu třetí plazmatické kličky. Na obrázku je varianta se dvěma a varianta s deseti repeticemi.

Zdroj: Jovanovic et al. 1999; Oak et al. 2000

Na základě poznatků vzešlých z experimentů na laboratorních zvířatech, pozorování pacientů s Parkinsonovou chorobou a znalosti působení dopaminových agonistů (např. amfetamin, kokain, alkohol) a antagonistů (např. haloperidol) vznikl předpoklad o spojitosti mezi osobnostním rysem zvaným Novelty Seeking (vyhledávání nového) a dopaminovým systémem (Ebstein et al. 1996).

Studie publikovaná v roce 1996 kolektivem autorů Ebstein et al., odhalila vysokou míru korelace mezi zvýšeným skóre pro Novelty Seeking a konkrétní polymorfismem genu *DRD4* v exonu III. Jednalo se o alelu se sedmi repeticemi (7R). Tato spojitost byla nezávislá na etnické příslušnosti, pohlaví nebo věku testovaných subjektů.

Vyššímu skóre pro Novelty Seeking odpovídají také vlastnosti jako impulzivita, nestálost, zvýšená dráždivost, či výbušnost. Jedinci s nižším skóre jsou naopak popisováni jako přemýšliví, pevní v názorech, klidní a skromní (Ebstein et al. 1996).

Dulawa et al. (1999) zveřejnili studii poukazující na snížený stupeň průzkumného chování u myši s knock-outovaným genem *DRD4*, která domněnku vycházející z předchozího výzkumu podpořila.

Ding et al. (2001) narazili při zkoumání alel genu *DRD4* na zajímavou skutečnost. Výsledky výpočtu stáří alel postavené na frekvenci jejich výskytu v populaci ukazovaly na to, že alely 4R a 7R jsou starší než 300 000 let. Na druhou stranu výpočty vycházející z pozorování intraalelické variability poukazovaly na věk podstatně mladší (30 000-50 000 let). Takto zásadní nesrovnalost mezi výsledky dvou výpočtů stáří alel obvykle značí to, že vyšší frekvence alel bylo dosaženo selekcí, která způsobila náhodný genetický drift (Ding et al. 2001).

Přestože původní studie dávaly do souvislosti alelu 7R především s průzkumným chováním, velmi často reprodukovanou asociací se postupem času stal vztah mezi zmíněnou alelou a hyperkinetickou poruchou (attention-deficit hyperactivity disorder – ADHD) (Ding et al. 2001).

3.4.1 ADHD

S celosvětovou prevalencí dosahující 8 % - 12 % je hyperkinetický syndrom s poruchou pozornosti (ADHD) jednou z nejrozšířenějších dětských psychiatrických poruch (Faraone 2005).

Mezi nejčastější projevy ADHD patří problémy se soustředěním, hyperaktivita a impulzivita. Nicméně pro syndrom ADHD je typický velký rozsah variability symptomů (Drtílková et al. 2007). Genetika hraje v rozvoji těchto vlastností klíčovou roli, což bylo prokázáno na řadě studií prováděných na rodinách zatížených touto poruchou (Faraone et al. 2005). Na rozvoji ADHD se podílí celá řada faktorů, heritabilita ale bývá odhadována až ve výši 80 % (Thapar et al. 2000).

Receptor D4 je prevalentní v oblasti mozku, která vykazuje patologický obraz u pacientů s ADHD (Faraone & Biederman 1998). Vědci své studie soustředili především na VNTR polymorfismus exonu III genu *DRD4*, protože in vitro studie prokázaly, že konkrétní varianta (alela se 7 repeticemi) způsobuje sníženou odezvu vůči dopaminu (Van Tol et al. 1992).

Řada studií tuto hypotézu podpořila a u jedinců s poruchou pozornosti opravdu prokázala zvýšený výskyt alely se sedmi repeticemi (Holmes et al. 2000; Curran et al. 2001; Langley et al. 2009). Do kontrastu s nimi je například postavena studie publikovaná kolektivem autorů Leung et al. (2005). Ta byla zaměřena na genotypizaci vzorků 32 čínských dětí diagnostikovaných s ADHD. Tato studie vznikla především proto, že varianta alely se sedmi repeticemi je v asijské populaci velmi vzácná, prevalence ADHD je ale s ostatními populacemi srovnatelná (Chang et al. 1996). Ve studii byl pozorován výrazně zvýšený výskyt alely 2R, žádné z dětí přitom nemělo přítomnu 7R. Na základě této studie je tedy možné uvažovat nad tím, že projevy jednotlivých alel exonu III genu *DRD4* se mohou v různých izolovaných populacích výrazně lišit (Leung et al. 2005).

3.5 Variabilita genu *DRD4* u psů

Podobný polymorfismus genu *DRD4* založený na repeticích, byl postupně prokázán i u dalších živočišných druhů, konkrétně u koní (Momozawa et al. 2005), primátů (Livak et al. 1995) a psů (Niimi et al. 1999).

První studie genu *DRD4* u psů byla provedena v roce 1999. Porovnávala sekvence exonu III u 34 jedinců dvou povahově zcela odlišných plemen, zlatých retrívrů a jedinců plemene shiba. Podařilo se v ní odhalit 4 alely genu *DRD4* - 435, 549, 447a a 447b (číslo v tomto případě značí počet bp v pozorované sekvenci). Mechanismus polymorfismu založený na repeticích byl u psů potvrzen, ačkoliv v trochu složitější formě než u lidí. Alely se od sebe lišily počtem a pořadím jednotek o délce 39, 27 a 12 bp. Zároveň platilo, že jednotky s 27 a 12 bp odpovídaly po spojení v tomto pořadí jednotce s 39 bp. Frekvence alel se u jednotlivých plemen výrazně

lišila, což podpořilo domněnku, že alelická kombinace může významně ovlivňovat povahové vlastnosti psů (Niimi et al. 1999).

V roce 2001 rozšířili Niimi et al. svou studii o další 2 plemena, tentokrát se jednalo o bigly a šeltie. Podařilo se odhalit 3 nové alely – 396, 486 a 498. Alela 396 byla detekována v homozygotní sestavě u plemene bígl. U plemene shiba bylo celkem pozorováno 5 alel, toto plemeno tedy vykazovalo nejvyšší stupeň heterozygotnosti, zatímco šeltie nejnižší. Na rozdíl od evropských plemen, nebyly krátké alely jako 396 a 435 u plemene shiba pozorovány (Niimi et al. 2001).

Na přechodí studie navázali Ito et al. (2004), kteří shromáždili přes 1500 různých vzorků od psů 23 plemen. Zkoumaná plemena byla záměrně zvolena tak, aby krajiny jejich původu pokrývaly co nejširší zeměpisnou oblast. Vzorek tedy zahrnoval plemena okcidentální i orientální.

Poprvé byl také zkoumán vztah mezi genotypem a povahovými kvalitami psů. Za tímto účelem byl vytvořen dotazník sledující 12 behaviorálních rysů jako například schopnost přizpůsobit se novému majiteli, přátelskost vůči cizím lidem, agresivitu vůči majiteli, teritoriální chování, agresi vůči jiným psům atd. Jednotlivé body byly hodnoceny na škále od 1 do 5. Kvůli zachování objektivity byly dotazníky vyplňovány odborníky z řad veterinářů, trenérů a chovatelů, ne samotnými majiteli (Ito et al. 2004).

V této studii byla detekována osmá alela 576. Exon III vykazoval polymorfismus u všech 23 plemen a u každého plemene bylo pozorováno od 2 do 7 alel. Na základě frekvence alel exonu III rozdělili autoři pozorovaná plemena do dvou skupin. U skupiny A byly nejčastějšími detekovanými alelami alely 435 a 447a, u skupiny B to byly alely 447b, 498 a 549. V porovnání se psy ze skupiny A, vykazovala plemena skupiny B vyšší stupeň agresivity a nižší skóre v bodech hodnotících reaktivitu. Ve skupině A převažovala plemena okcidentálního původu, ve skupině B naopak plemena původu orientálního (Ito et al. 2004).

Alela 435 podle Ito <i>et al.</i> (2004)	
1	TTCTTCCTAC CCTGCCCGCT CATGCTGCTG CTCTACTGGG CCACGTTCCG GGGCCTGCGG
61	CGCTGGGAGG CCGCGCGTCG GGCCAAGCTG CACGGCCGGA CACCGCGCAG ACCCAGCGGC
121	CCCGGCCCGC CGCCCCCGA CGGCAGCCCC GACGGCACC CCGGCCCGCC GCCCCCCGAC
181	GGCAGCCCCG ACGGCACCTC GGACGGCACC CCCGGCCAC CGCCCCCGA CGGCAGCCCC
241	GACGGCACC CCGGCCCGCC GCCCCCCGAC GGCAGCCCTG ATGACAACC CCGCCCGCCG
301	CCCCCTGACA GCAGCCCTGG CCCGCGCCC CCGAGGTCA CCCCCGATGA CACCCCCGAC
361	GCCACACCCC GCCCCCTGCC CCCCCTGCC GACGCCGCC CGCCCCCCC CGC
421	GCAGAGCCCC CGCGG

Obrázek 8: Alela 435
Převzato: Holasová 2011

Alela 447a podle Ito *et al.* (2004)

```
1 TTCTTCCTAC CCTGCCCGCT CATGCTGCTG CTCTACTGGG CCACGTTCG GGGCCTGCGG
61 CGCTGGGAGG CCGCGCGTCG GGCCAAGCTG CACGGCCGGA CACCGCGCAG ACCCAGCGGC
121 CCCGGCCCGC CGCCCCCGA CGGCAGCCCC GACGGCACC CGGACGGCAC CCCAGCCCA
181 GGCAGCCCCG ACGGCAGCCC CGACGGCACC TCGGACGGCA CCCCAGCCCA ACCGCCCCC
241 GACGGCAGCC CCGACGGCAC CTCGGACGGC ACCCCCGGCC CACCGCCCC CGACGGCAGC
301 CCCGACGGCA CCCCAGGCC GCGCCCCC GACGGCAGCC CTGATGACAA CCCCAGCCCC
361 GACAGCCCTG ACAGCAGCCC TGGCCCGCCG CCCCAGAGG TCACCCCGA TGACACCCC
421 GACGCCACAC CCCGCCCCCT GCCCCCCG GCGGACGCG CCGCGCCCC CCCCAGCC
```

Obrázek 9: Alela 447a
Převzato: Holasová 2011

Alela 447b podle Ito *et al.* (2004)

```
1 TTCTTCCTAC CCTGCCCGCT CATGCTGCTG CTCTACTGGG CCACGTTCG GGGCCTGCGG
61 CGCTGGGAGG CCGCGCGTCG GGCCAAGCTG CACGGCCGGA CACCGCGCAG ACCCAGCGGC
121 CCCGGCCCGC CGCCCCCGA CGGCAGCCCC GACGGCACC CGGACGGCAC CCCAGCCCA
181 CCGCCCCCGG ACGGCAGCCC CGACGGCACC TCGGACGGCA CCCCAGCCCA ACCGCCCCC
241 GACGGCAGCC CCGACGGCAC CTCGGACGGC ACCCCCGGCC CACCGCCCC CGACGGCAGC
301 CCCGACGGCA CCCCAGGCC GCGCCCCC GACGGCAGCC CTGATGACAA CCCCAGCCCC
361 GACAGCCCTG ACAGCAGCCC TGGCCCGCCG CCCCAGAGG TCACCCCGA TGACACCCC
421 GACGCCACAC CCCGCCCCCT GCCCCCCG GCGGACGCG CCGCGCCCC CCCCAGCC
```

Obrázek 10: Alela 447b
Převzato: Holasová 2011

Alela 498 podle Ito *et al.* (2004)

```
1 TTCTTCCTAC CCTGCCCGCT CATGCTGCTG CTCTACTGGG CCACGTTCG GGGCCTGCGG
61 CGCTGGGAGG CCGCGCGTCG GGCCAAGCTG CACGGCCGGA CACCGCGCAG ACCCAGCGGC
121 CCCGGCCCGC CGCCCCCGA CGGCAGCCCC GACGGCACC CGGACGGCAC CCCAGCCCA
181 CCGCCCCCGG ACGGCAGCCC CGACGGCACC TCGGACGGCA CCCCAGCCCA ACCGCCCCC
241 GACGGCAGCC CCGACGGCAC CTCGGACGGC ACCCCCGGCC CACCGCCCC CGACGGCAGC
301 CCCGACGGCA CCCCAGGCC GCGCCCCC GACGGCAGCC CTGATGACAA CCCCAGCCCC
361 CCGCCCCCTG ACAGCAGCCC TGGCCCGCCG CCCCAGAGG TCACCCCGA TGACACCCC
421 GACGCCACAC CCCGCCCCCT GCCCCCCG GCGGACGCG CCGCGCCCC CCCCAGCC
481 CCTGCAGAGC CCCCAGCC
```

Obrázek 11: Alela 498
Převzato: Holasová 2011

Zelenou barvou v rámečku	jsou označeny primery.	Khaki barvou	VNTR 4 a další v pořadí touto barvou
Samotný Exon 3 genu <i>DRD4</i>	je vyznačen ostatními barvami.	VNTR 8	
Žlutou barvou	je zvýrazněn VNTR 1 a další v pořadí	Šedou barvou	je zvýrazněn VNTR 12
VNTR 5		Tmavě šedou	je zvýrazněn VNTR 13
Červenou barvou	je zvýrazněn VNTR 2	Světle modrou	je zvýrazněn VNTR 14
Růžovou barvou	je zvýrazněn VNTR 3	(Číslování VNTR je převzato taktéž z práce Ito <i>et al.</i> , 2004)	

Obrázek 12: Legenda schémat jednotlivých alel

Převzato: Holasová 2011

Nově byl také objeven polymorfismus v sekvenci exonu I. Polymorfismus exonu I spočíval v inserci/ delecii 24 bp. Exon I kóduje extracelulární část receptoru a nepřepokládá se, že by tato část genu měla mít vliv na jeho vazebné vlastnosti. U většiny plemen byly pozorovány obě alely S i L, výjimku tvořila plemena Hokkaido inu a Shikoku inu, u kterých byla nalezena pouze alela L. V naprosté většině převládala alela L. Alela S se ve vyšší míře vyskytovala u plemene mops (0,871) a toy pudl (0,5) (Ito *et al.* 2004).

V roce 2007 publikovali Hejjas *et al.* (2007) studii, ve které se zabývali vlivem polymorfismu exonu III genu *DRD4* na aktivitu-impulzivitu jedinců plemene německý ovčák. Výběrem jediného plemene se tak snažili vyhnout falešně pozitivním výsledkům, které by mohly být důsledkem různé distribuce alel v sexuálně izolovaných populacích.

Ke stanovení skóre aktivity-impulzivity u psů byl použit speciálně upravený a validovaný dotazník, který vycházel z formuláře předkládaného rodičům při hodnocení ADHD u dětí (ADHD Rating Scale). Dokument obsahoval 7 bodů hodnotících aktivitu-impulzivitu a 6 bodů hodnotících nepozornost. Studie probíhala na dvou skupinách psů chovaných v odlišných podmínkách, jednalo se o služební policejní psy a psy v zájmovém chovu. Dotazník dostali k vyplnění přímo majitelé a psovodi (Hejjas *et al.* 2007).

Hejjas *et al.* indentifikovali u zkoumaného vzorku německých ovčáků 2 alely. Jednalo se o alely 435 (ve studii označovanou jako 2) a 447a (označovanou jako 3a). Frekvence alel a genotypů byla v rovnováze dle Hardy-Weinbergova zákona. V distribuci genotypů mezi skupinami nebyly pozorovány významné rozdíly.

U skupiny policejních psů vykazovali jedinci se dvěma alelami 435 výrazně nižší stupeň aktivity-impulzivity než heterozygotní jedinci nebo ti s genotypem 447a/447a. U skupiny rodinných psů tento jev pozorován nebyl. Tato skutečnost může být důsledkem jednotných podmínek při odchovu policejních psů (stejný způsob výcviku, podmínky ustájení, či podobná úroveň vystavení stresu). U psů v zájmovém chovu může být fenotypový projev polymorfismu genu *DRD4* maskován řadou vnějších faktorů, jako je například přístup majitele ke psovi, různý typ ustájení, či kvalita výcviku (Hejjas *et al.* 2007).

V roce 2013 provedli Wan *et al.* (2013) obdobnou studii zaměřenou na psy plemene sibiřský husky. Volba plemene to nebyla náhodná, huskyové byli pro studii vybráni hned z několika důvodů. Prvním z nich je starověký původ tohoto plemene a jeho vysoká genetická diverzita. Zadruhé jsou sibiřští huskyové velmi často využíváni jako sáňoví psi, závodní jedinci jsou zpravidla chováni v homogenním prostředí. Jednotné podmínky chovu zvířat částečně stírají vliv prostředí na fenotypový projev povahy jedince a usnadňují detekci vztahů mezi

genotypem a povahovými rysy. Třetím důvodem je skutečnost, že genetický profil sibiřských huskyů byl už v minulosti dokumentován.

Tato studie se pokoušela mapovat spojitosti mezi polymorfismy genů *DRD4* a *TH* a stupněm aktivity a impulsivity testovaných jedinců. *TH* gen je genem zodpovědným za kódování tyrozinhydroxylázy, což je enzym, který se zaslouhuje o syntézu dopaminového prekurzoru L-DOPA (Wan et al. 2013).

Studie odhalila u zkoumaného vzorku sibiřských huskyů celkem 7 různých alel exonu III genu *DRD4*. Nejčastěji se v testovaném vzorku objevovaly genotypy 498/498 (ve studii značeno jako 5/5) a 447/498 (ve studii značeno jako 3/5, bez určení, zda se jedná o alelu 447a či 447b). Plemeno sibiřský husky vykazovalo tedy vyšší stupeň polymorfismu než většina ostatních plemen testovaných v předchozích studiích. Zároveň byla u huskyů objevena alela, která byla do té doby pozorována pouze u vlků, což podporuje domněnku, že plemeno bylo v minulosti s vlky kříženo. Zajímavá je také skutečnost, že jediným dalším plemenem s obdobně vysokou variabilitou alel genu *DRD4* bylo v předchozích studiích plemeno Shiba Inu, které je, stejně jako sibiřský husky, považováno za plemeno se starověkým původem (Wan et al. 2013).

Jedinci sibiřských huskyů, kteří ve svém genotypu měli přítomnu alespoň jednu krátkou alelu exonu III genu *DRD4* (1, 2, 3a, 3b, 4), vykazovali vyšší aktivitu v behaviorálním testu a zpravidla také dosahovali vyššího skóre v hodnocení aktivity-impulsivity než jedinci s výhradně dlouhými alelami (5, 8) (Wan et al. 2013).

Na první pohled je patrné, že výsledky studie německých ovčáků, kterou publikovali Hejjas et al. (2007) a výsledky studie sibiřských huskyů od Wan et. al (2013) jsou spolu v rozporu. Kratší alely u německých ovčáků byly spojovány s nižším stupněm aktivity-impulsivity, u huskyů tomu bylo přesně naopak. To ale nemusí značit, že jsou studie chybné. Frekvence alel exonu III genu *DRD4* a jejich asociace s různými povahovými rysy jedince se, stejně jako u lidí, mohou v izolovaných populacích velmi výrazně lišit. Tato skutečnost pouze podtrhuje důležitost dalšího výzkumu v oblasti vztahu genetiky a chování u dalších plemen (Wan et al. 2013).

3.6 Metody molekulární biologie

3.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je *in vitro* metoda umožňující specifickou amplifikaci genů a dalších DNA sekvencí (Mullis et al. 1986; Snustad et al. 2017). Tato převratná metoda byla navržena v roce 1983 biochemikem Kary Mullisem (Mullis et al. 1986). Za patent na tuto metodu obdržel Kary Mullis v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. (Snustad et al. 2017)

Analýza specifických nukleotidových sekvencí, stejně jako mnoho dalších analytických postupů, bývala omezena přítomností balastního materiálu nebo malým množstvím dostupného vzorku. Metoda PCR tato omezení umí obejít. Díky této technice je možné během pár hodin mnohonásobně obohatit vzorek o konkrétní sekvenci DNA (Saiki et al. 1988). Po 30 cyklech PCR se teoreticky vytvoří asi $10^9 \times$ více specifického produktu než ostatních úseků DNA, jejich podíl je tak ve výsledné směsi prakticky zanedbatelný (Snustad et al. 2017).

Výchozím vzorkem pro PCR nemusí být nutně dvouřetězcová DNA, může se jednat i o molekulu jednořetězcové DNA a po jistých úpravách procesu může být použita i RNA. V každém případě ale produktem této techniky bude dvouřetězcová DNA (Mullis et al 1986).

Polymerázová řetězová reakce našla využití v celé řadě oborů například v kriminologii, lékařství, při studiu procesů mutagenese, či detekci mutací a mnoha dalších procesech (Snustad et al. 2017).

3.6.1.1 Princip polymerázové řetězové reakce

Celý proces PCR probíhá ve 3 po sobě se mnohokrát opakujících krocích: denaturace templátové DNA, nasedání specifických primerů na templátovou DNA (annealing) a prodlužování nového řetězce DNA (elongace) (Mullis et al. 1986; Saiki 1988).

Ke zdárnému provedení PCR jsou potřeba následující komponenty: templátová DNA, či RNA obsahující cílovou sekvenci určenou k amplifikaci, pár primerů (krátké oligonukleotidy komplementární ke známým úsekům ohraničujícím cílovou sekvenci), volné deoxynukleotid trifosfáty, enzym termostabilní DNA polymerázy, Mg^{2+} ionty a pufovací roztok. Správnost provedení a efektivita procesu se odvíjí od poměru těchto složek. (Najafov & Hoxhaj 2017).

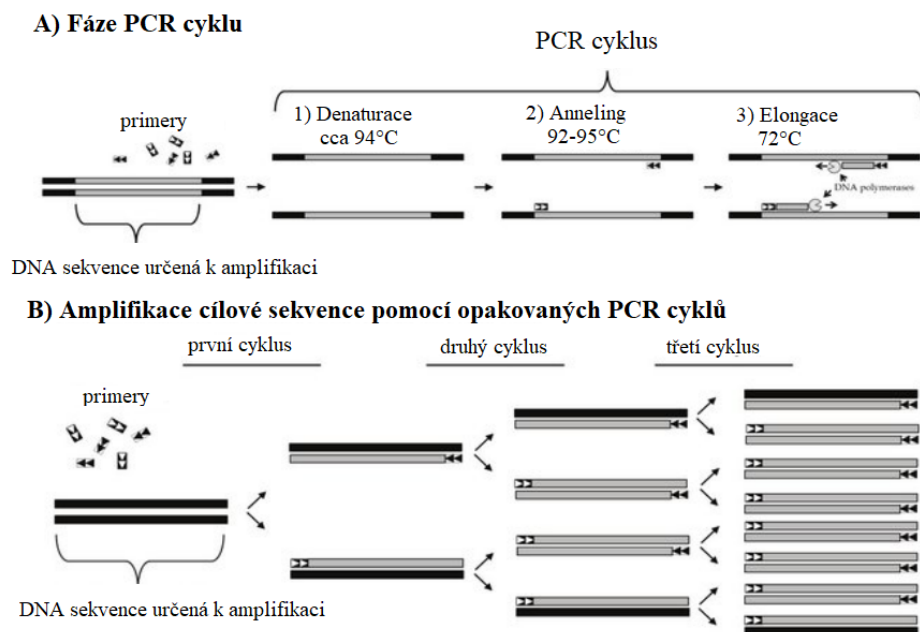
První krok je zahájen denaturací DNA, toho je docíleno zahřátím vzorku na teplotu mezi 92-95 °C po dobu asi 15 s. Při této teplotě dojde k porušení vodíkových můstků a výsledkem je vznik jednořetězcových molekul DNA (Snustad et al. 2017). Konkrétní doba denaturace se odvíjí od délky templátu a procentuálního obsazení G a C v něm (čím vyšší %, tím déle by denaturace měla trvat) (Najafov & Hoxhaj 2017).

Následuje druhý krok, ve kterém se roztok s denaturovanou templátovou DNA ochladí na teplotu mezi 50-60 °C. Tento pokles teploty umožní navázání primerů, kterých je v roztoku nadbytek. Primer je krátký úsek řetězce nukleové kyseliny komplementární ke konkrétní oblasti templátové DNA (Saiki et al. 1988). Primery bývají dlouhé jen pár bází, optimální délka je zpravidla 18-30 nukleotidů. Zvolené primery by měly být komplementární pouze k jedné sekvenci v templátové DNA a neměly by být komplementární mezi sebou. Při výběru primerů se také bere v potaz jejich teplota tání, která by měla být u obou primerů podobná a ideálně mezi 50-80 °C, stabilita na 3' konci a tendence ke vzniku sekundárních struktur, které jsou v tomto případě nežádoucí (Najafov & Hoxhaj 2017). Primer po navázání na templát poskytne volnou 3' hydroxylovou skupinu, která umožňuje navázání dalšího nukleotidu a další prodlužování řetězce. Ideální anelační teplota primeru závisí vždy na jeho délce a složení (Snustad et al. 2017).

Třetí a zároveň poslední fází celého cyklu je zahřátí směsi na teplotu, která aktivuje enzym polymerázy (nejčastěji 72 °C). Díky tomu mohou být do nově vznikajícího řetězce zabudovávány volné nukleotidy, dochází tedy k jeho prodlužování (elongaci). Tato fáze trvá obvykle 90 s. Tímto je ukončen první cyklus. Nově nasyntetizovaná DNA se stává templátem pro příští kolo. Proces se mnohokrát opakuje, obvyklý počet cyklů je mezi 15 a 30. Amplifikace probíhá geometrickou řadou, z jediné dvoušroubovice DNA tak může po 30 cyklech vzniknout přes miliardu kopií. (Snustad et al. 2017).

Dříve byla pro PCR využívána polymeráza izolovaná z bakterie *Escherichia Coli*. Vzhledem k tomu, že je ale při každém cyklu dosaženo teploty, která DNA polymerázu *E. coli* denaturuje a inaktivuje, bylo nutné ji na začátku každého kola přidávat manuálně. Brzy

po vynálezu PCR, byla ale izolována termostabilní DNA polymeráza, která je dnes známá pod názvem Taq. Tento enzym byl izolován z termofilní aerobní bakterie *Thermus aquaticus* vyskytující se v horkých pramenech. Taq postrádá 3'→5' korekční aktivitu a četnost mutací při replikaci je proto poměrně vysoká (Saiki et al. 1988). V případech, kdy je vyžadována exaktnost, jsou z tohoto důvodu pro PCR využívány polymerázy s 3'→5' korekční aktivitou např. Pfu (izolovaná z *Pyrococcus furiosus*) nebo Pwo (z *Pyrococcus woesei*), které vykazují až 10× vyšší přesnost než Taq polymeráza (Cline et al. 1996).



Obrázek 13: Schématické znázornění PCR

Upraveno podle: Yilmaz et al. 2012

3.6.2 Restrikční štěpení PCR produktů

V roce 1970 izolovali Smith a Wilcox enzym z bakterie *Haemophilus influenzae*, čímž způsobili revoluci v molekulární biologii. Jednalo se totiž o enzym restrikční endonukleázy, která na rozdíl od řady dalších endonukláz neštěpí DNA náhodně, ale pouze v restrikčních sekvencích. Tato restrikční místa bývají obvykle tvořena 4 až 8 nukleotidy a mívají palindromatický charakter. Výraz palindrom označuje sekvenci nukleotidů, která se čte stejně popředu i pozpátku (Snustad et al. 2017).

Restriktázy jsou přirozeným produktem bakterií, kterým pomáhají chránit jejich genetický materiál. Cílová sekvence ve vlastní DNA je totiž methylována, proto na ní enzym nemá účinek. Pokud ale do organismu vnikne cizorodá DNA, která tyto úseky methylované nemá, restriktáza ji degraduje (Snustad et al. 2017).

Schopnosti restrikčních endonukláz je hojně využíváno i v některých molekulárně diagnostických metodách. Testovaná molekula je nejdříve amplifikována pomocí PCR a následně je štěpena příslušným enzymem. Pomocí elektroforézy na agarovém gelu lze pak snadno rozlišit alelu s mutací v restrikčním místě od alely nezmutované (Snustad et al. 2017).

4 Metodika

4.1 Zkoumané genotypy

Pro účely této práce byly vyhodnocovány vzorky 50 jedinců plemene německý ovčák (24 fen a 26 psů). Všichni testovaná jedinci pocházeli z chovatelské stanice Policie ČR, jednalo se tedy o služebně upotřebené psy chované v homogenních podmínkách. Tyto výsledky byly následně porovnány s dostupnými data 100 jedinců dalších dvou plemen. Jednalo o 50 jedinců plemene bearded kolie obou pohlaví (26 fen a 24 psů) a 50 jedinců plemene border kolie (25 fen a 25 psů).

Ve všech případech se jednalo o jedince s průkazem původu a z etických důvodů jsou v bakalářské práci uvedeni anonymně.

4.2 Izolace DNA

Genomická DNA byla izolována ze stěrů buněk bukalní sliznice testovaných psů. Stěry prováděli sami chovatelé pomocí sterilních cytologických kartáčků. Pro zamezení kontaminace vzorku, bylo nutné držet zvíře nejméně půl hodiny před odběrem na lačno. Samotný odběr vzorku probíhal vsunutím sterilního kartáčku do dutiny ústní, kde byla krouživými pohyby setřena vnitřní epitelární strana tváře. Po celou dobu odběru bylo nutné s kartáčkem manipulovat tak, aby nepřišel do kontaktu s ničím jiným než vnitřkem úst testovaného jedince. Po odběru bylo nutné nechat kartáček zachnout a následně vložit do sterilní zkumavky, která byla řádně označena pro účely další identifikace. Takto připravené vzorky byly uschovány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

K odběru DNA byly použity kity NucleoSpin® Tissue XS výrobcem doporučeným postupem.

4.3 Amplifikace a fragmentační analýza

4.3.1 Primery pro PCR

Pro amplifikaci exonu III genu *DRD4* pomocí PCR byly použity dvojice primerů, které ve své práci navrhli Ito et al. (2004). Jedná se o primery D4FFAM, D4DogR5A a D4DogBR5A. Primer D4FFAM byl označen fluorescenční barvou 6 -FAM™ (Applied Biosystems). Dvojice použitých primerů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Použité primery

Název primeru	Sekvence	Zdroj
D4FFAM	5'-TTCTTCCTACCCTGCCCCGCTCATG-3'	Ito et al. 2004
D4DogR5A	5'-CCGCGGGGGCTCTGCAGGGTCG-3'	
D4FFAM	5'-TTCTTCCTACCCTGCCCCGCTCATG-3'	Ito et al. 2004
D4DogBR5A	5'-TGGGCTGGGGGTGCCGTCC-3'	

4.3.2 První amplifikace

Optimalizovaná reakční směs o objemu 12,5 μ l měla následující složení:

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro první amplifikaci

Složka	Koncentrace
Templátová DNA	50 ng
Pfu polymeráza (Fermentas)	1,25 U \cdot 12,5 μ l ⁻¹
BSA	0,1 mg \cdot 12,5 μ l ⁻¹
Tris-HCL (pH=8,8)	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
KCL	10 mM
Triton X-100	0,10 %
MgSO ₄ ,	2 mM
dATP	250 μ M
dCTP	250 μ M
dTTP	250 μ M
dGTP	125 μ M
7-deáza-dGTP	125 μ M
primer D4FFAM	0,5 μ M
primer D4DogR5A	0,5 μ M
tetramethylamonium oxalát (Top Bio)	2 mM

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) za následujících podmínek:

Tabulka 3: Podmínky amplifikace

Fáze	Teplota	Doba trvání	Počet cyklů
Iniciace	98 °C	2 min	1
Denaturace	98 °C	30 s	35
Annealing	65 °C	1 min	
Elongace	74 °C	1 min	
Finální elongace	74 °C	10 min	1

4.3.3 Fragmentační analýza alel genu DRD4

Stanovení velikosti produktů PCR proběhlo pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM® 310 (Applied Biosystems). Po amplifikaci byly vzorky naředěny ddH₂O v poměru 49:1. Z takto naředěných vzorků byl 1 μl roztoku přenesen do nové zkumavky. Do zkumavky bylo poté přidáno 14,2 μl roztoku skládajícího se ze 14 μl Hi – Di formamidu a 0,2 μl velikostního standardu GeneScan™ – 600 Liz® Size Standard (Applied Biosystems). Velikostní standard pomáhá stanovit velikost amplifikovaných alel. Reakční směsi byly denaturovány v termocykleru při teplotě 95 °C po dobu 5 minut a následně prudce zchlazeny na teplotu 4 °C. Takto připravené vzorky bylo možné použít pro fragmentační analýzu.

Pro fragmentační analýzu tandemových repetitiv byl použit polymer POP4 (Applied Biosystems) s filtrem G5. Hodnota napětí pro nástřik vzorků byla 5 kV a doba trvání nástřiku 5 s. Samotná separace probíhala za napětí 15 kV, při konstantní teplotě 15 °C po dobu 33 minut. Výstupy analýzy automaticky zaznamenával program GeneMapper 4 .1 (Applied Biosystems). Pomocí tohoto programu byla následně stanovena i velikost amplifikovaných alel.

4.3.4 Druhá amplifikace

Protože jsou sekvence alel 447a a 447b stejně dlouhé, je k jejich rozlišení potřeba nutná druhá PCR amplifikace za použití jiného R primeru. Díky této druhé amplifikaci vznikají dva rozdílně dlouhé snadno rozlišitelné produkty. Jedná se o sekvenci dlouhou 150 bp v případě alely 447a a 162 bp v případě alely 447b (Ito et al. 2004).

Optimalizovaná reakční směs o objemu 12,5 μl měla následující složení:

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro druhou amplifikaci

Složka	Koncentrace
Templátová DNA	50 ng
Pfu polymeráza (Fermentas)	1,25 U · 12,5 μl ⁻¹
BSA	0,1 mg · 12,5 μl ⁻¹
Tris-HCL (pH=8,8)	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
KCL	10 mM
Triton X-100	0,10 %
MgSO ₄ ,	2 mM
dATP	250 μM
dCTP	250 μM
dTTP	250 μM
dGTP	125 μM
7-deáza-dGTP	125 μM
primer D4FFAM	0,5 μM
primer D4DogBR5A	0,5 μM
tetramethylamonium oxalát (Top Bio)	2 mM

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) za těchto podmínek:

Tabulka 5: Podmínky amplifikace

Fáze	Teplota	Doba trvání	Počet cyklů
Iniciace	98 °C	2 min	1
Denaturace	98 °C	30 s	35
Annealing	65 °C	1 min	
Elongace	74 °C	1 min	
Finální elongace	74 °C	10 min	1

5 Výsledky

Tabulka 6 obsahuje přehled zjištěných genotypů u všech testovaných jedinců plemene německý ovčák. Tabulky 7 a 8 obsahují data týkající se plemen bearded kolie a border kolie.

Tabulka 6: Výsledky – německý ovčák

Vzorek	Pohlaví	Barva	Srst	Genotyp
1	pes	vlkošedá	krátká	447a/447a
2	pes	vlkošedá	krátká	447a/447b
3	pes	vlkošedá	krátká	435/447a
4	pes	vlkošedá	krátká	447a/447a
5	pes	vlkošedá	krátká	447a/447b
6	fena	vlkošedá	krátká	447a/447b
7	fena	černá se znaky	krátká	447a/447a
8	fena	černá se znaky	krátká	447a/447a
9	pes	černá se znaky	krátká	447a/447a
10	pes	černá se znaky	krátká	447a/447a
11	fena	vlkošedá	krátká	447a/447a
12	fena	vlkošedá	krátká	435/447b
13	fena	vlkošedá	krátká	447a/447a
14	fena	vlkošedá	krátká	447a/447b
15	fena	vlkošedá	krátká	447a/447a
16	pes	černá se znaky	krátká	447a/447a
17	fena	černá se znaky	krátká	435/447a
18	pes	vlkošedá	krátká	447a/447a
19	pes	vlkošedá	krátká	447a/447b
20	pes	černá se znaky	krátká	435/447b
21	pes	vlkošedá	krátká	447a/447a
22	pes	černá se znaky	krátká	447a/447a
23	fena	černá se znaky	krátká	447a/498
24	fena	černá se znaky	krátká	447a/447a
25	fena	vlkošedá	krátká	447a/447a
26	pes	vlkošedá	krátká	447a/447a
27	fena	vlkošedá	krátká	447a/447a
28	fena	vlkošedá	krátká	447a/447a
29	pes	černá se znaky	krátká	435/447a
30	fena	černá se znaky	krátká	447a/447a
31	fena	vlkošedá	krátká	447a/447a
32	fena	černá se znaky	krátká	447a/447b
33	pes	vlkošedá	krátká	447a/447b
34	pes	černá se znaky	krátká	435/447a
35	pes	vlkošedá	krátká	447a/447a
36	pes	vlkošedá	krátká	447a/447a
37	pes	černá se znaky	krátká	435/447a
38	fena	vlkošedá	krátká	447a/447a
39	fena	vlkošedá	krátká	447a/498

40	pes	černá se znaky	krátká	447a/447a
41	pes	černá se znaky	krátká	447a/447a
42	fena	černá se znaky	krátká	447a/447a
43	fena	vlkošedá	krátká	447a/447a
44	fena	vlkošedá	krátká	447a/447a
45	pes	vlkošedá	krátká	435/447a
46	fena	černá se znaky	krátká	447a/447b
47	pes	černá se znaky	krátká	447a/447a
48	pes	vlkošedá	krátká	447a/447a
49	pes	vlkošedá	krátká	447a/447a
50	fena	vlkošedá	krátká	447a/447b

Tabulka 7: Výsledky – bearded kolie

Vzorek	Pohlaví	Barva	Srst	Genotyp
1	fena	černo-bílá	dlouhá	435/498
2	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
3	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/498
4	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/498
5	pes	hnědo-bílá	dlouhá	447a/447a
6	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
7	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
8	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
9	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/498
10	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
11	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/498
12	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
13	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
14	fena	modro-bílá	dlouhá	447a/498
15	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
16	fena	hnědo-bílá	dlouhá	447a/447a
17	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
18	fena	černo-bílá	dlouhá	435/447a
19	pes	černo-bílá	dlouhá	498/498
20	fena	modro-bílá	dlouhá	447a/447b
21	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
22	fena	černo-bílá	dlouhá	435/447a
23	pes	černo-bílá tricolor	dlouhá	447a/447a
24	fena	modro-bílá	dlouhá	447a/498
25	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/498
26	pes	modro-bílá	dlouhá	447a/498
27	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
28	pes	hnědo-bílá	dlouhá	447a/447a
29	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
30	pes	plavo-bílá	dlouhá	447a/447a

31	fena	hnědo-bílá	dlouhá	447a/498
32	fena	modro-bílá	dlouhá	447a/498
33	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
34	pes	hnědo-bílá	dlouhá	447a/498
35	fena	modro-bílá	dlouhá	435/447b
36	fena	modro-bílá	dlouhá	447a/447a
37	fena	černo-bílá tricolor	dlouhá	447a/498
38	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
39	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447b
40	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/498
41	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/498
42	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
43	pes	hnědo-bílá	dlouhá	447a/447a
44	pes	hnědo-bílá	dlouhá	447a/498
45	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
46	pes	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
47	pes	černo-bílá	dlouhá	435/498
48	fena	černo-bílá	dlouhá	447a/447a
49	pes	hnědo-bílá	dlouhá	447a/447a
50	pes	modro-bílá	dlouhá	447a/498

Tabulka 8: Výsledky – border kolie

Vzorek	Pohlaví	Barva	Srst	Genotyp
1	fena	černobílá	dlouhá	435/447a
2	fena	černobílá	dlouhá	435/447a
3	pes	černobílá	dlouhá	447a/447a
4	pes	tricolor	dlouhá	447a/447a
5	pes	hnědobílá	dlouhá	447a/447a
6	pes	hnědobílá	dlouhá	447a/447a
7	pes	hnědobílá	dlouhá	435/447a
8	fena	černobílá	dlouhá	435/447a
9	fena	tricolor	dlouhá	435/447a
10	fena	černobílá	dlouhá	447a/447a
11	pes	hnědobílá s pálením	dlouhá	447a/447a
12	fena	dark sable	dlouhá	435/447a
13	fena	černobílá	dlouhá	447a/447a
14	pes	sable merle	dlouhá	435/447a
15	pes	blue merle	dlouhá	435/498
16	fena	černobílá	dlouhá	447a/447a
17	pes	hnědobílá s pálením	dlouhá	447a/447a
18	fena	černobílá	dlouhá	435/447a
19	pes	černobílá	dlouhá	435/447b

20	fena	černobílá	dlouhá	447b/447b
21	pes	černobílá	dlouhá	435/447a
22	fena	černobílá	dlouhá	447a/447a
23	pes	hnědobílá s pálením	dlouhá	447a/447a
24	fena	černobílá	dlouhá	435/447a
25	fena	černobílá	dlouhá	447a/447a
26	fena	blue merle	dlouhá	447a/447a
27	pes	černobílá	dlouhá	447a/447a
28	fena	černobílá	dlouhá	447b/498
29	fena	černobílá	dlouhá	435/447a
30	pes	černobílá	dlouhá	447b/498
31	fena	černobílá	dlouhá	447b/498
32	pes	tricolor	dlouhá	447a/447a
33	pes	černobílá	dlouhá	447b/498
34	pes	černobílá	dlouhá	447a/447a
35	fena	černobílá	dlouhá	435/498
36	pes	černobílá	dlouhá	447a/447a
37	pes	tricolor	dlouhá	447a/447a
38	fena	černobílá	dlouhá	447a/447a
39	pes	modrobílá	dlouhá	447b/498
40	fena	hnědobílá s pálením	dlouhá	447a/447b
41	fena	černobílá	dlouhá	447a/447b
42	fena	blue merle	dlouhá	447a/447b
43	pes	černobílá	dlouhá	435/447b
44	fena	černobílá	dlouhá	447b/447b
45	pes	černobílá	dlouhá	447a/447b
46	fena	černobílá	dlouhá	447a/447a
47	fena	černobílá	dlouhá	435/447a
48	pes	černobílá	dlouhá	435/447a
49	pes	černobílá	dlouhá	447a/447a
50	pes	černobílá	dlouhá	447a/447a

5.1 Statistické vyhodnocení

Na základě získaných dat byla vypočtena skutečná a relativní frekvence genotypů a alel pro každé plemeno.

Tabulka 9: Frekvence genotypů skutečná

Genotyp	Bearded kolie (n)	Border kolie (n)	Německý ovčák (n)
435/447a	2	13	6
435/447b	1	2	2
435/498	2	2	0
447a/447a	26	22	31
447a/447b	2	4	9
447a/498	16	0	2
498/498	1	0	0
447b/447b	0	2	0
447b/498	0	5	0

Tabulka 10: Frekvence genotypů relativní

Genotyp	Bearded kolie	Border kolie	Německý ovčák
435/447a	4 %	26 %	12 %
435/447b	2 %	4 %	4 %
435/498	4 %	4 %	0 %
447a/447a	52 %	44 %	62 %
447a/447b	4 %	8 %	18 %
447a/498	32 %	0 %	4 %
498/498	2 %	0 %	0 %
447b/447b	0 %	4 %	0 %
447b/498	0 %	10 %	0 %

Tabulka 11: Frekvence alel

Alela	Bearded kolie	Border kolie	Německý ovčák
435	5 %	17 %	8 %
447a	72 %	61 %	79 %
447b	3 %	15 %	11 %
498	20 %	7 %	2 %

U všech plemen byly detekovány celkem 4 alely genu *DRD4*. Jednalo se o alely 435, 447a, 447b a 498, které vytvářely v rámci plemen různě četné homozygotní i heterozygotní sestavy. Nejhoněji zastoupenou alelou byla napříč plemeny alela 447a, která se také nejčastěji vyskytovala v homozygotní sestavě.

V rámci plemene bearded kolie bylo detekováno celkem 7 genotypů. Jednalo se o genotypy v homozygotních sestavách 447a/447a a 498/498 a v heterozygotních sestavách 435/447a, 435/447b, 435/498, 447a/447b a 447a/498.

U plemene border kolie bylo pozorováno rovněž 7 genotypů. Konkrétně se jednalo o homozygotní genotypy 447a/447a a 447b/447b a heterozygotní genotypy 435/447a, 435/447b, 435/498, 447a/447b a 447b/498.

U plemene německý ovčák bylo narozdíl od předchozích plemen detekováno pouze 5 různých sestav. Jednalo se o homozygotní sestavu 447a/447a heterozygotní sestavy 435/447a, 435/447b, 447a/447b a 447a/498.

Frekvence výskytu alel a genotypů u jednotlivých plemen byly následně mezi sebou porovnány χ^2 -testem, který slouží ke statistickému hodnocení shody mezi očekávanými a pozorovanými hodnotami. Hodnota χ^2 je vypočítána pomocí následujícího vzorce:

$$\chi^2_N = \sum \frac{(x_i - e_i)^2}{e_i}$$

x_i = naměřené (zjištěné) hodnoty

e_i = očekávané hodnoty

N = stupeň volnosti, $N = n-1$

n = počet sčítanců (počet genotypových tříd)

Tabulka 12: Porovnání frekvencí alel genu *DRD4* u různých plemen pomocí χ^2 -testu

	Bearded kolie	Border kolie	Německý ovčák
Bearded kolie	-	$\chi^2 = 44,19705$; $p = 0,00000$	$\chi^2 = 169,563$; $p = 0,00000$
Border kolie	$\chi^2 = 44,19705$; $p = 0,00000$	-	$\chi^2 = 28,181$; $p = 0,00003$
Německý ovčák	$\chi^2 = 169,563$; $p = 0,00000$	$\chi^2 = 28,181$; $p = 0,00003$	-

Tabulka 13: Porovnání frekvencí genotypů genu *DRD4* u různých plemen pomocí χ^2 -testu

	Bearded kolie	Border kolie	Německý ovčák
Bearded kolie	-	$\chi^2 = 37,070$; $p = 0,00001$	$\chi^2 = 214,835$; $p = 0,00000$
Border kolie	$\chi^2 = 37,070$; $p = 0,00001$	-	$\chi^2 = 31,115$; $p = 0,00013$
Německý ovčák	$\chi^2 = 214,835$; $p = 0,00000$	$\chi^2 = 31,115$; $p = 0,00013$	-

Z výpočtů jasně vyplývá, že pozorovaná plemena se liší v zastoupení alel i genotypů exonu III genu *DRD4*.

Data získaná v této práci byla následně porovnána také s daty z předchozích studií zahrnujících německé ovčáky (Ito et al. 2004; Hejjas et al. 2007). V Tabulce 14 jsou shrnuty frekvence výskytu nalezených alel v této bakalářské práci a ve zmíněných studiích.

Tabulka 14: Frekvence alel exonu III genu *DRD4* zjištěné u německého ovčáka v bakalářské práci a v předchozích studiích

Alela	BP	Ito et al. 2004	Hejjas et al. 2007
435	8 %	58 %	64,73 %
447a	79 %	36 %	35,3 %
447b	11 %	2 %	0 %
498	2 %	4 %	0 %

Tyto frekvence výskytu alel pro plemeno německý ovčák byly mezi sebou rovněž porovnány χ^2 -testem.

Tabulka 15: Porovnání zjištěné frekvence alel vůči předchozím studiím

	Ito et al. 2004	Hejjas et al. 2007
BP	$\chi^2 = 345,269$; $p = 0,00000$	$\chi^2 = 439,460$; $p = 0,00000$

Pozorované výsledky této práce se neprolínají s předchozími výsledky studií genu *DRD4* u německých ovčáků.

6 Diskuze

Tato bakalářská práce se zabývá polymorfismem exonu III genu *DRD4* u psů a vychází z již publikovaných studií na toto téma. Na problematiku je nahlíženo z pohledu případného využití těchto poznatků v oblasti selekce psů pro výcvik k asistenčním účelům.

Gen *DRD4* má vliv na postsynaptické působení dopaminu, předpokládá se proto, že ovlivňuje psychické vlastnosti lidí i zvířat. Hlavním místem zájmu studií je především jeho exon III, který ovlivňuje vazebné schopnosti kódovaného dopaminového receptoru.

Práce čerpá z poznatků autorů Ito et al. (2004), Hejjas et al. (2007) a Wan et al. (2013), kteří již hledali souvislosti mezi genotypem sledovaného markeru a jeho vlivem na fenotypový projev povahy jedince. Z těchto studií jasně vyplývá, že frekvence alel i genotypů se v různých populacích velmi výrazně liší a je tedy ovlivněna plemennou příslušností. Studie, kterou v roce 2013 publikovali Wan et al. (2013) dokonce naznačuje, že se mezi jednotlivými plemeny různí i fenotypový projev stejných genotypů, což je jev, se kterým se u genu *DRD4* můžeme setkat i v populacích lidských.

Autoři zmíněných studií se domnívají, že majoritní vliv na variabilitu genu *DRD4* v rámci plemen má jejich prošlechtěnost a původ. Plemena starobylá vykazují variabilitu vyšší než plemena, která vznikala až v pozdější fázi šlechtění.

Cílem této práce bylo provést genotypizaci 50 vzorků plemene německý ovčák a následně tyto výsledky statisticky porovnat s dostupnými daty pro další dvě plemena psů a s výsledky přechozích výzkumů publikovaných autory Ito et al. (2004) a Hejjas et al. (2007).

Data získaná v této práci potvrdila domněnku, že jednotlivá plemena se mezi sebou významně liší v zastoupení alel i genotypů exonu III genu *DRD4*.

U německých ovčáků byly nalezeny celkem 4 alely (viz Tabulka 11), tyto shodné alely byly nalezeny i ve studii autorů Ito et al. (2004). Oproti výzkumu autorů Hejjas et al. (2007) obsahoval vzorek německých ovčáků také alely 447b a 498.

V této bakalářské práci byla hodnocena skupina německých ovčáků pocházejících z chovatelské stanice policejních psů. Hejjas et al. (2007) ve své práci porovnávali mezi sebou německé ovčáky z kategorie služebních a rodinných psů. Tito autoři zjistili u skupiny policejních psů vyšší stupeň aktivity-impulzivity a současně převažující frekvenci alely 435 nad alelou 447. V rámci kolekce testovaných jedinců v této bakalářské práci ale výrazně dominovala alela 447a (79 %). Tato skutečnost může indikovat to, že pro práci služebních psů bývají preferováni psi s výraznějším aktivně-impulzivním chováním.

Po porovnání pomocí χ^2 -testu se ani ostatní zjištěné frekvence alel neshodovaly s frekvencemi alel z předchozích studií. Důvodem tohoto jevu by mohl být příliš malý vzorek testovaných psů, a to jak v této práci, tak i ve studiích předchozích. Ve výzkumu kolektivu Ito et al. (2004) čítal vzorek německých ovčáků 25 jedinců, ve studii autorů Hejjas et al. 241 jedinců (2007) a v této bakalářské práci 50 jedinců. Genotypizaci by tedy bylo vhodné podrobit větší vzorek psů.

Ito et al. (2004) prisuzovali ve své studii psům s vyšší frekvencí výskytu alel 435 a 447a kromě okcidentálního původu také vyšší stupeň reaktivity a nižší stupeň agresivity. Všechna zkoumaná plemena mají původ v evropských zemích a zmíněné alely se ve vyšší frekvenci objevovaly u všech 3 plemen (viz Tabulka 11). Z plemenného standardu i z podstaty práce asistenčních psů jasně vyplývá, že jedinci zmíněných plemen nemají jevit známky agrese,

naopak mají být vůči člověku velmi vstřícní a přátelští, snadno ovladatelní, živí a bystří. Výsledky bakalářské práce tedy s touto domněnkou korespondují.

7 Závěr

Literární přehled této práce byl zaměřen na souhrn poznatků týkajících se polymorfismu genu *DRD4* a jeho vztahu k behaviorálním rysům psů. Přehled také shrnuje základní argumenty podtrhující význam těchto studií pro oblast výcviku asistenčních psů.

V experimentální části byla provedena genotypizace exonu III genu *DRD4* u 50 jedinců psů plemene německý ovčák. Výsledky byly následně statisticky porovnány s dostupnými daty dalších dvou plemen psů využívaných pro asistenční účely (bearded kolie a border kolie) a s frekvencemi alel u německých ovčáků získaných z přechozích studií.

Výsledky práce jsou uvedeny v následujících bodech:

- Exon III genu *DRD4* vykazoval u plemene německý ovčák mnohotný alelismus. Ve vzorku testovaných jedinců byly pozorovány celkem 4 různé alely (435, 447a, 447b a 498). Tento výsledek potvrdil platnost první vědecké hypotézy.
- Frekvence alel se při porovnání mezi různými plemeny významně lišila. Tyto rozdíly byly statisticky významné (χ^2 hladina významnosti 0,05). Statistická analýza tudíž potvrdila platnost druhé vědecké hypotézy.
- Pozorovaná frekvence alel exonu III genu *DRD4* u německých ovčáků se neshodovala s frekvencemi alel z předchozích studií (Ito et al. 2004; Hejjas et al. 2007). U hodnoceného vzorku policejních psů byla pozorována majoritní frekvence alely 447a. Ta bývá u německých ovčáků dávána do souvislosti s vyšším skóre pro aktivitu-impulsivitu, kterou je možné u služebních psů předpokládat. Tudíž i třetí hypotéza zaměřená na vztah mezi strukturou dopaminového receptoru a chováním psů byla nepřímo potvrzena.

Pro další výzkum by bylo vhodné do studie zařadit vyšší počet testovaných jedinců. Podrobnější studie vztahu genu *DRD4* k behaviorálním rysům jednotlivých plemen pracovně využívaných psů by mohly poskytnout chovatelům nástroj, který by umožňoval ranou selekci vhodných jedinců k různým účelům v závislosti na požadovaných vlastnostech.

Tradiční selekční metody jako je například testování temperamentu štěňat, nedokážou predikovat úspěšnost dospělého pracovního psa dostatečně přesně a organizace zabývající se výcvikem asistenčních psů už nyní hledají způsoby, jak tyto brzké selekce zpřesnit.

V současné době mohou chovatelé své psy podrobit široké škále genetických testů, které jsou zaměřeny především na vady fyzického charakteru, v budoucnosti by mohlo být obdobné testování dostupné i pro behaviorální rysy.

8 Literatura

Audrestch HM, Whelan CT, Grice D, Asher L, England GCW, Freeman SL. 2015. Recognizing the value of assistance dogs in society. *Disability and Health Journal* **8** :469-474.

Blaschko H. 1942. The activity of l (—)-dopa decarboxylase. *The Journal of Physiology* **3** :337–349.

Bressan RA, Crippa JA. 2005. The role of dopamine in reward and pleasure behaviour – review of data from preclinical research. *Acta Psychiatrica Scandinavica* **111**:14-21.

Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B. 1958. On the Presence of 3 - Hydroxytyramine in Brain. *Science* **127**:471-471.

Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. 1996. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **24**:3546-3551.

Cosentino M, Marino F, Maestroni GJM. 2015. Sympathoadrenergic modulation of hematopoiesis: a review of available evidence and of therapeutic perspectives. *Frontiers in Cellular Neuroscience* (e00302) DOI: 10.3389/fncel.2015.00302

Curran S, Mill J, Sham P, Rijdsdijk F, Marusic K, Taylor E, Asherson P. 2001. QTL association analysis of the *DRD4* exon 3 VNTR polymorphism in a population sample of children screened with a parent rating scale for ADHD symptoms. *American Journal of Medical Genetics* **105**:387-393.

Ding YC et al. 2001. Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**:309-314.

Drtílková I, Šerý O, Balaščíková B, Theiner P, Uhrová A, Táčková M. 2007. *Hyperkinetická porucha a poruchy chování / ADHD*. Galén, Praha.

Duffy DL, Serpell JA. 2012. Predictive validity of a method for evaluating temperament in young guide and service dogs. *Applied Animal Behaviour Science* **138**:99-109.

Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA. 1999. Dopamine D4 Receptor-Knock-Out Mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *Journal of Neuroscience* **19(21)**:9550–9556.

Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M, Belmaker RH. 1996. Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nature Genetics* **12**:78-80.

Elsworth JD, Roth RH. 1997. Dopamine Synthesis, Uptake, Metabolism, and Receptors: Relevance to Gene Therapy of Parkinson's Disease. *Experimental Neurology* **144**:4-9.

Faraone SV, Biederman J. 1998. Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry* **44**:951-958.

Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P. 2005. Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biological Psychiatry* **57**:1313-1323.

FCI. 2009. FCI-Standard N ° 297 BORDER COLLIE. FCI. Available from <http://www.fci.be/en/nomenclature/BORDER-COLLIE-297.html> (accessed January 2019).

FCI. 2010. FCI-Standard N °166 GERMAN SHEPHERD DOG (Deutscher Schäferhund). FCI. Available from <http://www.fci.be/en/nomenclature/GERMAN-SHEPHERD-DOG-166.html> (accessed January 2019).

FCI. 2015. FCI-Standard N °271 BEARDED COLLIE. FCI. Available from <http://www.fci.be/en/nomenclature/BEARDED-COLLIE-271.html> (accessed January 2019).

Galetová Z. 2008. Problematika asistenčních psů v ČR. Výzkumný ústav práce a sociálních věcí, Praha.

Gelernter J, Kranzler H, Coccaro E, Siever L, New A, Mulgrew CL. 1997. D4 Dopamine-Receptor (*DRD4*) Alleles and Novelty Seeking in Substance-Dependent, Personality-Disorder, and Control Subjects. *The American Journal of Human Genetics* **61**:1144-1152.

Hejjas K, Vas J, Topal J, Szantai E, Ronai Z, Szekely A, Kubinyi E, Horvath Z, Sasvari-Szekely M, Miklosi A. 2007. Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs. *Animal Genetics* **38**:629-633.

Holasová L. 2011. Polymorfismus genu pro dopaminový receptor D4 u plemene border kolie [Diplomová práce]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

Holmes J, Payton A, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Ollier W, Wortington J, Thapar A. 2000. A family-based and case-control association study of the dopamine D4 receptor gene and dopamine transporter gene in attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular Psychiatry* **5** :523-530.

Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pakstis AJ, Kidd KK. 1996. The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Human Genetics* **98**:91-101.

Ito H et al. 2004. Allele Frequency Distribution of the Canine Dopamine Receptor D4 Gene Exon III and I in 23 Breeds. *Journal of Veterinary Medical Science* **66**:815-820.

Iversen SD, Iversen LL. 2007. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends in Neurosciences* **30**:188-193.

Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG. 1996. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* **35**:1503-1519.

Jovanovic V, Guan HC, Van Tol HHM. 1999. Comparative pharmacological and functional analysis of the human dopamine D4.2 and D4.10 receptor variants. *Pharmacogenetics* **9**:561-568.

Kašička V. 1997. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* **91**:320-329. Praha.

Langley K, Fowler TA, Grady DL, Moyzis RK, Holmans PA, van den Bree MBM, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A. 2009. Molecular genetic contribution to the developmental course of attention-deficit hyperactivity disorder. *European Child & Adolescent Psychiatry* **18**:26-32.

Leung PWL et al. 2005. Dopamine receptor D4 (*DRD4*) gene in Han Chinese children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): Increased prevalence of the 2-repeat allele. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* **133B**:54-56.

Livak KJ, Rogers J, Lichter JB. 1995. Variability of dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene sequence within and among nonhuman primate species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**:427-431.

Missale C, Srusel N, Robinson S, Mohame J, Marg C. 1998. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* **78**:189-225.

Momozawa Y, Takeuchi Y, Kusunose R, Kikusui T, Mori Y. 2005. Association between equine temperament and polymorphisms in dopamine D4 receptor gene. *Mammalian Genome* **16**:538-544.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**:263-273.

Najafov A, Hoxhaj G. 2017. PCR Guru: An Ultimate Benchtop Reference for Molecular Biologists. Academic Press, Chippenham.

Niimi Y. 2001. Breed Differences in Allele Frequency of the Dopamine Receptor D4 Gene in Dogs. *Journal of Heredity* **92**:433-435.

Niimi Y, Inouw-Murayama M, Murayama Y, Ito S, Iwasaki T. 1999. Allelic Variation of the D4 Dopamine Receptor Polymorphic Region in Two Dog Breeds, Golden Retriever and Shiba. *Journal of Veterinary Medical Science* **61**:1281-1286.

Oak JN, Oldenhof J, Van Tol HHM. 2000. The dopamine D4 receptor: one decade of research. *European Journal of Pharmacology* **405**:303-327.

Parenti L, Wilson M, Foreman AM, Wirth O, Meade BJ. 2015. Selecting Quality Service Dogs: Part 1: Morphological and Health Considerations. *APDT Chron Dog* **2015(summer)**:71-77.

Rintala DH. 2008. Effects of assistance dogs on persons with mobility or hearing impairments: A pilot study. *The Journal of Rehabilitation Research and Development* **45**:489-504.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.

Service Dog Certifications. 2018. Do Border Collies Make Good Service Dogs? US Service Dog Certifications. Available from <https://www.servicedogcertifications.org/border-collies-service-dogs/> (accessed March 2019).

Snustad DP, Simmons MJ, Relichová J. 2017. *Genetika, Druhé, aktualizované vydání*. Masarykova univerzita, Brno.

Thapar A, Harrington R, Ross K, McGuffin P. 2000. Does the Definition of ADHD Affect Heritability?. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* **39**:1528-1536.

Tučímková J. 2019. O plemeni. Border Collie Club Czech Republic. Available from <https://www.bcccz.cz/oplemeni.htm> (accessed February 2019).

Van Tol HHM, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V. 1992. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* **358**:149-152.

Vazdová P. 2016. O plemeni. Klub chovatelů Bearded Colií. Available from http://www.beardedcollie.cz/bearded-collie/o_plemeni (accessed February 2019).

Yilmaz A, Ilke H, Alp E, Menevse S. 2012. Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. 230-253 in *Polymerase Chain Reaction*. InTech, Ankara.

Walther S, Yamamoto M, Thigpen AP, Garcia A, Willits NH, Hart LA. 2017. Assistance Dogs: Historic Patterns and Roles of Dogs Placed by ADI or IGDF Accredited Facilities and by Non-Accredited U.S. Facilities. *Frontiers in Veterinary Science* **4** :1-14.

Wan M, Hejjas K, Ronai Z, Elek Z, Sasvari-Szekely M, Champagne FA, Miklósi Á, Kubinyi E. 2013. *DRD4* and *TH* gene polymorphisms are associated with activity, impulsivity and inattention in Siberian Husky dogs. *Animal Genetics* **44**:717-727.

Weiss E, Greenberg G. 1997. Service dog selection tests: Effectiveness for dogs from animal shelters. *Applied Animal Behaviour Science* **53**:297-3

Wong AHC, Buckle CE, Van Tol HHM. 2000. Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us?. *European Journal of Pharmacology* **410**:183-203.

9 Seznam obrázků a tabulek

9.1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Bearded kolie	12
Obrázek 2: Border kolie – Goji the Great ISDS 00/364379	12
Obrázek 3: Německý ovčák – Ares Slovraj	13
Obrázek 4: Schéma syntézy dopaminu a jeho přeměny na adrenalin	14
Obrázek 5: Struktura dopaminového receptoru	15
Obrázek 6: Strukturální organizace genů kódujících podtypy dopaminových receptorů	16
Obrázek 7: Schéma znázorňující variabilitu třetí plazmatické kličky	17
Obrázek 8: Alela 435	19
Obrázek 9: Alela 447a	20
Obrázek 10: Alela 447b	20
Obrázek 11: Alela 498	20
Obrázek 12: Legenda schémat jednotlivých alel	21
Obrázek 13: Schématické znázornění PCR	24
Obrázek 14: Schéma zařízení pro kapilární elektromigrační metody	25

9.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Použité primery	27
Tabulka 2: Složení reakční směsi pro první amplifikaci	27
Tabulka 3: Podmínky amplifikace	27
Tabulka 4: Složení reakční směsi pro druhou amplifikaci	28
Tabulka 5: Podmínky amplifikace	29
Tabulka 6: Výsledky – německý ovčák	30
Tabulka 7: Výsledky – bearded kolie	31
Tabulka 8: Výsledky – border kolie	32
Tabulka 9: Frekvence genotypů skutečná	34
Tabulka 10: Frekvence genotypů relativní	34
Tabulka 11: Frekvence alel	34
Tabulka 12: Porovnání frekvencí alel genu <i>DRD4</i> u různých plemen	35
Tabulka 13: Porovnání frekvencí genotypů genu <i>DRD4</i> u různých plemen	36
Tabulka 14: Frekvence alel exonu III genu <i>DRD4</i> zjištěné u německého ovčáka	36
Tabulka 15: Porovnání zjištěné frekvence alel vůči předchozím studiím	36