

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Studium kandidátních genů (*HOXA10*, *INSL3*, *INHA*
a *TIMP1*) kryptorchismu u psů pomocí pyrosekvenace**

Diplomová práce

Autor práce: Anežka Palmová

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Studium kandidátních genů (*HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1*) kryptorchismu u psů pomocí pyrosekvenace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne: 11. 4. 2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi, konzultantce Ing. Daniele Čílové a Ing. Jakubovi Vaškovi, Ph.D. za rady a odborné vedení, dále všem chovatelům psů za poskytnutí vzorků. Velký dík patří i mé rodině a přátelům za podporu nejen během studia. Diplomová práce vznikla za podpory grantového projektu FAPPZ ČZU v Praze "SV13-75-21360 Využití aktuálních biologických a statistických poznatků a metod pro vývoj nových postupů ve šlechtění rostlin a zvířat".

Souhrn

Kryptorchismus je jedna z nejrozšířenějších vrozených vad, která se vyskytuje nejen u psů, ale i u jiných zvířat a také u člověka. Přesná příčina kryptorchismu není doposud známa, předpokládá se však vliv genetických i negenetických faktorů. Cílem práce bylo studium struktury kandidátních genů pro kryptorchismus u psů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1* pomocí pyrosekvenace. Vzhledem k tomu, že pes je vhodným animálním modelem pro studium kryptorchismu u lidí, byly pro analýzu zvoleny výše zmíněné geny, neboť se nacházejí jak v genomu psa, tak i v genomu člověka.

Předmětem obecné části diplomové práce bylo charakterizovat kryptorchismus, vybrané kandidátní geny pro kryptorchismus a molekulárně – genetické metody umožňující detailní studium genetické variability daných genů. Předmětem experimentální části práce bylo osekvenování celých výše uvedených genů pomocí pyrosekvenátoru GS Junior System u vybraného vzorku psů a následné vyhodnocení získaných dat. Pomocí pyrosekvenace bylo analyzováno celkem 6 různých genů (*HOXA10*, *INSL3*, *INHA*, *TIMP1*, *SOD1* a *DNMI*), a proto byl konečný testovaný soubor 24 jedinců zvolen na základě potřeby pro všechny prováděné studie. Pro pyrosekvenaci byli vybráni 3 kryptorchidní psi různých plemen, ostatní vzorky sloužily jako referenční ukazatele pro prováděný výzkum.

Po izolaci DNA z buklálních buněk byly na základě publikovaných sekvencí navrženy dvojice primerů pro všechny kandidátní geny a pomocí long-range PCR amplifikovány. Poté byla zahájena samotná pyrosekvenace, skládající se z přípravy knihovny, emPCR a vlastního sekvenačního běhu.

Výsledky pyrosekvenace odhalily celkem 834 polymorfních míst oproti referenční sekvenci, z nichž 152 představovalo mutace v exonech kandidátních genů. Největší variabilitu vykazoval gen *HOXA10*, kde v pozici 855. – 860. nukleotidu v exonu 1 byla u 10 z 24 vzorků detekována delece šesti nukleotidů, která v produktu translace odpovídá ztrátě dvou aminokyselin. Do oblasti této mutace byl navržen genetický marker, který umožňuje charakterizovat délkový polymorfismus pomocí kapilární elektroforézy a je aplikovatelný na různé populace psů. Navržená dvojice primerů vymezující daný úsek byla aplikována na soubor 24 pyrosekvenovaných jedinců, soubor 12 kryptorchidních jedinců, populaci 62 border teriérů, 65 border kolií a 68 bearded kolií. U testovaného vzorku populací plemen border teriér, border kolie a bearded kolie byli všichni jedinci bez ohledu na pohlaví homozygotní bez delece 6 bp. Ve vzorku 18 sekvenovaných československých vlčáků bylo detekováno 7 jedinců s mutovanou alelou. Výsledek genotypizace napovídá tomu, že

na výskyt delece 855 – 860 v exonu 1 genu *HOXA10* má vliv plemenná příslušnost jedince. Zároveň však byla zjištěna výrazná variabilita v daném místě v souboru kryptorchidních jedinců čítajícím 11 různých plemen. Pro přesnější charakterizaci a případné potvrzení souvislosti této mutace s výskytem kryptorchismu u psů by však bylo nutné testovat větší počet jedinců se zmíněným fenotypovým projevem.

Výsledkem diplomové práce jsou nové, doposud nepublikované poznatky o struktuře kandidátních genů pro kryptorchismus *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1* u psů. Bylo získáno velké množství dat, která mohou být dále využita pro další studium problematiky kryptorchismu.

Klíčová slova: pes domácí (*Canis lupus familiaris L.*), kryptorchismus, *HOXA10*, *INSL3*, *INHA*, *TIMP1*, pyrosekvenace, 454/Roche

Summary

Cryptorchidism is one of the most frequent congenital defects that occurs not only in dogs but also in other animals, as well as in man. The exact cause of cryptorchidism has not been known until now, however an effect of genetic as well as non-genetic factors is presumed. The aim of the work was a study of the structure of candidate genes for cryptorchidism in dogs *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* and *TIMP1* by means of pyrosequencing. Since the dog is a suitable animal model for the study of cryptorchidism in man, above mentioned genes were selected for the analysis because they occur both in the dog and man genome.

The objective of the general part of the master's thesis was to characterize cryptorchidism, selected candidate genes for cryptorchidism and molecular-genetic methods enabling a detailed study of genetic variability of the given genes. The objective of the experimental part of the master's thesis was sequencing of the above mentioned genes by means of the pyrosequencing device GS Junior System in a selected sample of dogs. The total of 6 different genes (*HOXA10*, *INSL3*, *INHA*, *TIMP1*, *SOD1* and *DNM1*) were analyzed by pyrosequencing. For this reason the final set of 24 individuals was selected according to the needs for all realized studies. Three cryptorchid dogs of various breeds were selected for pyrosequencing other samples served as referencel group for the current research.

After isolation of DNA from the buccal cells, pairs of primers for all candidate genes were proposed on the base of published sequences and amplified by means of long-range PCR. Thereafter pyrosequencing was started, consisting of the DNA library preparation, emPCR and the actual sequencing course.

Results of the pyrosequencing revealed the total of 834 polymorphic loci in comparison with the reference sequence. Out of them 152 represented mutations in exons of the candidate genes. Gene *HOXA10* showed the highest variability, where in the position 855.-860., nucleotide in exon 1, deletion of 6 bp was detected in 10 out of 24 samples. This deletion corresponds to the loss of two aminoacids in the product of translation. A genetic marker was proposed to this region that enables to characterize the length polymorphism by means of capillary electrophoresis and can be applied to various dog populations. The proposed pair of primers delimiting the given section was applied to a set of 24 pyrosequenced individuals, a set of 12 cryptorchid individuals, population of 62 border terriers, 65 border collies and 68 bearded collies. In the tested sample of populations of the breeds border terrier, border collie and bearded collie all individuals regardless of sex

were homozygous without the 6 bp deletion. In the sample of 18 sequenced Czechoslovakian wolfdogs 7 individuals with the mutated allele were detected. Result of the genotyping indicates that occurrence of the deletion 855-860 in exon 1 of the gene *HOXA10* is affected by the breed origin. However, a distinct variability at the given section was determined in the set of cryptorchid individuals comprising 11 various breeds. Nevertheless, a larger number of individuals with the mentioned phenotype should be tested for a more exact characterization and validation of the possible link between this mutation and cryptorchidism in dogs.

Results of the master's thesis are novel until now unpublished findings on the structure of candidate genes for cryptorchidism *HOXA10*, *INSI3*, *INHA* and *TIMP1* in dogs. A large number of data was obtained that can be further used for the study of cryptorchidism.

Keywords: domestic dog (*Canis lupus familiaris L.*), cryptorchidism, *HOXA10*, *INSL3*, *INHA*, *TIMP1*, pyrosequencing, 454/Roche

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecké hypotézy a cíle práce	2
2.1 Vědecké hypotézy	2
2.2 Cíle práce	3
3 Literární přehled	5
3.1 Kryptorchismus	5
3.1.1 Kryptorchismus u lidí	5
3.1.2 Kryptorchismus u psů	6
3.1.2.1 Mechanismus sestupu varlat.....	6
3.1.2.2 Typy kryptorchismu	7
3.1.2.3 Sexuální chování kryptorchidních psů	7
3.2 Genetická podstata kryptorchismu	8
3.3 Kandidátní geny	9
3.3.1 Metoda studia kandidátních genů	9
3.3.2 Gen <i>HOXA10</i> – Homeobox A10	9
3.3.3 Gen <i>INSL3</i> – Insulin-likefactor 3.....	11
3.3.4 Gen <i>INHA</i> – Inhibin alfa	14
3.3.5 Gen <i>TIMPI</i> – Metallopeptidase inhibitor 1	15
3.4 Sekvenování DNA	16
3.4.1 Sekvenování DNA 1. generace	16
3.4.1.1 Maxam–Gilbertova metoda.....	17
3.4.1.2 Sangerova metoda	18
3.4.1.3 Automatizace sekvenování DNA.....	19
3.4.2 Sekvenování DNA nové generace	19
3.4.2.1 Pyrosekvenace 454/Roche.....	20
3.4.3 Současný vývoj technologií sekvenování DNA	24
4 Metodika	25
4.1 Výběr hodnocených psů	25
4.2 Izolace genomické DNA	26
4.2.1 Odběr biologického materiálu	26
4.2.2 Postup při izolaci genomické DNA	26
4.2.3 Posouzení kvality a kvantity izolované DNA.....	26
4.3 Long-range PCR	27
4.4 Pyrosekvenace	32
4.4.1 Příprava DNA knihovny	32
4.4.2 emPCR – emulzní PCR.....	33
4.4.3 Příprava na sekvenování a vlastní pyrosekvenace	34

4.5	Zpracování dat získaných pyrosekvenací	34
4.5.1	Filtrování dat	34
4.5.2	Bioinformatické porovnání sekvencí a identifikace haplotypů	35
4.6	Navržení molekulárních markerů pro detekci vybraného polymorfismu genu <i>HOXA10</i>	36
4.6.1	Deleční polymorfismus v pozici 855 v exonu 1 genu <i>HOXA10</i>	36
4.6.2	Resekvenace místa výskytu delece 855 – 860 exonu 1 genu <i>HOXA10</i>	36
4.6.3	Navržení primerů pro amplifikaci místa delece 855 – 860 určených pro detekci polymorfismu kapilární elektroforézou	40
4.7	Statistické vyhodnocení bioinformatických dat – tvorba kladogramů	42
5	Výsledky	44
5.1	Detekované polymorfismy studovaných genů pomocí pyrosekvenace.....	44
5.1.1	Polymorfismy v exonových a UTR sekvencích genů <i>HOXA10</i> , <i>INSL3</i> , <i>INHA</i> a <i>TIMP1</i>	44
5.2	Přehled genotypů, které byly použity pro odvození jednotlivých haplotypů genů <i>HOXA10</i>, <i>INSL3</i>, <i>INHA</i> a <i>TIMP1</i>.....	60
5.3	Sekvence aminokyselin kódovaných jednotlivými haplotypy studovaných genů	64
5.4	Kladogramy vyjadřující podobnosti haplotypů studovaných genů	68
5.4.1	Kladogramy exonových sekvencí genu <i>HOXA10</i> a proteinových produktů kódovaných tímto genem	68
5.4.2	Kladogramy exonových a UTR sekvencí genu <i>INSL3</i>	70
5.4.3	Kladogramy exonových sekvencí genu <i>INHA</i> a proteinových produktů kódovaných tímto genem.....	73
5.5	Variabilita PCR markeru delece 855-860 v exonu 1 genu <i>HOXA10</i>	73
5.5.1	Výsledky resekvenací oblasti s výskytem delece 855-860.....	73
5.5.2	Délkový polymorfismus nově navrženého markeru delece 855-860 v exonu 1 genu <i>HOXA10</i> stanovený kapilární elektroforézou	75
6	Diskuze.....	80
6.1	Příprava vzorků pro pyrosekvenaci.....	81
6.2	Pyrosekvenace	81
6.3	Detekované polymorfismy studovaných genů pomocí pyrosekvenace.....	82
6.4	Polymorfismy v exonových a UTR sekvencích genů <i>HOXA10</i>, <i>INSL3</i>, <i>INHA</i>, <i>TIMP1</i>.....	82
6.5	Polymorfismy v aminokyselinách kódovaných jednotlivými haplotypy studovaných genů	83
6.6	Kladogramy vyjadřující podobnosti haplotypů studovaných genů	85
6.7	Variabilita navrženého markeru delece 855–860 v exonu 1 genu <i>HOXA10</i>	86
7	Závěr	88
8	Seznam použité literatury	90
9	Seznam použitých zkratk	100

Seznam příloh

Příloha 1 – Fotodokumentace vybraných kroků pyrosekvenace

Příloha 2 – Pufry a roztoky použité při gelové elektroforéze

1 Úvod

S rozvojem biotechnologií, který nastal v posledních letech, došlo doslova k revoluci v oblasti sekvenování nukleových kyselin. Genetická revoluce ukončila éru téměř třiceti let sekvenování DNA s využitím jediné metody a rychlý rozvoj vědních disciplín jako je genomika a bioinformatika. Tento pokrok byl umožněn nejen vývojem v molekulární biologii, ale i výpočetní technice, optice a dalších oborech. V současné době je možné osekvenovat celé genomy různých organismů v kratším čase a při menších nákladech. Pozornost je věnována zejména studiu lidského genomu. Nové technologie umožňují osekvenování a porovnání tisíců lidských genomů během několika měsíců. O jak markantní změnu se jedná, lze zjistit při srovnání s časem, který zabralo sekvenování prvního lidského genomu trvajícím přes deset let. Velký posun nastal díky biotechnologickému pokroku i v lékařské genetice. Identifikace různých genů a jejich funkcí může vést k pochopení biologických pochodů v organismu a objasnit podstatu některých onemocnění. Znalost příčiny onemocnění přispívá k nalezení nových možností léčby, případně prevence daného onemocnění. Pro studium genetické podstaty lidských nemocí bývají často využívány animální modely. Z hlediska genetiky bývají porovnávány sekvence lidských genů s odpovídajícími geny zvířat. Důležitou roli zde však hraje i podobnost fyziologických procesů, anatomie a fenotypových projevů studovaného onemocnění. Pro studium příčiny některých onemocnění člověka, mezi které patří i kryptorchismus, je vhodným animálním modelem pes domácí (*Canis lupus familiaris L.*).

Kryptorchismus, jehož genetická podstata je předmětem studia diplomové práce, je vada postihující reprodukční systém samců, která se objevuje u různých druhů zvířat i u člověka. Jedná se o nejčastěji popisovaný vrozený defekt samčí pohlavní soustavy. Předmětem studia diplomové práce byla analýza čtyř kandidátních genů pro kryptorchismus u psů – *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1*. Jelikož byl v posledních letech zaznamenán zvýšený nárůst výskytu kryptorchismu u lidí, byly pro studium genetické příčiny kryptorchismu zvoleny právě tyto geny, neboť se vyskytují jak v genomu psa domácího (*Canis lupus familiaris L.*), tak v genomu člověka.

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

2.1 Vědecké hypotézy

Diplomová práce je založena na potvrzení nebo vyvrácení následujících vědeckých hypotéz:

- Na základě studia literárních pramenů bylo zjištěno, že mutace genů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMPI* mohou teoreticky ovlivnit proces vývoje a sestupu varlat. Lze teoreticky předpokládat, že mutace některých z těchto genů by mohly korelovat se vznikem kryptorchismu.
- Lze předpokládat, že i v kódujících sekvencích výše uvedených genů se mohou nacházet mutace typu substituce či různě rozsáhlé inserce a delece. Substituční mutace mohou v některých případech vést ke změnám aminokyselinových sekvencí kódovaného proteinového produktu. Inserce a delece mohou způsobit posun čtecího rámce vedoucího ke vzniku zcela jiné aminokyselinové sekvence. Mohou však existovat i delece a inserce, které ovlivňují délku polypeptidu.
- Existují komerčně vyráběné DNA polymerázy (long-range), které jsou schopné amplifikovat dlouhé fragmenty DNA. Tyto polymerázy lze použít pro amplifikaci celých menších eukaryotních genů.
- Metoda pyrosekvenace představuje vysoce citlivý nástroj, který umožní stanovit sekvence studovaných genů amplifikovaných pomocí long-range polymeráz.
- Sekvence získané pyrosekvenováním lze porovnat s referenčními sekvencemi uvedenými v mezinárodní nukleotidové databázi a lze tak přesně identifikovat místa jednotlivých mutací.
- Mutace typu inserce / delece lze detekovat pomocí fragmentační analýzy využívající kapilární elektroforézu a fluorescenčně značené primery.

- Sekvenční podobnosti exonových částí genů a proteinových produktů lze vyhodnocovat pomocí kladogramů.
- Lze předpokládat, že některé z odhalených mutací mohou vykazovat rozdílnou četnost výskytu u kryptorchidních a zdravých psů.

2.2 Cíle práce

Konkrétní cíle diplomové práce vycházejí z výše uvedených vědeckých hypotéz. Vzhledem k tomu, že metoda pyrosekvenace patří mezi poměrně nové metody studia genomů, byla řada z cílů práce zaměřena na optimalizaci celého postupu vedoucího k nalezení polymorfismů studovaných genů. Tyto cíle lze charakterizovat následujícími body:

- Získání vzorků DNA psů s diagnostikovaným unilaterálním či bilaterálním kryptorchismem
- Navržení primerových primerů ohraničujících studované gen *HOXA10*, *INSL3*, *INHA*, *TIMP1* a amplifikace celých genů
- Elektroforetické ověření velikosti ampliconů a gelová purifikace amplifikovaných genů
- Pyrosekvenace studovaných genů
 - Příprava knihovny pro pyrosekvenaci
 - emPCR
 - Příprava pikotitrační destičky
 - Vlastní pyrosekvenace
 - Úprava a filtrování dat, vyhodnocení frekvencí nalezených mutací
- Výběr mutací lokalizovaných v exonových částech studovaných genů a vyhledání jednotlivých haplotypů
- Porovnání sekvenčních podobností haplotypů a produktů translace exonových částí studovaných genů pomocí kladogramů

- Navržení PCR markeru pro detekci vybrané mutace typu delece s cílem identifikovat variabilitu pomocí kapilární elektroforézy u souboru kryptorchidních a zdravých psů
- Nalezení teoreticky možných vztahů mezi výskytem detekované mutace a projevem kryptorchismu

3 Literární přehled

3.1 Kryptorchismus

Kryptorchismus je jeden z nejčastěji se vyskytujících vrozených defektů, který se objevuje u člověka i u mnoha druhů zvířat (Cox et al., 1978).

Kryptorchismus je charakterizován jako stav, kdy jedno nebo obě varlata nesestoupí z dutiny břišní do šourku za dobu specifickou pro daný druh (Cassata et al., 2008).

3.1.1 Kryptorchismus u lidí

Kryptorchismus je popisován jako nejběžněji se vyskytující vrozená vada postihující děti mužského pohlaví (Foresta et al., 2008). Klonisch et al. (2004) uvádějí, že u lidí kryptorchismus postihuje 3 % dětí narozených v řádném termínu a 30 % předčasně narozených dětí. Foresta et al. (2008) rovněž poukazují na fakt, že v posledních desetiletích dochází k významnému nárůstu prevalence kryptorchismu u lidí. Ačkoli bývá tento defekt označován jako lehká vrozená malformace, může mít velký vliv na budoucí zdraví a fertilitu daného jedince. Kryptorchismus se podílí na snížené plodnosti daného jedince a zároveň představuje rizikový faktor pro rozvoj rakoviny varlat (Foresta et al., 2008). Toto potvrzují i Hutson et al. (1997), kteří uvádějí, že bez léčby či vhodného zákroku může kryptorchismus narušit spermatogenezi, vést k neplodnosti i být hlavním činitelem ve výskytu rakoviny varlat u postiženého jedince.

Přesná etiologie kryptorchismu není známa, jedná se o komplexní poruchu způsobenou spolu působením genetických i negenetických faktorů (Cox et al., 1978; Rothschild et al.; 1988; Foresta et al., 2008). Na základě genetických studií bylo zjištěno, že tento defekt je kontrolován více geny. Předpokládá se především vliv genů ovlivňujících mechanismus sestupu varlat, jmenovitě Insulin-like factor 3 a androgeny, z nichž nejvýznamnější je testosteron produkovaný Leydigovými buňkami. Celkový počet genů podílejících se na kryptorchismu však doposud znám není. Dědičnost komplexních onemocnění je velmi složitá a ovlivnitelná i negenetickými faktory. (Foresta et al., 2008). Amann a Veermachaneni (2007) předpokládají, že kryptorchismus není způsoben jedním činitelem, ale jedná se o vadu zapříčiněnou vzájemným působením více faktorů, zahrnující genetiku, epigenetiku a komponenty vnějšího prostředí. Z významných negenetických činitelů

vnějšího prostředí vyzdvihují Foresta et al. (2008) zejména endokrinní disruptory, jejichž vliv a působení nejen na zdraví člověka ale i zvířat se stal předmětem mnoha studií posledních let.

S rozvojem nových biotechnologických metod zejména v oblasti sekvenování DNA je zaznamenáván nárůst genetických i klinických studií genetické podstaty mnoha chorob a defektů včetně kryptorchismu (Snustad a Simmons, 2009). Po zveřejnění celkové sekvence genomu psa (Lindblad-Toh et al., 2005) a člověka (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) se ukázalo, že díky anatomickým i fyziologickým podobnostem je pes vhodným animálním modelem pro studium kryptorchismu u lidí pomocí komparativní genomiky a metody kandidátních genů (Khanna et al., 2006).

3.1.2 Kryptorchismus u psů

Miller et al. (2004) publikovali, že kryptorchismus postihuje až 10 % dospělých psů. Amann a Veermachaneni (2007) se domnívají, že u čistokrevných plemen psů se výskyt kryptorchidů pohybuje mezi 1 – 11 % z celkové populace. To se shoduje s dříve dosaženými výsledky Kawakami et al. (1984).

3.1.2.1 Mechanismus sestupu varlat

U samčího embrya se varlata vyvíjejí z urogenitální lišty. Jejich vývoj je regulován genem *SRY* (sex-determining region Y), který se nachází na chromozomu Y (Sinclair et al., 1990). V dutině břišní probíhá jejich nitroděložní vývoj. Krátce před porodem nebo po porodu sestupují varlata tříselným kanálem do šourku. Baumans et al. (1983) a Hutson et al. (1997) rozdělují mechanismus sestupu varlat do dvou fází. Během trans-abdominální fáze dochází vlivem hormonu testosteronu k uvolnění závěsného vaziva upevňujícího varlata (Emmen et al., 2000). Dále dochází ke zvětšení tzv. gubernacula, vazivového pruhu, který vytváří pevné spojení s varletem a podmiňuje jeho sestup do šourku. Zvětšení gubernacula je kontrolováno hormonem *INSL3* (insulin-like hormon 3). Hormon *INSL3* je stejně jako testosteron produkován Leydigovými buňkami (Yuan et al., 2006). Během druhé fáze zvětšuje gubernaculum svoji velikost za úroveň dutiny břišní a i s varlaty migruje do šourku (Heyns, 1987). Tento proces je rovněž kontrolován testosteronem (Shenker et al., 2006).

Uložení varlat v šourku je nezbytné pro spermatogenezi, zdárný vývoj spermií. Spermie potřebují ke svému vývoji teplotu nižší, než je teplota těla. Správně uložená varlata

v šourku jsou důležitým faktorem v plodnosti psa (Dostál, 2007). U psů by měl být sestup varlat ukončen do deseti týdnů věku štěněte (Dostál, 2007).

3.1.2.2 Typy kryptorchismu

Miller et al. (2004) popisují dva typy kryptorchismu, unilaterální a bilaterální. Unilaterální kryptorchismus znamená, že došlo k retenci pouze jednoho varlete. Jedno varle tedy nesestoupilo, ale druhé se nachází na správném místě v šourku. U bilaterálního kryptorchismu dochází k retenci obou varlat. Dostál (2007) uvádí v souvislosti s kryptorchismem ještě dva další pojmy – monorchismus a anorchismus. Monorchismus je stav, kdy má pes v šourku sestouplé jedno varle a druhé varle není vůbec vyvinuto. Stav, kdy pes nemá vyvinuté žádné varle, ani v šourku, ani v dutině břišní či tříselném kanálku, se nazývá anorchismus. Oba tyto případy se však u psů nacházejí jen vzácně.

Nejčastěji je u psů popisován unilaterální kryptorchismus. Miller et al. (2004) zjistili, že při retenci jednoho varlete se jedná častěji o varle pravé. Stejných výsledků dosáhli ve svých studiích již dříve Cox et al. (1978). Kawakami et al. (1984) uvádějí, že kryptorchidní varlata jsou menší než varlata sestouplá v šourku. Nesestouplá varlata lokalizovaná v tříselném kanálku bývají menší, než varlata v dutině břišní. U unilaterálních i bilaterálních kryptorchidů je nejčastější výskyt nesestouplých varlat v dutině břišní. Nacházet se však mohou i v tříselném kanálku či preskrotální oblasti. V některých případech lze nesestouplá varlata lokalizovat palpací. Další možností upřesnění jejich lokalizace je sonografické vyšetření (Miller et al., 2004).

3.1.2.3 Sexuální chování kryptorchidních psů

Sexuální chování kryptorchidních psů se od jedinců s plně vyvinutými pohlavními orgány liší. Bilaterálně kryptorchidní psi jsou neplodní. Nesestouplá varlata jsou vystavena vyšší teplotě, která znemožňuje zdárný proces spermatogeneze. Naproti tomu u unilaterálních kryptorchidů je spermatogeneze probíhající v sestouplém varleti dostačující a psi jsou schopni reprodukce (Kawakami et al., 1984).

Kawakami et al. (1984) získali ve svých pozorovacích studiích výsledky, které uvádějí, že sexuální chování sledovaných unilaterálních kryptorchidů u feny v říji je zřejmé u 2/3 daných psů. U necelé poloviny těchto psů však chyběla schopnost ejakulace. Dále zjistili, že kvalita semene kryptorchidních psů byla ve všech sledovaných ukazatelích

(celkový objem semene, celkový počet spermií, životnost spermií a jejich pH) horší, než u psů s normálně vyvinutými pohlavními orgány.

3.2 Genetická podstata kryptorchismu

Jednoznačná příčina kryptorchismu není doposud známa, avšak jedním z hlavních faktorů podílejících se na tomto defektu jsou genetické predispozice (Cox et al., 1978, Cassata et al., 2008, Zhao et al., 2010). Foresta et al. (2008) zmiňují, že již existuje velké množství výsledků genetických studií, které poukazují na vliv genetického pozadí jedince na výskyt a dědičnost kryptorchismu. Kryptorchismus nepodléhá jednoduché dědičnosti, lze zde však předpokládat genetické založení komplexní povahy (Cox et al., 1978).

Snustad a Simmons (2009) uvádějí, že genetické zákonitosti dědičnosti komplexních znaků a onemocnění lze dobře pozorovat studiem genotypů úzce i vzdáleněji příbuzných jedinců. Pritchard a Korf (2007) na základě studií výskytu různých onemocnění v rámci rodin zjistili, že pokud je u vybraného onemocnění přítomna genetická příčina, je relativní riziko výskytu daného onemocnění u členů rodiny vyšší než v běžné populaci. Riziko postižení roste tím více, čím je užší příbuzenský vztah mezi jedinci. Toto potvrzují i Foresta et al. (2008), kteří publikovali, že u 22,7 % pacientů s nesestouplými varlaty byl zjištěn pozitivní výskyt kryptorchismu v jejich rodinné historii. Dále ve své studii Foresta et al. (2008) uvádějí odhadovanou hodnotu koeficientu heritability kryptorchismu u člověka, která činí $0,67 \pm 0,16$. Tato odhadovaná hodnota koeficientu dědivosti značí, že daný znak, kryptorchismus, je z 67 % ($\pm 0,16$ %) podmíněn vlivem genotypu a ze 33 % ($\pm 0,16$ %) faktory vnějšího prostředí. K podobnému závěru došli i Zhao et al. (2010), kteří ve své práci studovali genetické pozadí 156 psů jednoho plemene a různé úrovně příbuznosti, a na základě srovnávacích studií identifikovali dvacet možných kandidátních genů pro kryptorchismus u psů.

3.3 Kandidátní geny

3.3.1 Metoda studia kandidátních genů

Metoda studia kandidátních genů vychází ze znalosti funkčního proteinu určitého genu, který má přímý vztah k danému znaku nebo lze tento vztah předpokládat vzhledem ke struktuře či funkci daného proteinu (Snustad a Simmons, 2009). Pritchard a Korf (2007) uvádí, že u komplexních onemocnění existuje řada kauzálních genů a výsledný znak je kombinací jejich minoritních, ale i majoritních účinků s různou penetrací. Při identifikaci kauzálních genů komplexních onemocnění u lidí se uplatňují studie dvojčat, rodin, studie s adoptovanými dětmi, populační studie, analýza asociovaných polymorfismů, vazebné studie, biochemické studie a zvířecí modely (Pritchard a Korf, 2007).

S rozvojem biotechnologií, především s dostupností sekvenování DNA, došlo k identifikaci mnoha kódujících oblastí genomů člověka i dalších organismů. V současnosti se k vyhledávání kandidátních genů nejčastěji využívá tzv. pozičně – kandidátní strategie, která kombinuje vazebnou analýzu a asociační studie. Tento postup umožňuje identifikaci alel sdílených vybranými jedinci, určení jejich pozice v genomu a určení vzájemného vztahu mezi konkrétní alelou, genotypem a fenotypem (Snustad a Simmons, 2009).

V souvislosti s kryptorchismem byly identifikovány kandidátní geny podílející se na ontogenezi jedince a dále geny, jejichž funkční produkt ovlivňuje sestup varlat, který je kontrolován různými fyziologickými pochody, anatomickými strukturami a hormonálními regulacemi (Amann a Veermachaneni, 2007).

3.3.2 Gen *HOXA10* – Homeobox A10

Gen *HOXA10* patří do skupiny tzv. homeobox genů, rovněž označovaných jako skupina homeotických genů, které se vyskytují u většiny eukaryotních organismů. Byly popsány u rostlin, živočichů i člověka. Homeotické geny se vyznačují tím, že kódují transkripční faktory, a mají tak nezastupitelnou roli ve vývoji daného organismu (Holland, 2013). Společným znakem homeotických genů je specifická, 180 bp dlouhá sekvence nukleotidů, která se nazývá homeobox. Podobnost této sekvence se u jednotlivých genů liší jak na úrovni DNA, tak na úrovni proteinu (Gehring a Hiromi, 1986). Proteiny, které vznikají translací homeotických genů a obsahují homeobox, mají schopnost regulace exprese jiných genů. Je to dáno tím, že sekvence homeoboxu vykazuje vysokou podobnost s regulačními sekvencemi promotorů a zesilovačů – enhancerů. Homeotické proteiny jsou tudíž schopné

navázat se do regulační oblasti jiného genu a tím ovlivnit míru jeho exprese. Nejčastěji se homeotické proteiny vážou do specifických oblastí genů, které jsou důležité pro ontogenezi daného organismu (Gehring a Hiromi, 1986). U člověka se homeobox geny dělí do čtyř hlavních skupin, označovaných A, B, C, D a jsou lokalizovány na čtyřech různých chromozomech (Scott, 1993). Wang et al. (2007) se domnívají, že některé mutace v homeobox genech mohou mít spojitost s výskytem kryptorchismu a neplodností u lidí.

Gen *HOXA10* je u člověka lokalizován na chromozómu číslo 7. Klíčovou roli hraje během embryonálního vývoje jedince, ovlivňuje diferenciaci, morfogenezi a genovou expresi. Významně se podílí na celkové životaschopnosti embrya (Scott, 1993). Jak uvádí mezinárodní nukleotidová databáze Ensembl (<http://www.ensembl.org>), gen *HOXA10* se u psa nachází na 14. chromozómu, skládá se ze dvou exonů a je velký 2439 bp.

Bertini et al (2004) publikovali, že cílená delece genu *HOXA10* u myších samců způsobuje kryptorchismus a neplodnost. Rovněž uvedli, že se u kryptorchidních myších samců vyskytují různé mutace v exonu 1 tohoto genu. Na základě těchto poznatků vyslovili domněnku, že gen *HOXA10* hraje roli v plodnosti samců nejen u myší, ale i u dalších savců.

Bertini et al (2004) se zabývali studiem genu *HOXA10* i u člověka. Analyzovali požadované sekvence z genomické DNA od 18 lidských pacientů s kryptorchismem. U 5 pacientů byl diagnostikován bilaterální kryptorchismus, u zbylých 13 se jednalo o kryptorchismus unilaterální. Zároveň analyzovali stejný úsek DNA i u 28 zdravých jedinců představujících kontrolní skupinu. V této studii byla identifikována jediná mutace. Detekován byl SNP v pozici 1203. nukleotidu, kde byla dusíkatá báze guanin nahrazena adeninem (G > A). Tato záměna však nezapříčiňovala změnu aminokyseliny, jednalo se tudíž o tzv. tichou mutaci. Výše zmíněný SNP byl navíc zjištěn u obou testovaných skupin. Nacházel se u 2 pacientů (tzn. u 11,8 %) s kryptorchismem a u 3 jedinců (tzn. u 10,7 %) z kontrolní skupiny. Bertini et al. (2004) z výsledků studie usuzují, že není vyloučena souvislost polymorfismů v genu *HOXA10* s výskytem kryptorchismu, avšak pro další závěry je nutné provést nové analýzy s větším množstvím testovaných jedinců. To se shoduje s výsledky studií Kolon et al. (1999), kteří již rovněž objevili polymorfismus v genu *HOXA10* u lidských pacientů s kryptorchismem.

Oba vědecké týmy zdůrazňují, že je třeba dalších rozsáhlých studií tohoto i dalších genů pro určení konkrétní příčiny.

3.3.3 Gen *INSL3* – Insulin-likefactor 3

INSL3 je gen ovlivňující sekreci hormonu Insulin – likefactor 3, který někdy bývá označován také jako relaxin-like factor. Tento hormon je produkován především v pohlavních tkáních samců i samic. Gen *INSL3* se vyskytuje u mnoha savců a jeho struktura např. u myši, psa a člověka je velmi podobná (Truong et al., 2003).

Jak uvádí mezinárodní nukleotidová databáze Ensembl (<http://www.ensembl.org>), u člověka se gen *INSL3* nachází na 19. chromozómu a jeho velikost je 6580 bp. U genu *INSL3* je popsán alternativní sestřih, který vede k tvorbě různých transkriptů. U člověka jsou popsány dvě možné varianty mRNA skládající se buď ze dvou, nebo ze tří exonů. U psa se dle databáze Ensembl (<http://www.ensembl.org>) nachází gen *INSL3* na 20. chromozómu, skládá se ze dvou exonů a je velký 1715 bp. Rovněž se u něj vyskytuje alternativní sestřih.

Truong et al. (2003) ve svém výzkumu analyzovali gen *INSL3* u psa. Ve své studii popsali rozdílnou expresi obou alternativních transkriptů, které nesou informace pro tvorbu proteinů o délkách 132 a 105 aminokyselin. Na základě experimentu zjistili, že více byla exprimována mRNA pro tvorbu delší varianty proteinu. Zároveň také dokázali, že pouze tato varianta genu dokáže aktivovat jeden z hlavních receptorů hormonu *INSL3*, tzv. *GREAT* receptor. Ferlin et al. (2003) uvádějí, že správná funkce *GREAT* receptoru je klíčová pro korektní sestup varlat do šourku během embryonálního vývoje jedince, bezproblémovou spermatogenezi a normální hormonální funkce samčích pohlavních žláz.

Gen *INSL3* kóduje protein, který se podílí na vývinu urogenitálního traktu samic a ovlivňuje tak jejich plodnost. Častěji se však v souvislosti s hormonem *INSL3* zmiňuje jeho role při regulaci diferenciaci a růstu gubernacula, čímž má přímý vliv na sestup varlat u samčího pohlaví (Kawamura et al., 2004). Výzkumy rovněž ukázaly, že produkce hormonu samčími pohlavními žlázami je vyšší než jeho produkce samičími pohlavními žlázami. U samic je hormon produkován thekálními buňkami ve vaječnicích a u samců Leydigovými buňkami ve varlatech. (Truong et al., 2003).

Truong et al. (2003) při své další studii zjistili, že delece genu *INSL3* nebo jeho receptoru vede u myších samců k nesestoupení varlat, kryptorchismu. Svými dalšími výzkumy potvrdili, že správná funkce genu *INSL3* je nezbytná pro správný vývoj a sestup varlat během vývoje u různých savčích samců. To se shoduje s již dříve publikovanými výsledky Nef a Parada (1999), kteří rovněž studovali různé cílené mutace genu *INSL3* u myších samců.

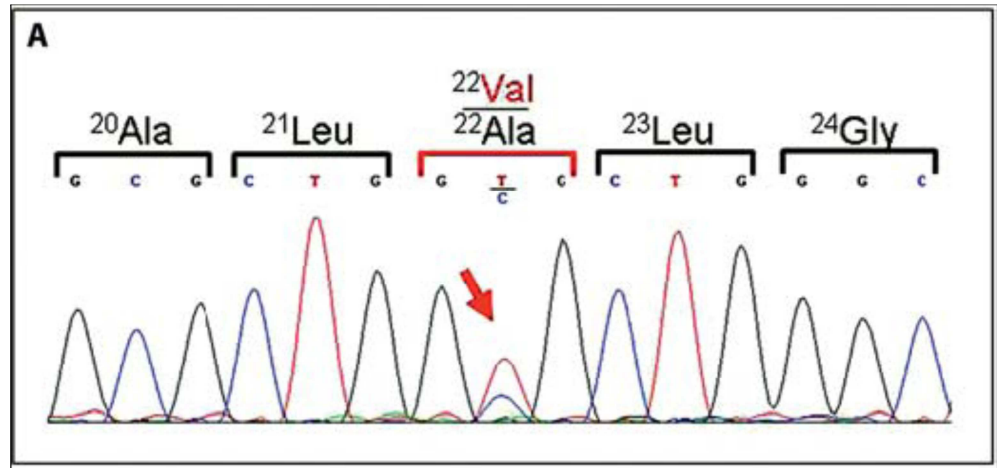
Zimmermann et al. (1999) studovali účinky genu *INSL3* u myší. Zabývali se analýzou transkriptů genu v samičích i samčích pohlavních buňkách jak v prenatalním, tak postnatalním období. Nejprve sledovali míru exprese genu u myších embryí. U samičích embryí nebyl detekován žádný transkript genu *INSL3*. Poprvé byla exprese tohoto genu u samic zaznamenána šestý den po narození. Zimmermann et al. (1999) předpokládají, že u samic má gen *INSL3* vliv na folikulární vývoj během estrálního cyklu a graviditu. Naproti tomu u myších samců byla zaznamenána transkripční aktivita genu *INSL3* již během embryonálního vývoje. S postupujícím vývojem jedince se exprese genu zvyšuje a nejvyššího stupně dosáhne dovršením pohlavní dospělosti samce. Ve svém výzkumu provedli Zimmermann et al. (1999) cílenou delecí genu *INSL3* u myších samců. Zjistili, že u homozygotních hybridů, u kterých je exprese genu potlačena v obou alelách, se vyskytly morfologické abnormality pohlavních orgánů a kryptorchismus. Zároveň potvrdili, že tito jedinci byli ve všech případech neplodní navzdory tomu, že v přítomnosti myší samice projevovali typické sexuální chování včetně kopulačních reflexů.

Dále Zimmermann et al. (1999) provedli histologické analýzy varlat myších hybridů, u kterých bylo dosaženo kompletní delecce genu *INSL3*. Pro tyto účely byli vybráni jedinci ve věku tří měsíců. Histologický rozbor poskytl důkazy o abnormální spermatogenezi u všech testovaných jedinců. Ve zkoumaných semenotvorných kanálcích bylo nalezeno jen malý počet spermatogonií a malé množství primárních spermatocytů, které byly navíc defektní. Rovněž Sertoliho buňky vykazovaly morfologické abnormality. Leydigovy buňky se zdály být beze změny. Jako na významný objev autoři poukazují na absenci jakékoli buňky, která by prošla meiotickým dělením. Ve varlatech nebyly nalezeny žádné spermatocyty druhého řádu, spermatidy ani spermie. Naproti tomu heterozygoti nevykazovali žádné morfologické změny ani neztratili schopnost plodnosti. Zimmermann et al. (1999) však popisují, že jsou nositelé nežádoucí alely, kterou mohou předat svému potomstvu.

Cassata et al. (2008) se zaměřili na porovnávání genotypů bilaterálního kryptorchida s genotypy normálně vyvinutých psů v genech *SRY*, *INSL3* a *RXFP2*. Molekulárními analýzami DNA s využitím specifických primerů pro exony zmíněných kandidátních genů byl potvrzen polymorfismus daných genů u všech sledovaných psů. Cassata et al. (2008) dále zjistili, že u bilaterálně kryptorchidního psa byly specifické sekvence genů *SRY* a *RXFP2* shodné se sekvencemi psů s normálně vyvinutými pohlavními orgány. Avšak v genu *INSL3* byla u bilaterálně kryptorchidního psa prokázána bodová mutace u 22. aminokyseliny. Z obrázku 1 vyplývá, že došlo k náhradě dusíkaté báze cytosinu tyminem (C > T). Celý triplet

se tím změnil a došlo k substituci aminokyselin – aminokyseliny alanin za aminokyselinu valin (GCG > GTG, Ala > Val), jak rovněž vyplývá z obrázku 1.

Obrázek 1: Bodová mutace v genu *INSL3* – upraveno dle Cassata et al. (2008)



V současnosti se o genu *INSL3* diskutuje i v souvislosti s endokrinními disruptory, u kterých byl rovněž popsán značný vliv na vývoj jedince především samčího pohlaví. Bylo zjištěno, že Leydigovy buňky produkující hormon *INSL3* v testikulární tkáni jsou primárním terčem působení endokrinních disruptorů, což může vést k poruchám ve vývoji pohlavních žláz (Anand-Ivell a Ivell (2014). Emmen et al. (2000) experimentálně podávali březím myším samicím látku xenoestrogen diethylstilbestrol (DES), která se řadí mezi endokrinní disruptory, jež významně zvyšují pravděpodobnost výskytu kryptorchismu. Výsledky ukázaly sníženou expresi genu *INSL3* v testikulární tkáni ovlivněných plodů. Podobný experiment zopakovali a k podobným výsledkům dospěli i Mahood et al. (2006). Během kritické periody pro vývoj varlat plodu podávali březím samicím potkanů ftaláty, které jsou rovněž známé svojí endokrinní aktivitou. Měřením byla znovu zjištěna snížená exprese genu *INSL3* v testikulární tkáni plodů. Anand-Ivell a Ivell (2014) publikovali, že vliv endokrinních disruptorů na vývoj samčích pohlavních orgánů lze detekovat i měřením koncentrace hormonu *INSL3* v amniové tekutině plodu. Autoři uvádějí, že insulin-like faktor 3 může být důležitým detektorem vlivu různých látek na embryonální vývoj jedince. Pro potvrzení této hypotézy je třeba dalších výzkumů.

3.3.4 Gen *INHA* – Inhibin alfa

Inhibin alfa zajišťuje tvorbu stejnojmenného hormonu, který je produkován v pohlavních žlázách mužů i žen. Tento hormon se podílí na mnoha buněčných pochodech, např. na buněčné proliferaci, apoptóze, imunitní reakci a hormonální sekreci (Burger a Igarashi, 1988).

Aktiviny a inhibiny představují dvě skupiny regulačních peptidových hormonů, které významně ovlivňují reprodukční soustavu u savců. Chemickou stavbou se jedná o glykoproteiny. Oba typy regulačních proteinů jsou významnou součástí tzv. hypofyzárně – gonadální osy. Mají velký význam jak u samic, tak u samců. Produkovány jsou v hypofýze a v samičích i samčích gonádách. Inhibiny fungují jako antagonisté aktivinů (Marino a Zangì, 2013). U samic hrají obě skupiny peptidů důležitou roli během estrálního cyklu. Aktiviny jsou nezbytné pro vývoj folikulů, ovulaci a formování žlutého tělíska. Inhibiny stimulují produkci progesteronu. Inhibiny rovněž kontrolují negativní zpětnou vazbu uvolňování folikuly stimulujícího hormonu (FSH) z hypofýzy. Naproti tomu aktiviny ovlivňují uvolňování folikuly stimulujícího hormonu (FSH) z hypofýzy pozitivní zpětnou vazbou a jejich produkce z ovárií je pozitivně kontrolována právě hormonem FSH. Korektní působení těchto gonadálních hormonů a jejich vzájemný poměr je nezbytným předpokladem pro správný vývoj a bezproblémový chod reprodukčních funkcí u samic (Marino a Zangì, 2013).

I u samčího pohlaví je důležitý mechanismus zpětných vazeb folikuly stimulujícího hormonu (FSH) prostřednictvím aktivinů a inhibinů. U samců jsou aktiviny a inhibiny produkovány Sertoliho buňkami v testikulární tkáni. Kolísání hladiny hormonu FSH významně ovlivňuje utváření zárodečného epitelu varlat a morfologii reprodukčních orgánů samců během embryonálního vývoje. Nepostradatelnou funkci má i ve správném procesu spermatogeneze. Stejně jako u samic je hladina folikuly stimulujícího hormonu (FSH) ovlivňována aktiviny prostřednictvím pozitivní zpětné vazby a inhibiny prostřednictvím negativní zpětné vazby (Weiss et al, 2010). Marino a Zangì (2013) popisují aktiviny jako důležité morfogenetické faktory působící ve fetálních varlatech. Jsou produkovány především Sertoliho buňkami. U dospělých samců se podílejí na spermatogenezi. Naproti tomu inhibiny jsou produkovány převážně Leydigovými buňkami a podporují sekreci hormonu testosteronu.

Marino a Zangì (2013) se také domnívají, že narušení sekrece aktivinů a inhibinů může vést k rakovině varlat či rakovině Sertoliho, Leydigových a granulózních buněk u psů. To se shoduje s publikací Kawakami et al. (1984) a Purdue et al. (2008), kteří uvádějí, že nesprávná funkce inhibinů může vést k rakovině varlat u psů, a zdůrazňují, že rakovina varlat

častěji postihuje právě kryptorchidní jedince, kteří mají narušené funkce pohlavních žláz. U zdravých jedinců je riziko výskytu rakoviny pohlavních orgánů nižší.

Stejně jako předešlé dva geny se i gen *INHA* objevuje u psa, člověka a dalších savců, zároveň ho však můžeme najít i u bakterií. Jak uvádí mezinárodní nukleotidová databáze Ensembl (<http://www.ensembl.org>), u psa se nachází na 37. chromozómu, skládá se ze dvou exonů a je velký 3063bp.

3.3.5 Gen *TIMP1* – Metallopeptidase inhibitor 1

Gen *TIMP1* se podílí na mnoha biologických procesech spojených s regulací buněčného cyklu a schopností buněk zahájit apoptózu. Gen *TIMP1* patří do rodiny tzv. TIMP genů (Tissue inhibitors of metalloproteinase). Proteiny kódované TIMP geny jsou přírodními tkáňovými inhibitory matrixových metaloproteináz. Matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou enzymy, které jsou schopné štěpit většinu komponent mezibuněčné hmoty. Kromě toho mají významný vliv na buněčné chování. Ovlivňují buněčnou proliferaci, diferenciaci, migraci a obranný systém buněk (Vu a Werb, 2000).

Ačkoli o tomto genu není v dostupné vědecké literatuře mnoho informací, Zhao et al. (2010) jej popisuje jako jeden z možných kandidátních genů podílejících se na kryptorchismu u psů.

Gen *TIMP1* se rovněž objevuje u mnoha savců včetně člověka. Popsán byl také u rostlin. Jedná se o gen vázaný na pohlaví, který se u lidí i psů vyskytuje na gonozómu X. Dle mezinárodní nukleotidové databáze Ensembl (<http://www.ensembl.org>) se u psa skládá z 6 exonů a je velký 3571 bp

3.4 Sekvenování DNA

Sekvenování DNA umožňuje stanovit primární strukturu nukleotidového řetězce. Primární struktura DNA je dána pořadím nukleotidů v jejích molekulách. Znalost sekvence nukleotidů umožňuje pochopení molekulární podstaty základních biologických a chemických procesů. Po určení pořadí jednotlivých nukleotidů v řetězci DNA je následně možné odvodit i aminokyselinovou sekvenci kódovaných proteinů (Šmarda et al., 2005). Sekvenování DNA patří již řadu let ke standardním metodám genetických analýz. Využití nachází především v analýzách genomů různých organismů a při vyhledávání a diagnostickém testování patologických mutací (Pritchard a Korf, 2007). Snustad a Simmons (2009) publikovali, že vývoj a zjednodušení pokročilých metod molekulární biologie včetně sekvenování umožnilo několik významných objevů. Mezi nimi uvádějí objev restričních enzymů, zdokonalení gelové elektroforézy, umožňující detekování fragmentů DNA lišících se o jedinou bázi, a objev nových metod a vektorů pro klonování. V roce 2009 ve své publikaci Snustad a Simmons uvedli, že jsou známy kompletní či skoro kompletní nukleotidové sekvence genomů více než 2000 virů, 700 bakterií a přibližně 30 eukaryot. Zároveň uvádějí, že analýza dalších více než 200 eukaryotních organismů již začala, a s rozvojem nových metod sekvenování DNA se počet osekvenovaných genomů různých organismů bude rychlým tempem navyšovat.

3.4.1 Sekvenování DNA 1. generace

V roce 1977 byly nezávisle na sobě vyvinuty první dvě sekvenační metody – Maxam-Gilbertova metoda a Sangerova metoda. Maxam-Gilbertova metoda, označovaná jako chemická metoda, je založena na specifické degradaci řetězců nukleových kyselin pomocí chemických sloučenin. Sangerova metoda neboli enzymová metoda se zakládá na využití specifické inhibice enzymové syntézy nukleotidových řetězců (Šmarda et al., 2010). Obě výše popsané metody se liší svým principem, ale nalezneme u nich i mnoho společných znaků. Jako výchozí materiál pro sekvenování DNA chemickou či enzymovou metodou jsou nejčastěji používány naklonované restriční fragmenty či fragmenty získané jako produkt PCR s přesně definovanými konci (Šmarda et al., 2010).

3.4.1.1 Maxam–Gilbertova metoda

Chemická metoda sekvenování neboli Maxam-Gilbertova metoda nese název po Allanu Maxamovi a Walteru Gilbertovi, kteří ji vynalezli. Podstatou této metody sekvenování je specifické rozštěpení molekuly DNA v místech, kde se nachází určitá báze, využitím čtyř různých chemických reakcí (Snustad a Simmons, 2009).

Výchozí materiál pro sekvenování představují identické fragmenty jednořetězcové DNA, které jsou na jednom z konců radioaktivně značeny. Soubor fragmentů je nutné rozdělit do čtyř vzorků. Při využití této metody je nutné modifikovat jednotlivé dusíkaté báze tak, aby v místě jejich výskytu mohlo dojít k rozštěpení řetězce určitými chemikáliemi. Mezi chemické látky používané pro navození specifických modifikací dusíkatých bází patří dimethylsulfát, hydroxid sodný, kyselina mravenčí a hydrazin. Podstatou modifikace bází je vytvoření křehkého místa v řetězci, které je velmi náchylné ke štěpení, a následné přerušení řetězce v definovaných úsecích. Rozštěpení řetězce v zeslabených místech je zajištěno působením piperidinu na molekulu DNA při vysoké teplotě. Výsledkem štěpení velkého množství molekul DNA je soubor fragmentů o různé délce. Délka získaných fragmentů představuje vzdálenost příslušné dusíkaté báze od radioaktivně značeného konce výchozí molekuly DNA. Po rozštěpení řetězců DNA jsou získané fragmenty rozděleny na elektroforéze v denaturujícím polyakrylamidovém gelu. Na gelu jsou pomocí autoradiografie detekovány jen ty fragmenty, které nesou značený konec. Odečtením polohy jednotlivých pruhů z autoradiogramu stanovíme hledanou sekvenci DNA (Šmarda et al., 2010).

Maxam-Gilbertova metoda sekvenování se však běžně nepoužívá (Snustad a Simmons, 2009; Šmarda et al., 2010). Důvodem je možné zkreslení získaných dat různou reaktivitou použitých chemických sloučenin, která může být ovlivněna různými nečistotami. Další důvod představuje radioaktivita využívaná ke značení konců fragmentů DNA. Chemická metoda sekvenování umožňuje v porovnání s enzymovou metodou sekvenaci jen relativně krátkých úseků DNA, je tudíž časově náročnější (Šmarda et al., 2010).

3.4.1.2 Sangerova metoda

Sangerova neboli enzymatická sekvenační metoda nese název po svém objeviteli Fredericku Sangerovi. Tato metoda využívá *in vitro* syntézy DNA vznikající prodlužováním komplementárního primeru na 3' konci templátové sekvence za pomoci enzymu DNA – polymerázy (Snustad a Simmons, 2009).

Molekula DNA, jejíž sekvence má být stanovena, je zde použita jako matrice pro syntézu různě dlouhých a specificky zakončených komplementárních řetězců (Šmarda et al., 2010). Nezbytným předpokladem pro funkčnost enzymatické metody jsou specifické vlastnosti DNA – polymerázy. Mezi ně patří schopnost vytvářet přesné kopie templátové DNA a schopnost syntetizovat specifické řetězce DNA ve směru 5' → 3' od primeru s volnou 3' – OH skupinou (Šmarda et al., 2010). Specifické zakončení nově vznikajících, různě dlouhých řetězců zajišťují dideoxynukleotidy (ddATP, ddTTP, ddCTP a ddGTP), deriváty deoxynukleotidů (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Dideoxynukleotidy nemají na svém konci přítomnou 3' – OH skupinu, která je nezbytná pro napojení dalšího nukleotidu fosfodiesterovou vazbou. Dideoxynukleotidy jsou do vznikající molekuly DNA inkorporovány stejně jako deoxynukleotidy, avšak absencí volné hydroxylové skupiny na jejich konci je blokováno další prodlužování řetězce. Dideoxynukleotidy tedy slouží jako terminátory nově vznikajících řetězců DNA (Pritchard a Korf, 2007). Důležitým faktorem v probíhajících reakcích je poměr zastoupení dideoxynukleotidů a deoxynukleotidů, který je v reakční směsi nejčastěji udržován na 1 : 100. Daný poměr vyjadřuje pravděpodobnost zabudování jednoho ze čtyř dideoxynukleotidů do nově syntetizovaného řetězce a je na něm závislá délka jednotlivých, náhodně zakončených fragmentů (Snustad a Simmons, 2009).

Před příchodem fluorescenčních technik se reakce prováděly ve čtyřech oddělených bázově specifických reakčních směsích podobně jako u chemické metody sekvenování. Každá ze čtyř zkumavek obsahovala templátovou molekulu DNA, jejíž sekvence měla být stanovena, specifický primer, DNA – polymerázu, směs všech čtyř deoxynukleotidů, jednoho z nich radioaktivně označeného, a jeden určitý typ dideoxynukleotidů ve vhodném poměru. V každé zkumavce tak vznikly různě dlouhé fragmenty zakončené daným dideoxynukleotidem. Nasyntetizované fragmenty se rozdělily pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu podle velikosti a odečtením jejich pořadí byl zjištěn sled nukleotidů v dané sekvenci (Pritchard a Korf, 2007).

3.4.1.3 Automatizace sekvenování DNA

Významný pokrok v sekvenování DNA přinesl objev technik fluorescenčního značení a vytvoření přístrojů pro automatické sekvenování na principu Sangerovy enzymatické metody (Šmarda et al., 2010). Použití čtyř různých fluorescenčních markerů pro jednotlivé báze umožnilo sjednocení probíhajících reakcí do jediné zkumavky a separaci vzniklých fragmentů na jediné dráze gelové elektroforézy (Pritchard a Korf, 2007). Nově vzniklé přístroje využívající enzymatickou metodu sekvenování jsou již plně automatizovány. Elektroforetická separace probíhá v tenkých kapilárách na tzv. kapilárních elektroforézách. Jejich práce zahrnuje separaci reakčních produktů, detekci, shromáždění dat i samotnou analýzu a vyhodnocení pořadí bází (Šmarda et al., 2010).

Vzhledem k možnosti automatizace celého procesu se Sangerova enzymatická metoda stala nejvyužívanější metodou sekvenování až do konce 20. století (King et al., 2006). Za využití této metody byly osekvenovány genomy mnoha organismů včetně psa i člověka. Jejich sekvence jsou volně přístupné v genomových databázích. Díky těmto významným pokrokům se sekvenování DNA stalo běžnou metodou v medicínské diagnostice. Rovněž bylo započato mnoho nových projektů v oblasti výzkumu a diagnostiky dědičných chorob a nádorových onemocnění, personální genomiky a celogenomového sekvenování (Pospíšilová et al., 2009).

Sekvenování celých genomů pomocí Sangerovy metody je však velmi zdlouhavé a nákladné. Proto se od počátku 21. století začínají vyvíjet sekvenační metody nové generace (Next-Generation Sequencing), mezi které patří i pyrosekvenace (Pospíšilová et al., 2009).

3.4.2 Sekvenování DNA nové generace

Sekvenování nové generace zahrnuje několik technologií, které umožňují masivní paralelní sekvenování DNA (Pospíšilová et al., 2009). První z těchto metod začaly být komerčně dostupné teprve v roce 2004 a jejich zavedení zcela změnilo práci mnoha molekulárně genetických laboratoří. Se sekvenováním nové generace se objevily nové možnosti poskytující větší množství informací v kratším časovém rozpětí a s významným snížením nákladů (Mardis, 2008).

V současné době existuje několik technologií označovaných jako metody sekvenování nové generace. Mezi tři původní průlomové metody pro masivní paralelní sekvenování se řadí technologie 454/Roche, Illumina/Solexa Genome Analyzer a Applied Biosystems SOLiD™ System. Tyto tři platformy později doplnily další dva v současnosti využívané systémy,

Helicos Heliscope™ a Pacific Biosciences SMRT. Každá z uvedených technologií představuje složitý komplex technologií zahrnující použití specifických enzymů, dalších chemických látek, využití optiky s vysokým rozlišením a bioinformatiky zahrnující hardwarové a softwarové inženýrství. Souhra jednotlivých součástí umožňuje vysoce aerodynamické kroky v přípravě vzorků před sekvenováním DNA. Rovněž představují zmíněné nástroje významnou úsporu času a minimální požadavky pro související vybavení ve srovnání s postupy sekvenování 1. generace (Mardis, 2008).

U používaných platform sekvenování nové generace lze nalézt odlišnosti v přípravě vzorků DNA pro sekvenování, sekvenačních reakcích, detekci získaných signálů, stejně tak i rozdíly v objemu získaných dat či časové náročnosti. Všechny však naplňují cíle spočívající v usnadnění, urychlení a zlevnění masivního sekvenování DNA a otevírají nové možnosti nejen v celogenomovém sekvenování, ale i ve studiu biologické diverzity, identifikaci neznámých mikroorganismů, zkoumání archeologických nálezů a mnoha dalších biologických výzkumů (Mardis, 2008).

3.4.2.1 Pyrosekvenace 454/Roche

Pyrosekvenace je vysoce přesné sekvenování, které je založené na detekci záření v důsledku uvolněného pyrofosfátu (PPi) při enzymatické syntéze DNA. V konečném kroku enzymatických reakcí je uvolněno viditelné světlo, jehož intenzita je přímo úměrná množství zabudovaných nukleotidů. Tento světelný záblesk je zaznamenán detektorem fotonů a v počítači zobrazen v podobě tzv. pyrogramu (Šmarda et al., 2005).

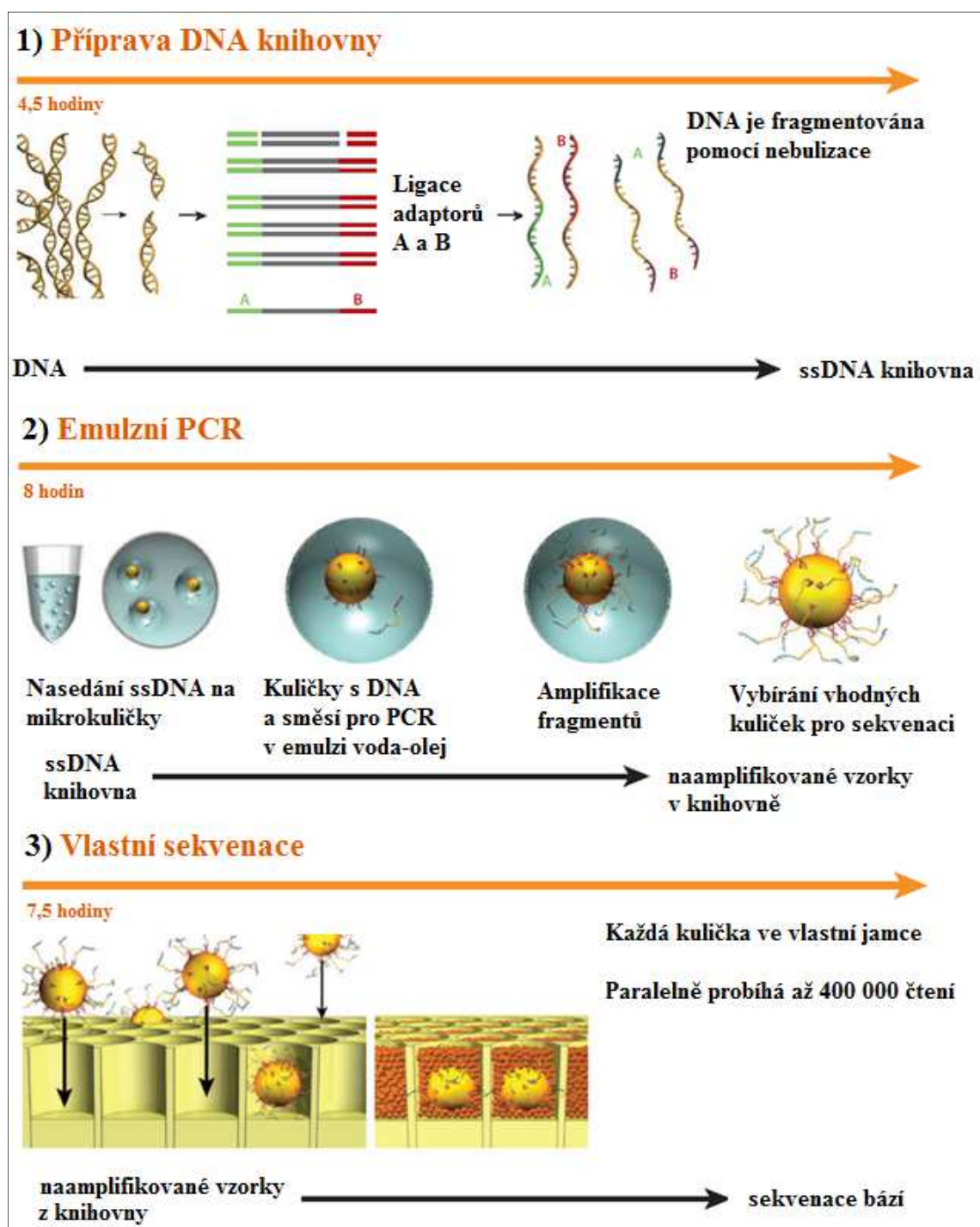
Pyrosekvenace přináší nové možnosti v celogenomovém sekvenování, *de novo* sekvenování, identifikaci SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), dále při studiu epigenetických změn, v metagenomice i paleogenomice (Ronaghi et al., 1998). Komerčně je technologie pyrosekvenace 454/Roche využívána od roku 2004 (Mardis, 2008).

Prvním krokem této laboratorní techniky je příprava DNA knihovny. Nejprve je nutné připravit samotný vzorek DNA určený k sekvenaci. Před sekvenací vzorku genomové DNA je nutné jeho rozštěpení na fragmenty dlouhé 300 – 800 bp. Při využití amplikonů z PCR reakce není fragmentace potřebná (Jarvie, 2005). Fragmenty DNA se smísí s populací agarózových mikrokuliček, na jejichž ploše se nacházejí oligonukleotidy specifických adaptérových sekvencí. Připojení krátkých adaptérů na 3' a 5' konec každého fragmentu DNA je důležité pro čištění, amplifikaci i samotnou sekvenaci jednotlivých úseků DNA (Mardis, 2008).

Následujícím krokem je emulzní PCR reakce (emPCR), která zajišťuje separátní amplifikaci jednotlivých mikrokuliček nesoucích molekuly DNA. Jednotlivé mikrokuličky jsou izolovány v oddělených 100 µm vodních kapkách. Principem emPCR je izolace jednotlivých mikrokuliček v emulzi voda – olej, která zajišťuje amplifikaci molekul DNA pomocí tzv. mikroreaktorů, které obsahují všechny složky potřebné pro reakci. EmPCR umožňuje paralelní amplifikaci DNA, při které vzniká přibližně milion kopií templátové molekuly DNA v každé mikrokuličce (Jarvie, 2005). Výsledkem emPCR reakce jsou mikropapky s mikrokuličkami s navázanými fragmenty DNA i mikropapky, které nesou prázdné mikrokuličky. Margulies et al. (2005) uvádí, že obvyklá výtěžnost z jedné emPCR reakce představuje 450 000 mikrokuliček obsahující molekuly DNA, což představuje přibližně 30 % celkového počtu mikrokuliček obsažených v reakci.

Mikrokuličky s navázanou DNA jsou poté umístěny do pikolitrových jamek na speciální čipové destičky. Technologie 454/Roche využívá destičky PicoTiterPlateTM o velikosti 60 x 60 mm, které jsou tvořeny optickými vlákny z křemičitého skla. Velikost jednotlivých jamek je uzpůsobena tak, aby v každé jamce byla právě jedna mikrokulička (Jarvie, 2005). Do každé jamky je poté přidána sekvenační reakční směs, která obsahuje enzymy DNA polymerázu, ATP sulfurylázu a luciferázu. Tyto enzymy jsou nezbytné ke vzniku světelného signálu z volného pyrofosfátu (PPi) (Margulies et al., 2005). Jak již název pyrosekvenace napovídá, technologie je založená na detekci záření v důsledku uvolněného pyrofosfátu (PPi) při enzymatické syntéze DNA. Snímací CCD kamera (z angl. „the charge-coupled device“) zachycuje světlo, které je uvolňováno při zabudování nukleotidu do řetězce DNA. Intenzita záření je přímo úměrná množství zabudovaných nukleotidů (Jarvie, 2005). Schéma pyrosekvenování je znázorněno na obrázku 2.

Obrázek 2: Schéma pyrosekvenování (upraveno podle Mardis, 2008)



Pyrosekvenace umožňuje během deseti hodinového běhu získat sekvence o celkové velikosti až 400 – 600 miliónů bází, přičemž průměrná délka jednotlivých sekvenovaných úseků je přibližně 500 bází. Celý proces od izolace genomické DNA přes přípravu vzorku po samotnou sekvenaci nepřesáhne u pyrosekvenace tři dny, zatímco u sekvenování pomocí kapilární elektroforézy zabere přibližně jeden měsíc (Žák, 2009).

Zatímco u klasické Sangerovy metody může v kapilární elektroforéze probíhat běh pouze jednoho PCR produktu, pyrosekvenace umožňuje sekvenování různých fragmentů PCR získaných i od různých jedinců najednou. Jediný běh na pyrosekvenátoru tedy může nahradit mnoho běhů na kapilární elektroforéze. Podobné využití nalezneme i u velkých genů, obsahujících několik desítek exonů. Zatímco u Sangerovy metody by bylo třeba spustit tolik běhů, kolik je exonů, při pyrosekvenaci k tomuto stačí jen jediný běh. Gharizadeh et al. (2004) ve své studii identifikovali pomocí pyrosekvenace 21 různých druhů infekčních hub, z toho bylo 12 klinických vzorků přímo od pacientů trpících mykotickou infekcí. Veškeré údaje získané pomocí technologie pyrosekvenace byly v souladu s výsledky vysoce přesné referenční metody ELISA i s výsledky kultivace. Ze zmíněné studie vyplývá, že pyrosekvenace je spolehlivou a levnější metodou pro identifikaci mykotických patogenů (Gharizadeh et al., 2004).

Velký posun nastal díky pyrosekvenaci i v medicínské diagnostice. Díky přesnému vyhodnocení intenzity emitovaného světelného záblesku z jednotlivých molekul analyzované DNA můžeme procentuálně vyjádřit zastoupení nukleotidů ve vzorku. Některá dědičná onemocnění mohou být způsobena somatickými mutacemi třeba i jen v malém množství molekul DNA. Takový polymorfismus nemůže být ovšem pomocí klasického sekvenování detekován. Tato technologie umožňuje detekovat somatické mutace s přesností na 1 %, což je důležité zejména pro medicínskou diagnostiku mimo jiné i u nádorových onemocnění (Huse et al., 2007). Tsiatis et al. (2010) analyzovali mutace v onkogenu *KRAS*, které zapříčiňují karcinom plic a kolorektální karcinom pomocí klasické Sangerovy metody a pomocí pyrosekvenace. Ve své studii zjistili, že při klasickém sekvenování bylo ze 180 vzorků 11,1 % falešně pozitivních a 6,1 % falešně negativních, zatímco pyrosekvenace nepřinesla žádné falešně pozitivní či falešně negativní výsledky. U diagnostiky dědičně podmíněných onemocnění mohou mít takovéto chybné výsledky závažné důsledky, např. nezačínání včasné léčby či naopak traumatizaci pacienta (Kaye et al., 2010).

Jak již z názvu „Sekvenování nové generace“ vyplývá, nové molekulární technologie, mezi které pyrosekvenace patří, odstartovaly genetickou revoluci. Díky těmto NGS metodám je nyní možné osekvenovat řadu velkých genomů během několika týdnů, provádět hloubkové sekvenování a nalézt vzácné příčinné mutace u řady dědičných chorob, studovat smíšená společenství mikroorganismů vyskytujících se v půdě apod. (tzv. metagenomika), určovat expresní profily (transkriptomika), hledat malé RNA, detekovat různé kmeny virů, apod. (Chowdhury a Chowdhury, 2012).

3.4.3 Současný vývoj technologií sekvenování DNA

Objev možnosti studia DNA pomocí sekvenování znamenal ve vědě veliký pokrok. Sangerova metoda enzymatického sekvenování popsaná poprvé v roce 1977 se na následujících 30 let zařadila mezi standardní molekulární techniky genetických laboratoří. Postupně byla tato klasická dideoxy metoda automatizována díky objevu fluorescenčního značení a kapilární elektroforézy (Kircher a Kelso, 2010).

Technologický pokrok, který přinesla automatizace a dostupnost sekvenování DNA, spustil vlnu nových výzkumů včetně doposud nejznámějšího mezinárodního genetického projektu HGP – Human Genome Projekt, který započal v roce 1990. S ním probíhal výzkum sekvence lidského genomu i v soukromém sektoru pod vedením Craiga Ventera (Stein, 2004). V roce 2004 byla publikována finální sekvence lidského genomu, což znamenalo jeden z největších průlomů v historii vědy (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004.) Po zveřejnění sekvence lidského genomu nastala v odvětví genetiky technologická revoluce. Úspěšné uskutečnění zmíněných projektů otevřelo nové možnosti, které se zaměřily na zdokonalení a vývoj nových technik pro celogenomové sekvenování. Důraz byl kladen především na snížení nákladů a časové náročnosti s cílem zařadit sekvenování celých genomů mezi rutinní praktiky molekulárně – genetických laboratoří. To vedlo k již výše popsaným metodám sekvenování nové generace (McGinn a Gut, 2013).

4 Metodika

4.1 Výběr hodnocených psů

Experimentální cíle diplomové práce jsou zaměřeny na studium struktury kandidátních genů pro kryptorchismus *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1* pomocí pyrosekvenace. U některých mutací těchto genů lze na základě vědecké literatury předpokládat kauzální spojitost se vznikem kryptorchismu u psů. Pyrosekvenace představuje účinný biotechnologický nástroj pro získání nových informací o struktuře a variabilitě výše uvedených genů. Z těchto důvodů byl vybrán modelový soubor psů různých plemen, u kterých byl popsán fenotypový projev kryptorchismu různého typu. Konkrétně se jednalo o fenotypy oboustranného kryptorchida, jednostranného kryptorchida a psa, u něhož byl zaznamenán pozdní sestup varlat do šourku, tj. až po uplynutí standardní fyziologické doby specifické pro sestup varlat u psů. Samozřejmostí byl výběr kontrolní skupiny zdravých psů. Jelikož bylo pyrosekvenace použito pro několik studií více různých genů s odlišnými fenotypovými projevy, byl konečný testovaný soubor jedinců zvolen na základě potřeby pro všechny prováděné studie.

Do souboru 24 testovaných jedinců, u kterých byla provedena sekvenace DNA pomocí pyrosekvenace, bylo zařazeno 22 psů (*Canis lupus familiaris L.*) a 2 vlci obecní eurasijské (*Canis lupus lupus*). Mezi psy byli přítomni 3 kryptorchidní jedinci plemen border teriér, border kolie a pudl, dále 1 labrador retriever a 18 jedinců plemene československý vlčák. Tento soubor jedinců umožnil studium detailní struktury eukaryotních genů, jehož výsledky poskytly velké množství dat, která mohou být využita v mnoha dalších studiích. Kromě mnou studovaných kandidátních genů pro kryptorchismus se jednalo o geny *SOD1* a *DNMI*, jejichž polymorfismus má kauzální vliv na onemocnění degenerativní myelopatie (gen *SOD1*) a syndrom kolapsu při výcviku (gen *DNMI*). Z výše zmíněných důvodů a s ohledem na finanční a časové možnosti využití pyrosekvenace pro výzkum na České zemědělské univerzitě v Praze byl zvolen takto rozmanitý soubor jedinců s cílem získat dostatek vstupních údajů o všech studovaných genech.

Na základě bioinformatického vyhodnocení dat získaných při pyrosekvenace jsem se zaměřila na delecii 6 bp v pozici 855 – 860. nukleotidu exonu 1 genu *HOXA10*, která vede ke ztrátě dvou aminokyselin výsledného proteinu. Pro studium této variabilní oblasti byl sestaven nový modelový soubor jedinců, u kterého byl polymorfismus analyzován již pomocí standardně využívaných molekulárně – genetických technik.

Modelový soubor psů, na kterém byl ověřován zmíněný polymorfismus úseku genu *HOXA10*, zahrnoval kromě jedinců analyzovaných pomocí pyrosekvenace 12 kryptochidních psů, 62 zástupců plemene border teriér, 65 zástupců plemene border kolie a 68 představitelů plemene bearded kolie.

4.2 Izolace genomické DNA

4.2.1 Odběr biologického materiálu

Pro izolaci DNA byla zvolena neinvazivní metoda, která je založena na extrakci DNA z buněk bukálních sliznic. Pro odběr buněk bukálních sliznic byly použity sterilní cytologické kartáčky (Lotus Global Co., Ltd.). Testovaná zvířata nebyla před odběrem bukálních buněk minimálně dvě hodiny krmena a napájena. Sterilní cytologický kartáček byl asepticky vsunut mezi tvář a dásně psa a krouživými pohyby byla odebrána epiteliální vrstva buněk. Kartáčky s odebranými bukálními buňkami byly ponechány v pokojové teplotě, aby důkladně vyschly za aseptických podmínek. Takto připravené vzorky byly krátkodobě skladovány v samostatných papírových obálkách v mrazicím boxu při teplotě -20°C .

4.2.2 Postup při izolaci genomické DNA

Vlastní izolace genomické DNA byla provedena pomocí kitu NucleoSpin® Tissue XS (Machery-Nagel). Při izolaci DNA bylo postupováno přesně podle návodu dodaného výrobcem. Byl použit postup určený speciálně pro izolaci DNA z bukálních stěrů.

4.2.3 Posouzení kvality a kvantity izolované DNA

Vzorky s izolovanou DNA byly ihned po provedené extrakci hodnoceny z hlediska vysokomolekularity DNA pomocí elektroforetického testu. Pro tento test byla použita elektroforetická cela SubCell (BioRad). Vzorky byly separovány v 1% agarózovém gelu v prostředí 1x TBE pufru. Složení pufru je uvedeno v příloze 2 diplomové práce. Elektroforetický test probíhal při konstantním napětí 120 V při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Získané elektroforeogramy byly digitalizovány pomocí systému GelDoc (BioRad) a programu QuantityOne (BioRad).

Kvantita izolované DNA byla měřena UV-spektrofotometricky pomocí přístroje NanoPhotometer (Implen). Tento přístroj současně umožňuje i zhodnocení poměrů

absorbancí A260/A280 a A260/A230, které mohou být využity k detekci případných kontaminací izolované DNA organickými sloučeninami.

Extrahovaná genomická DNA byla u všech vzorků naředěna na požadovanou koncentraci 1x TE pufrem, jehož složení je uvedeno v příloze 2 diplomové práce.

4.3 Long-range PCR

Long-range PCR byla využita z důvodu amplifikace dlouhých fragmentů celých genů. K návrhu primerů pro long-range PCR byly využity sekvence studovaných kandidátních genů publikované v mezinárodní nukleotidové databázi Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Pomocí programu Primer3 Input 0.4.0 byly navrženy vhodné primery, které jsou uvedeny v tabulce 1 (Rozen a Skaletsky, 2000).

Tabulka 1: Primery pro long-range PCR genů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1*

Gen	Primer F	Primer R
<i>HOXA10</i>	5' ATGTCAGCCAGAAAGGGCTAT 3'	5' CAGGAAAAATTAAAATTGGCTGTG 3'
<i>INSL3</i>	5' TAAGTGCCAGAAGGGGAAAA 3'	5' CCAGGTGGGTCTTGACAGAT 3'
<i>INHA fragment A</i>	5' CCCAGGACCACGCACTTGAGC 3'	5' GCCGCCGTGACAGTAGTGAAG 3'
<i>INHA fragment B</i>	5' GCCATCCTTTCCCGGCTAC 3'	5' CAAGTGAGGCTGTGTGACCTGA
<i>TIMP1</i>	5' AGACCCAGCGCCAGAGAGACT 3'	5' TGGTCCGTCCACAAGCAGTGAG 3'

Jak vyplývá z tabulky 1, pro gen *INHA* byly navrženy dvě dvojice primerů. Rozdělení genu *INHA* na dva fragmenty a jejich následná amplifikace byla nutná z důvodu velikosti tohoto genu.

Složení amplifikačních reakcí pro jednotlivé geny je uvedeno v následujících tabulkách:

Tabulka 2: Složení PCR reakce pro amplifikaci genu *HOXA10*

Komponenty		Koncentrace
DNA		30 ng
Long-range PCR buffer		1 x
MgCl ₂		1,5 mM
dNTP bez deázy	dATP	0,2 mM
	dTTP	0,2 mM
	dCTP	0,2 mM
	dGTP	0,1 mM
7-dGTP deáza		0,1 mM
Primer F		0,4 μM
Primer R		0,4 μM
Long-range PCR mix (Therm Scientific)		2 U

Tabulka 3: Složení PCR reakce pro amplifikaci genu *INSL3*

Komponenty		Koncentrace
DNA		60 ng
Long-range PCR buffer		1 x
MgCl ₂		2,5 mM
dNTP bez deázy	dATP	0,2 mM
	dTTP	0,2 mM
	dCTP	0,2 mM
	dGTP	0,1 mM
7-dGTP deáza		0,1 mM
Primer F		0,4 μM
Primer R		0,4 μM
Long range PCR mix (Roche)		1 U

Tabulka 4: Složení PCR reakce pro amplifikaci genu *INHA* (fragment A i B):

Komponenty	Koncentrace
DNA	40 ng
Long-range PCR buffer	1 x
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,2 mM
Primer F	0,4 μM
Primer R	0,4 μM
Long-range PCR mix (Thermo Scientific)	2 U

Tabulka 5: PCR reakce pro amplifikaci genu *TIMP1*

Komponenty	Koncentrace	
DNA	30 ng	
Long-range PCR buffer	1 x	
MgCl ₂	1,5 mM	
dNTP bez deázy	dATP	0,2 mM
	dTTP	0,2 mM
	dCTP	0,2 mM
	dGTP	0,1 mM
7-dGTP deáza	0,1 mM	
Primer F	0,4 μM	
Primer R	0,4 μM	
Long-range PCR mix (Thermo Scientific)	2 U	

Long-range PCR probíhala v termocykleru C1000™ Thermal Cycler (BioRad) s následujícími teplotními a časovými profily pro jednotlivé geny:

Tabulka 6: Teplotní a časový profil amplifikace genu *HOXA10*

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94 °C	4 minuty	1 cyklus
Denaturace	94 °C	0,5 minuty	35 cyklů
Annealing	60 °C	0,5 minuty	
Elongace	68 °C	2,5 minuty	
Závěrečná elongace	68 °C	10 minut	1 cyklus

Tabulka 7: Teplotní a časový profil amplifikace genu *INSL3*

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94 °C	4 minuty	1 cyklus
Denaturace	94 °C	0,5 minuty	35 cyklů
Annealing	65 °C	0,5 minuty	
Elongace	68 °C	4 minuty	
Závěrečná elongace	10 °C	10 minut	1 cyklus

Tabulka 8: Teplotní a časový profil amplifikace genu *INHA* (fragment A i B)

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94 °C	4 minuty	1 cyklus
Denaturace	94 °C	0,5 minuty	35 cyklů
Annealing	65 °C	0,5 minuty	
Elongace	68 °C	3 minuty	
Závěrečná elongace	10 °C	10 minut	1 cyklus

Tabulka 9: Teplotní a časový profil amplifikace genu *TIMP1*

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94 °C	4 minuty	1 cyklus
Denaturace	94 °C	0,5 minuty	35 cyklů
Annealing	65 °C	0,5 minuty	
Elongace	68 °C	2,5 minuty	
Závěrečná elongace	10 °C	10 minut	1 cyklus

Výsledkem long range PCR byly produkty s přibližně očekávanou velikostí 2438 bp u genu *HOXA10*, 4446 bp u genu *INSL3*, 3794 bp u fragmentu A genu *INHA*, 3837 bp u fragmentu B genu *INHA* a 3356 bp u genu *TIMP1*.

4.4 Pyrosekvenace

4.4.1 Příprava DNA knihovny

Jelikož cílem pyrosekvenace bylo získání sekvencí celkem šesti genů (*HOXA10*, *INSL3*, *INHA*, *TIMP1*, *SOD1*, *DNMI*), bylo nezbytné zvolit pro přípravu DNA knihovny vhodnou strategii. Oficiálně udávaná kapacita pyrosekvenátoru GS Junior System je 30 Mb (Roche, 2012b). Pro minimalizaci náhodných chyb, které mohou vznikat v průběhu každé sekvenace DNA, bylo žádoucí, aby byl každý nukleotid osekvenován několikrát. Po sečtení velikosti všech studovaných genů představovala jejich teoretická délka 33 510 bp. Celkem byly spuštěny dva sekvenační běhy po 12 vzorcích. Jednoduchým výpočtem bylo zjištěno, že na každý z běhů vychází 402 120 bp. Výsledná hodnota udává, že při kapacitě 30 Mb na jeden sekvenační běh bude každý nukleotid osekvenován průměrně 75 krát. Tato hodnota bývá označována jako tzv. pokrytí (z angl. coverage). Pokrytí ale vyjadřuje pouze orientační hodnotu, neboť ve skutečnosti je počet přečtení každého nukleotidu náhodný. Význam počtu čtení jednotlivých nukleotidů je však nezanedbatelný z hlediska výskytu možných chyb, které mohou být např. při detekci kauzálních mutací fatální.

Pro tvorbu DNA knihovny byla nutná fragmentace amplikonů u vybraných vzorků na požadovanou velikost 400 – 600 bp. Fragmentace bylo dosaženo nebulizací, která spočívá v probublávání vzorků pomocí dusíku. Poté byla úspěšnost nebulizace ověřena gelovou elektroforézou pomocí systému FlashGel (Lonza).

Během nebulizace vznikly fragmenty s různými typy konců. Fragmenty bylo třeba zarovnat tak, aby všechny měly tupé konce. Toho bylo dosaženo pomocí End Repair mixu (Roche). K zarovnaným koncům jednotlivých fragmentů byly následně ligací připojeny adaptory s tzv. MID sekvencí. MID sekvence představovala sled deseti bází v unikátním pořadí a sloužila k rozlišení jednotlivých vzorků. Poté byly pomocí speciálních čistících kuliček AMPure beads (Roche) odstraněny malé fragmenty nevyhovující velikosti.

Dalším krokem byla kvantifikace DNA knihovny, které bylo docíleno pomocí fluorometru TBS 380 (Turner Biosystems). Získané vzorky byly smíchány s amplifikačními kuličkami v poměru 1:1, tedy naředěny na požadovanou koncentraci tak, aby na každou amplifikační kuličku mohla být navázána právě jedna molekula DNA.

4.4.2 emPCR – emulzní PCR

emPCR umožnila paralelní amplifikaci všech fragmentů v jediné zkumavce. Amplifikační kuličky nesoucí templátovou DNA byly smíchány s ostatními reagensy (tzv. Live Amp Mix) potřebnými k PCR reakci (Roche, 2012a). K reakční směsi byl přidán emulzní olej a výsledný roztok byl homogenizován. Každá kulička s navázanou DNA ve vodní kapce s reakčním roztokem a obklopená olejem představovala samostatný mikroreaktor, ve kterém probíhala PCR reakce.

Amplifikace byla uskutečněna v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad) s následujícím teplotním a časovým profilem:

Tabulka 10: Teplotní a časový profil amplifikace emPCR

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94 °C	4 minuty	1 cyklus
Denaturace	94 °C	0,5 minuty	50 cyklů
Annealing	58 °C	4,5 minuty	
Elongace	68 °C	0,5 minuty	
Závěrečná elongace	10 °C	20 minut	1 cyklus

Po emPCR byla provedena série promývacích kroků s cílem získat čisté kuličky s navázanou DNA. Promývání zahrnovalo odstranění zbytků reakční směsi a oleje. Následovalo tzv. obohacování kuliček nesoucích DNA, které spočívalo v odstranění kuliček bez navázaných naamplifikovaných fragmentů DNA. Výsledkem úspěšné emPCR bylo získání velkého množství kopií od každého fragmentu, který byl navázaný na příslušné kuličce. V jednotlivých úkonech bylo postupováno podle manuálu Roche (2012a).

4.4.3 Příprava na sekvenování a vlastní pyrosekvenace

Příprava pikotitrační destičky na sekvenování (PicoTiterPlate) spočívala v jejím postupném převrstvování roztoky nesoucími různé typy kuliček s navázanými komponentami potřebnými pro pyrosekvenační reakci. Konkrétní kroky přípravy pikotitrační destičky jsou uvedeny v manuálu Roche (2012c). Takto ošetřená destička s kuličkami nesoucími DNA a kuličkami s ostatními reagensy byla vložena do speciální kazety (tzv. PTP-cartridge) uvnitř sekvenačního přístroje. V těsném kontaktu s pikotitrační destičkou byl umístěn optický čip, aby mohl být výsledný světelný signál rovnou zachycen CCD kamerou. Poté byla spuštěna pyrosekvenační reakce, která představovala 200 cyklů, během kterých byla pikotitrační destička promývána jednotlivými nukleotidy. Vlastní pyrosekvenace trvala přibližně 10 hodin.

V příloze 1 diplomové práce je přiložena fotodokumentace vybraných kroků pyrosekvenace.

4.5 Zpracování dat získaných pyrosekvenací

Pro analýzu dat byl použit program GS Reference Mapper, který umožňuje vyhodnocení jednotlivých sekvencí v porovnání s vloženou referenční sekvencí. Výstupem programu byla tabulková forma obsahující informace o sekvenovaných vzorcích. U každého jedince byla v sekvencích všech testovaných genů detekována polymorfní místa představující SNP a různě velké delece či inserce. Všechna polymorfní místa byla charakterizována počtem čtení dané sekvence a frekvencí výskytu dané mutace.

4.5.1 Filtrování dat

Výstupem programu GS Reference Mapper (Roche) byl tabulkový přehled identifikovaných polymorfismů u jednotlivých psů a jednotlivých genů. Pro další vyhodnocení byly použity takové polymorfismy, které byly zjištěny s frekvencí výskytu větší než 10 %. Hodnota 10 % byla zvolena z níže uvedených důvodů. I při pyrosekvenaci může docházet k nespecifickým chybám čtení, které jsou charakteristické obvykle nízkým procentickým výskytem takovýchto polymorfismů. Polymorfismy detekované s nízkými frekvencemi mohou rovněž svědčit o chimérickém charakteru hodnocených genotypů. Vzhledem k tomu, že diplomová práce je zaměřena na studium polymorfismu genů, u kterých

se teoreticky nepředpokládá chimérický výskyt, bylo provedeno již výše zmíněné odfiltrování všech polymorfismů s nižší frekvencí výskytu než 10 %.

4.5.2 Bioinformatické porovnání sekvencí a identifikace haplotypů

Cílem diplomové práce bylo studium genů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA*, *TIMP1*. Hypotéza diplomové práce byla taková, že jsem teoreticky očekávala vztah mezi mutacemi v exonových sekvencích a výskytem kryptorchismu. Z těchto důvodů byly jednotlivé haplotypy stanoveny na základě kódujících sekvencí, které odpovídají propojení jednotlivých exonů. Současně byly stanoveny haplotypy na základě 5-UTR a 3-UTR sekvencí. Při stanovování haplotypů byl použit následující postup. Jedinec, u kterého byla v konkrétním místě sekvence identifikována změna nukleotidu, delece nebo inserce, byl při sestavování haplotypu považován za homozygotní bez ohledu na to, s jakou frekvencí se mutace při sekvenování vyskytla. Získané haplotypy tudíž neodpovídají konkrétním genotypům hodnocených psů. Poukazují však na teoreticky možné kombinace mutací, které se mohou vyskytovat v gametách těchto jedinců. Tento postup byl použit z důvodu, že program MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013), který byl následně použit při hodnocení variability získaných sekvencí, nedokáže pracovat s heterozygotními kombinacemi.

Sekvence u jednotlivých psů byly porovnány pomocí programu BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999). V tomto programu byly identifikovány jednotlivé haplotypy. Kódující sekvence studovaných genů byly rovněž pomocí programu BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999) přeloženy do aminokyselinové sekvence polypeptidového řetězce. Haplotypy byly stanoveny i na základě těchto aminokyselinových sekvencí.

4.6 Navržení molekulárních markerů pro detekci vybraného polymorfismu genu *HOXA10*

4.6.1 Deleční polymorfismus v pozici 855 v exonu 1 genu *HOXA10*

Pro další studii jsem si z vybraných kandidátních genů zvolila gen *HOXA10*, protože vykazoval největší frekvence mutací v kódujících sekvencích. V pozici 855 – 860 bp kódující sekvence byla zjištěna delece šesti nukleotidů, která v produktu translace odpovídá ztrátě dvou aminokyselin. Z hlediska rozsahu mutací se jednalo o největší typ mutace, a proto jsem se dále zaměřila na navržení molekulárního markeru, který by byl schopen identifikovat tuto mutaci v různých populacích psů.

4.6.2 Resekvenace místa výskytu delece 855 – 860 exonu 1 genu *HOXA10*

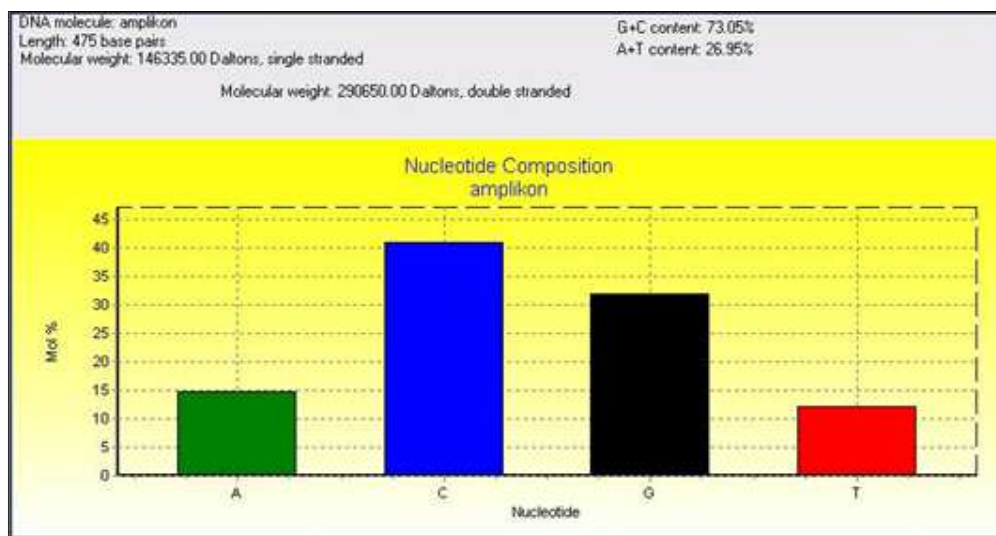
Výsledky zjištěné pyrosekvenacemi bylo nutné ověřit klasickou Sangerovou sekvenací. Pomocí programu Primer3 Input 0.4.0 (Rozen a Skaletsky, 2000) byla navržena dvojice primerů s následujícími sekvencemi:

HOXA10-855seq-F: 5' CTCTTTCGCGCAGAACATC 3'

HOXA10-855seq-R: 5' GAGAGCAGCAAAGCCTCG 3'

Tato dvojice primerů vymezovala fragment o velikosti 475 bp u jedinců, u kterých se nepředpokládá výskyt delece. Pomocí programu BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999) bylo zjištěno nukleotidové složení předpokládaného ampliconu, které je znázorněno na následujícím obrázku.

Obrázek 3: Zastoupení G + C a A + T párů bází v amplikonu určenému k resekvenování



Z obrázku 3 vyplývá, že v amplikonu vymezeným sekvenačními primery je vysoké zastoupení (73,05 %) G + C párů bází.

Z těchto důvodů byl pro amplifikaci použit postup, který například u dopaminového receptoru *DRD4* použili Niimi et al. (2001) a Ito et al. (2004). Pro amplifikaci tohoto fragmentu byla použita následující reakční směs, jejíž složení je uvedeno v tabulce 11.

Tabulka 11: Složení PCR reakce pro amplifikaci

Komponenty		Koncentrace
DNA		20 ng
PCR buffer		1 x
MgSO ₄		2,0 mM
dNTP bez deázy	dATP	0,25 mM
	dTTP	0,25 mM
	dCTP	0,25 mM
	dGTP	0,125 mM
7-dGTP deáza		0,125 mM
Primer F		0,5 μM
Primer R		0,5 μM
BSA		5 ng . 12,5 μl ⁻¹
Tetramethylamonium oxalát (Top Bio)		2 mM
<i>Pfu</i> Polymeráza (Thermo Scientific)		1,25 U . 12,5 μl ⁻¹

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad) s následujícím teplotním a časovým profilem. Optimální annealační teplota byla vybrána na základě teplotního gradientu.

Tabulka 12: Teplotní a časový profil amplifikace

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	98 °C	2 minuty	1 cyklus
Denaturace	98 °C	0,5 minuty	35 cyklů
Annealing	60 °C	1 minuta	
Elongace	74 °C	1 minuta	
Závěrečná elongace	74 °C	10 minut	1 cyklus

Gelová purifikace PCR produktu

Gelová purifikace PCR produktu byla provedena z důvodu vyčištění ampliconu od ostatních komponent reakční směsi a od potenciálně vznikajících dimerů. Pro tyto experimenty byla připravena PCR reakce o celkovém objemu 50 μ l. Produkty amplifikace byly separovány v 1% agarózovém gelu v 1x TBE pufru při konstantním napětí 120 V. Doba separace činila 50 minut. PCR amplicon byl poté vyříznut sterilním skalpelem a přenesen do sterilní polypropylenové zkumavky. DNA z tohoto fragmentu byla extrahována pomocí MiniElute PCR Purification Kit (Qiagene). Extrakce byla provedena přesně podle postupu doporučeného výrobcem kitu. Získáno bylo 20 μ l vodného roztoku amplifikovaného fragmentu. Takto připravený produkt byl kvantifikován UV spektrofotometricky stejným způsobem jako extrahovaná genomická DNA. Vyčištěné PCR produkty byly naředěny ddH₂O na konstantní koncentraci 5 ng \cdot μ l⁻¹.

Složení použitých pufrů a roztoků je uvedeno v příloze 2 diplomové práce.

Příprava sekvenční reakce

Pro sekvenaci PCR produktu byl použit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Složení sekvenční reakce je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 13: Složení sekvenční reakce

Složka	Objem	Koncentrace
PCR produkt (5 ng . μl^{-1})	4 μl	1 ng . 1 μl^{-1}
5x Sequencing Buffer (Life Technologies)	4 μl	1x
Primer F resp. R	3,2 μl	0,16 μM
Terminator Ready Reakcion Mix (Life Technologies)	2 μl	-

Purifikace produktu sekvenční reakce

K produktům sekvenační reakce o objemu 20 μl byly přidány 2 μl roztoku glykogenu (koncentrace 20 ng . μl^{-1} , Thermo Scientific), 2 μl 3M octanu sodného a 50 μl 96% čistého etanolu. Stanovené objemy byly smíchány ve zkumavce a inkubovány po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Vysrážené produkty amplifikace byly odděleny na základě odstředění při 13 200 otáčkách . min^{-1} po dobu 30 minut. Sterilní pipetou byl odstraněn supernatant, vysrážené fragmenty DNA se nacházely na dně zkumavky. Tento pelet byl propláchnut 250 μl 70 % čistého etanolu. Následně byly vzorky znovu odstředěny při 13 200 otáčkách . min^{-1} po dobu 15 minut. Proces oplachování peletu etanolem byl poté zopakován ještě jednou. Po odsátí supernatantu byl pelet vysušen ve vyhřívaném bloku Bio TDB-120 (Biosan) při teplotě 50°C po dobu 45 minut. Vysušený pelet byl následně rozpuštěn v 15 μl Hi-Di formamidu (Life Technologies). Takto připravené vzorky byly denaturovány v polypropylenových stripech v termocykleru C1000TM Thermal Cyclor (BioRad) při teplotě 95°C po dobu 5 minut. Následovalo jejich ochlazení na teplotu 4°C. Poté již byly vzorky připraveny pro vyhodnocení na kapilární elektroforéze.

Detekce sekvencí pomocí kapilární elektroforézy

Pro sekvenaci byl použit genetický analyzátor ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Podmínky separace v kapilární elektroforéze jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 14: Podmínky kapilární elektroforézy

Parametry	Podmínky separace
Délka kapiláry (cm)	36
Modul	P4StdSeq(1ml)E
Polymer	POP4
Virtuální filtr	E
Doba nástřiku (s)	30
Napětí při nástřiku (kV)	1
Teplota při separaci (°C)	50
Napětí při separaci (kV)	11,3
Doba separace (minuty)	26

Sekvence ampliconu exonu 1 genu *HOXA10* byly automaticky zpracovány programem DNA Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems). Sekvence byly dále vyhodnoceny a porovnány pomocí programu BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999).

4.6.3 Navržení primerů pro amplifikaci místa delece 855 – 860 určených pro detekci polymorfismu kapilární elektroforézou

V rámci diplomové práce byl vypracován metodický postup, který umožnil spolehlivé a rychlé hodnocení výše popsané delece u větších souborů jedinců. Z těchto důvodů byla navržena dvojice primerů, které jsou lokalizovány blíže detekované deleci, ve srovnání se sekvenačními primery. Tyto primery měly následující sekvence:

HOXA10-855F: 5' ATGCAGCCCGGAAAGAG 3'

HOXA10-855R: 5' GAGAGCAGCAAAGCCTCG 3'

Délkové polymorfismy amplikonů byly detekovány na základě fragmentační analýzy – kapilární elektroforézou. Z těchto důvodů byl primer *HOXA10*-855F označen na 5' konci fluorescenční barvou 6-FAM. Vzhledem k tomu, že i u tohoto relativně krátkého amplikonu, byl velký výskyt G+C párů bází, byla pro amplifikaci použita rovněž *Pfu* polymeráza. Složení reakční směsi bylo identické jako při amplifikaci daného fragmentu pro resekvenaci – tabulka 11. Amplifikace probíhala na termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad) s následujícím teplotním a časovým profilem. Optimální annealační teplota byla vybrána na základě teplotního gradientu. Pro amplifikaci byl použit následující teplotní a časový profil.

Tabulka 15: Teplotní a časový profil amplifikace

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	98 °C	2 minuty	1 cyklus
Denaturace	98 °C	30 sekund	35 cyklů
Annealing	61 °C	40 sekund	
Elongace	74 °C	40 sekund	
Závěrečná elongace	74 °C	10 minut	1 cyklus

Pro detekci délkových polymorfismů byl použit genetický analyzátor ABI PRISM 310[®] (Applied Biosystems). Před vlastní separací byly amplifikované produkty naředěny podle následujícího schématu: 1 µl PCR produktu + 149 µl ddH₂O. K 1 µl naředěného PCR produktu bylo přidáno 15 µl Hi-DiTM formamidu (Life Technologies) a 0,2 µl velikostního standardu GeneScanTM – 600 Liz[®] Size Standard (Life Technologies). Směs byla umístěna do mikrozkuvek a následně byla provedena denaturace DNA v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad) při 95°C po dobu 5 minut. Následně byly denaturované vzorky v termocykleru ochlazeny na 0°C. Vlastní parametry fragmentační analýzy jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 16: Technické parametry fragmentační analýzy

Parametr	Hodnota
Virtuální filtr	G5
Doba nástřiku	5 sekund
Napětí při nástřiku	7,5 kV
Teplota při separaci	60°C
Napětí při separaci	15 kV
Doba separace	22 minut

Výsledky fragmentační analýzy byly automaticky zpracovány v podobě chromatogramu programem GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems).

4.7 Statistické vyhodnocení bioinformatických dat – tvorba kladogramů

Haplotypové sekvence, jejichž identifikace byla popsána v kapitole 4.5.2, byly vyhodnoceny pomocí programu MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). Před vlastním zpracováním dat programem MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) byly získané sekvence haplotypů zpracovány programem BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999), kde bylo provedeno mnohonásobné porovnání – ClustalW Multiple alignment, které pracuje na bázi programu ClustalW (Thompson et al., 1994). Při tomto zpracování dat byly nastaveny parametry Full Multiple alignment a Bootstrap NJ Tree. Počet bootstrapů byl roven 1 000 000. Kladogramy byly konstruovány u všech haplotypových sekvencí pomocí metody maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood). Před vlastní konstrukcí každého kladogramu byl vybrán pomocí programu MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) optimální model na základě vypočítané hodnoty BIC (Bayesian Information Criterion) (Nei a Kumar, 2000). Pro jednotlivé haplotypy byly použity modely uvedené v tabulce 17.

Tabulka 17: Modely pro jednotlivé haplotypy

Gene	Sekvence	Statistický model	Citace
<i>HOXA10</i>	Exony	T92	Tamura (1992)
<i>HOXA10</i>	AMK	Dayhoff	Schwarz a Dayhoff (1979)
<i>INSL3</i>	Exony	T92	Tamura (1992)
<i>INSL3</i>	5-UTR	JC	Jukes a Cantor (1969)
<i>INSL3</i>	3-UTR	K2+G	Kimura (1980)
<i>INSL3</i>	AMK	Nelze vyhodnotit	-
<i>INHA</i>	Exony	T92	Tamura (1992)
<i>INHA</i>	3-UTR	Nelze vyhodnotit	-
<i>INHA</i>	AMK	Nelze vyhodnotit	-
<i>TIMP1</i>	Exony	Nelze vyhodnotit	-
<i>TIMP1</i>	5-UTR	Nelze vyhodnotit	-
<i>TIMP1</i>	3-UTR	Nelze vyhodnotit	-
<i>TIMP1</i>	AMK	Nelze vyhodnotit	-

Jak vyplývá z tabulky 17, některé sekvence kandidátních genů nebylo možné uvedeným programem vyhodnotit. Důvodem byl malý počet haplotypů u daných sekvencí. Kladogram mohl být sestaven pouze v případě výskytu alespoň čtyř různých haplotypů. Kladogramy byly sestaveny u každého haplotypu při použití 2 000 bootstrapů.

5 Výsledky

5.1 Detekované polymorfismy studovaných genů pomocí pyrosekvenace

V následujících podkapitolách jsou tabulkovou formou zpracovány identifikované polymorfismy v exonových popř. UTR oblastech studovaných genů. V jednotlivých tabulkách jsou uvedena čísla hodnocených psů, u kterých byl daný polymorfismus identifikován. Jedinci, kteří u daného konkrétního typu polymorfismu nejsou uvedeni, mají v tomto místě shodnou sekvenci jako referenční genotyp.

5.1.1 Polymorfismy v exonových a UTR sekvencích genů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1*

V následujících tabulkách 18, 19, 20 a 21 jsou uvedeny detekované polymorfismy v exonových a UTR částech studovaných kandidátních genů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1*. Jako referenční genotypy byly pro jednotlivé geny použity sekvence z mezinárodní nukleotidové databáze Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) s následujícím označením:

gen *HOXA10*: B8PZS7_CANFA ENSCAFG00000002963

gen *INSL3*: ENSCAFG000000032526

gen *INHA*: OBSL1 ENSCAFG000000015641

gen *TIMP1*: Q6QLW9_CANFA ENSCAFG000000015155.

Tabulka 18: Detekované polymorfismy v exonových sekvencích genu HOXA10

Vzorek	Lokalizace polymorfismu		Číslo exonu	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení	Frekvence výskytu polymorfismu
	Začátek	Konec					
P3-KR	95	95	exon 1	A	G	12	17%
P3-KR	117	117	exon 1	A	G	13	15%
CSV1	195	195	exon 1	C	G	7	43%
CSV10	195	195	exon 1	C	G	15	13%
CSV12	195	195	exon 1	C	G	6	100%
CSV17	195	195	exon 1	C	G	4	100%
CSV18	195	195	exon 1	C	G	8	25%
CSV2	195	195	exon 1	C	G	4	100%
CSV24	195	195	exon 1	C	G	9	44%
CSV3	195	195	exon 1	C	G	4	50%
LAB3	195	195	exon 1	C	G	8	37%
Canis lupus lupus 168/I	195	195	exon 1	C	G	14	100%
Canis lupus lupus 27/II	195	195	exon 1	C	G	6	100%
CSV24	277	277	exon 1	T	C	8	25%
CSV15	295	297	exon 1	GGC	-	25	12%
CSV1	297	297	exon 1	-	GGCGGC	13	23%
CSV12	297	297	exon 1	-	GGCGGC	8	87%
CSV17	297	297	exon 1	-	GGCGGC	4	50%
CSV2	297	297	exon 1	-	GGCGGC	5	80%
CSV24	297	297	exon 1	-	GGCGGC	7	43%
CSV3	297	297	exon 1	-	GGCGGC	7	29%

Canis lupus lupus 27/II	297	297	exon 1	-	GGCGGC	7	57%
Canis lupus lupus 168/I	298	298	exon 1	A	G	17	94%
Canis lupus lupus 168/I	302	302	exon 1	-	CAGCGG	17	82%
CSV18	323	323	exon 1	A	G	19	11%
Canis lupus lupus 168/I	411	413	exon 1	GCC	-	21	10%
CSV17	635	635	exon 1	C	T	14	21%
CSV10	663	663	exon 1	T	C	73	29%
CSV13	663	663	exon 1	T	C	14	57%
CSV17	663	663	exon 1	T	C	15	100%
CSV18	663	663	exon 1	T	C	75	40%
CSV2	663	663	exon 1	T	C	42	57%
CSV24	663	663	exon 1	T	C	43	53%
CSV3	663	663	exon 1	T	C	27	30%
CSV4	663	663	exon 1	T	C	29	21%
CSV6	663	663	exon 1	T	C	37	32%
Canis lupus lupus 27/II	663	663	exon 1	T	C	62	53%
CSV1	669	669	exon 1	G	C	60	35%
CSV11	669	669	exon 1	G	C	47	45%
CSV12	669	669	exon 1	G	C	50	94%
CSV15	669	669	exon 1	G	C	72	39%
CSV2	669	669	exon 1	G	C	41	39%
CSV14	780	780	exon 1	A	G	41	10%
BRT1-KR	855	855	exon 1	C	G	54	83%
CSV13	855	860	exon 1	CGGCGG	-	15	40%
CSV14	855	860	exon 1	CGGCGG	-	41	66%
CSV18	855	860	exon 1	CGGCGG	-	101	35%

CSV2	855	860	exon 1	CGGCGG	-	65	34%
CSV21	855	860	exon 1	CGGCGG	-	112	86%
CSV24	855	860	exon 1	CGGCGG	-	74	49%
CSV6	855	857	exon 1	CGG	-	41	54%
BOC4-KR	855	860	exon 1	CGGCGG	-	138	91%
Canis lupus lupus 27/II	855	860	exon 1	CGGCGG	-	69	43%
CSV6	858	860	exon 1	CGG	-	41	46%
BRT1-KR	2352	2352	exon 2	T	C	7	100%
CSV1	2352	2352	exon 2	T	C	13	100%
CSV10	2352	2352	exon 2	T	C	8	100%
CSV11	2352	2352	exon 2	T	C	6	100%
CSV12	2352	2352	exon 2	T	C	9	100%
CSV13	2352	2352	exon 2	T	C	6	100%
CSV14	2352	2352	exon 2	T	C	7	100%
CSV15	2352	2352	exon 2	T	C	16	100%
CSV16	2352	2352	exon 2	T	C	18	100%
CSV17	2352	2352	exon 2	T	C	4	100%
CSV18	2352	2352	exon 2	T	C	11	100%
CSV2	2352	2352	exon 2	T	C	12	100%
CSV20	2352	2352	exon 2	T	C	12	100%
CSV21	2352	2352	exon 2	T	C	11	100%
CSV23	2352	2352	exon 2	T	C	6	100%
CSV24	2352	2352	exon 2	T	C	10	100%
CSV3	2352	2352	exon 2	T	C	6	100%
CSV4	2352	2352	exon 2	T	C	5	100%
CSV6	2352	2352	exon 2	T	C	8	100%

P3-KR	2352	2352	exon 2	T	C	6	100%
BOC4-KR	2352	2352	exon 2	T	C	19	100%
LAB3	2352	2352	exon 2	T	C	4	100%
Canis lupus lupus 168/I	2352	2352	exon 2	T	C	20	100%
Canis lupus lupus 27/II	2352	2352	exon 2	T	C	9	100%
Canis lupus lupus 168/I	2357	2357	exon 2	T	C	20	10%

Tabulka 19: Detekované polymorfismy v exonových a UTR sekvencích genu *INSL3*

Vzorek	Lokalizace polymorfismu		Číslo exonu/UTR	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení	Frekvence výskytu polymorfismu
	Začátek	Konec					
CSV21	739	739	5-UTR	G	C	14	100%
LAB3	739	739	5-UTR	G	C	2	100%
Canis lupus lupus 168/I	739	739	5-UTR	G	C	40	100%
CSV1	767	767	5-UTR	A	T	12	75%
CSV10	767	767	5-UTR	A	T	23	74%
CSV11	767	767	5-UTR	A	T	8	100%
CSV12	767	767	5-UTR	A	T	11	73%
CSV16	767	767	5-UTR	A	T	4	100%
CSV2	767	767	5-UTR	A	T	14	79%
CSV15	774	776	5-UTR	AAG	GA	18	44%
CSV18	774	776	5-UTR	AAG	GA	10	60%
CSV24	826	826	5-UTR	T	C	16	12%
P3-KR	872	872	5-UTR	T	C	13	15%
CSV1	934	934	5-UTR	G	A	13	31%
CSV11	934	934	5-UTR	G	A	13	46%
CSV12	934	934	5-UTR	G	A	14	64%
CSV15	934	934	5-UTR	G	A	22	36%
CSV16	934	934	5-UTR	G	A	4	50%
CSV2	934	934	5-UTR	G	A	16	56%
CSV20	934	934	5-UTR	G	A	11	100%
CSV21	934	934	5-UTR	G	A	21	95%

CSV24	934	934	5-UTR	G	A	18	61%
CSV6	934	934	5-UTR	G	A	23	48%
P3-KR	934	934	5-UTR	G	A	13	62%
Canis lupus lupus 27/II	934	934	5-UTR	G	A	5	60%
BRT1-KR	960	960	exon 1	G	A	5	60%
CSV1	960	960	exon 1	G	A	13	31%
CSV11	960	960	exon 1	G	A	12	50%
CSV12	960	960	exon 1	G	A	13	62%
CSV15	960	960	exon 1	G	A	24	33%
CSV16	960	960	exon 1	G	A	3	67%
CSV2	960	960	exon 1	G	A	16	56%
CSV20	960	960	exon 1	G	A	11	91%
CSV21	960	960	exon 1	G	A	21	100%
CSV24	960	960	exon 1	G	A	19	63%
CSV6	960	960	exon 1	G	A	21	52%
P3-KR	960	960	exon 1	G	A	14	57%
Canis lupus lupus 27/II	960	960	exon 1	G	A	5	60%
CSV12	1007	1007	exon 1	G	A	16	12%
BRT1-KR	1022	1022	exon 1	A	G	5	80%
CSV1	1022	1022	exon 1	A	G	13	38%
CSV11	1022	1022	exon 1	A	G	17	65%
CSV12	1022	1022	exon 1	A	G	16	62%
CSV14	1022	1022	exon 1	A	G	4	75%
CSV15	1022	1022	exon 1	A	G	31	32%
CSV16	1022	1022	exon 1	A	G	4	50%
CSV2	1022	1022	exon 1	A	G	19	58%

CSV20	1022	1022	exon 1	A	G	10	100%
CSV21	1022	1022	exon 1	A	G	22	100%
CSV24	1022	1022	exon 1	A	G	22	68%
CSV6	1022	1022	exon 1	A	G	25	48%
P3-KR	1022	1022	exon 1	A	G	19	47%
Canis lupus lupus 27/II	1022	1022	exon 1	A	G	7	100%
CSV1	1080	1080	exon 1	C	T	11	18%
Canis lupus lupus 168/I	2171	2171	exon 2	T	C	31	10%
Canis lupus lupus 168/I	2225	2225	exon 2	T	C	33	12%
CSV1	2273	2273	3-UTR	T	C	8	25%
Canis lupus lupus 27/II	2348	2348	3-UTR	C	T	5	60%
Canis lupus lupus 27/II	2410	2410	3-UTR	C	T	4	50%
CSV20	2446	2446	3-UTR	-	C	6	100%
Canis lupus lupus 168/I	2446	2446	3-UTR	-	C	18	94%
CSV15	2447	2447	3-UTR	A	C	19	58%
CSV4	2450	2450	3-UTR	A	C	4	75%
Canis lupus lupus 27/II	2527	2527	3-UTR	A	G	7	29%
Canis lupus lupus 27/II	2538	2538	3-UTR	T	C	8	25%
Canis lupus lupus 168/I	2641	2641	3-UTR	C	TCT	28	18%
CSV16	2672	2672	3-UTR	A	T	14	14%
BRT1-KR	2694	2694	3-UTR	C	G	5	40%
CSV1	2694	2695	3-UTR	CA	-	14	21%
CSV16	2694	2694	3-UTR	C	G	15	13%
CSV20	2694	2695	3-UTR	CA	-	11	18%
CSV6	2694	2695	3-UTR	CA	-	19	11%
Canis lupus lupus 27/II	2694	2695	3-UTR	CA	-	7	29%

CSV1	2703	2703	3-UTR	A	G	14	21%
CSV20	2703	2703	3-UTR	A	G	11	18%
CSV6	2703	2703	3-UTR	A	G	19	11%
Canis lupus lupus 27/II	2703	2703	3-UTR	A	G	7	29%
CSV16	2712	2712	3-UTR	T	C	14	14%
CSV24	2732	2732	3-UTR	A	G	10	20%
CSV1	2736	2736	3-UTR	C	T	14	21%
CSV14	2736	2736	3-UTR	C	T	8	37%
CSV17	2736	2736	3-UTR	C	T	4	75%
CSV6	2736	2736	3-UTR	C	T	17	12%
BOC-KR	2736	2736	3-UTR	C	T	2	100%
Canis lupus lupus 27/II	2736	2736	3-UTR	C	T	6	50%
CSV1	2737	2737	3-UTR	A	G	14	21%
CSV14	2737	2737	3-UTR	A	G	8	37%
CSV17	2737	2737	3-UTR	A	G	4	75%
CSV20	2737	2737	3-UTR	A	G	8	25%
CSV6	2737	2737	3-UTR	A	G	17	18%
BOC-KR	2737	2737	3-UTR	A	G	2	100%
Canis lupus lupus 27/II	2737	2737	3-UTR	A	G	6	50%
CSV1	2741	2741	3-UTR	T	C	14	21%
CSV14	2741	2741	3-UTR	T	C	9	44%
CSV17	2741	2741	3-UTR	T	C	4	75%
CSV20	2741	2741	3-UTR	T	C	8	25%
CSV6	2741	2741	3-UTR	T	C	17	12%
BOC-KR	2741	2741	3-UTR	T	C	2	100%
Canis lupus lupus 27/II	2741	2741	3-UTR	T	C	6	50%

CSV1	2742	2742	3-UTR	G	A	14	21%
CSV14	2742	2742	3-UTR	G	A	9	44%
CSV17	2742	2742	3-UTR	G	A	4	75%
CSV20	2742	2742	3-UTR	G	A	8	25%
CSV6	2742	2742	3-UTR	G	A	17	12%
BOC-KR	2742	2742	3-UTR	G	A	2	100%
Canis lupus lupus 27/II	2742	2742	3-UTR	G	A	6	50%
CSV1	2748	2748	3-UTR	A	C	15	27%
CSV14	2748	2748	3-UTR	A	C	9	44%
CSV17	2748	2748	3-UTR	A	C	5	80%
CSV2	2748	2748	3-UTR	-	T	12	17%
CSV2	2748	2748	3-UTR	A	C	12	25%
CSV20	2748	2748	3-UTR	A	C	10	40%
CSV6	2748	2748	3-UTR	A	C	18	11%
BOC-KR	2748	2748	3-UTR	A	C	2	100%
Canis lupus lupus 27/II	2748	2748	3-UTR	A	C	6	50%
CSV1	2749	2749	3-UTR	G	T	15	27%
CSV14	2749	2749	3-UTR	G	T	9	44%
CSV17	2749	2749	3-UTR	G	T	5	80%
CSV20	2749	2749	3-UTR	G	T	10	40%
CSV6	2749	2749	3-UTR	G	T	18	11%
BOC-KR	2749	2749	3-UTR	G	T	2	100%
Canis lupus lupus 27/II	2749	2749	3-UTR	G	T	6	50%
CSV16	2762	2762	3-UTR	C	T	15	20%
CSV1	2763	2763	3-UTR	G	A	15	20%
CSV14	2763	2763	3-UTR	G	A	9	44%

CSV17	2763	2763	3-UTR	G	A	5	80%
CSV20	2763	2763	3-UTR	G	A	15	20%
BOC-KR	2763	2763	3-UTR	G	A	4	75%
Canis lupus lupus 27/II	2763	2763	3-UTR	G	A	6	50%
CSV24	2770	2770	3-UTR	T	-	15	20%
BRT1-KR	2779	2779	3-UTR	C	T	6	33%
CSV16	2779	2779	3-UTR	C	T	18	17%
BRT1-KR	2781	2781	3-UTR	A	G	6	33%
CSV16	2781	2781	3-UTR	A	G	18	22%
CSV16	2784	2784	3-UTR	G	CA	18	11%
CSV20	2790	2790	3-UTR	C	T	13	31%
CSV4	2790	2790	3-UTR	C	T	13	15%
CSV16	2791	2791	3-UTR	G	A	18	11%
CSV24	2791	2791	3-UTR	-	ACG	15	20%
LAB3	2791	2791	3-UTR	-	ACG	6	33%
CSV4	2794	2794	3-UTR	C	T	13	15%
BRT1-KR	2804	2804	3-UTR	A	G	5	40%
CSV1	2804	2804	3-UTR	A	G	16	37%
CSV14	2804	2804	3-UTR	A	G	8	50%
CSV16	2804	2804	3-UTR	A	G	18	33%
CSV17	2804	2804	3-UTR	A	G	5	100%
CSV18	2804	2804	3-UTR	A	G	32	12%
CSV20	2804	2804	3-UTR	A	G	9	22%
CSV24	2804	2804	3-UTR	A	G	14	29%
CSV4	2804	2804	3-UTR	A	G	12	17%
CSV6	2804	2804	3-UTR	A	G	15	13%

BOC-KR	2804	2804	3-UTR	A	G	3	100%
LAB3	2804	2804	3-UTR	A	G	6	33%
Canis lupus lupus 27/II	2804	2804	3-UTR	A	G	5	60%
CSV1	2808	2808	3-UTR	C	T	16	25%
CSV14	2808	2808	3-UTR	C	T	8	50%
CSV17	2808	2808	3-UTR	C	T	5	100%
CSV20	2808	2808	3-UTR	C	T	9	22%
CSV6	2808	2808	3-UTR	C	T	15	13%
BOC-KR	2808	2808	3-UTR	C	T	3	100%
Canis lupus lupus 27/II	2808	2808	3-UTR	C	T	5	60%
Canis lupus lupus 168/I	2858	2858	3-UTR	A	G	25	12%
CSV6	2956	2956	3-UTR	A	G	14	14%
CSV24	2987	2987	3-UTR	A	G	10	20%
Canis lupus lupus 168/I	2987	2987	3-UTR	A	G	35	11%
CSV21	3041	3041	3-UTR	T	C	20	10%
Canis lupus lupus 168/I	3048	3048	3-UTR	A	G	34	100%
CSV12	3055	3055	3-UTR	-	C	6	83%
CSV15	3055	3055	3-UTR	-	C	32	34%
CSV11	3128	3128	3-UTR	T	C	13	15%
CSV1	3197	3197	3-UTR	A	G	10	50%
CSV11	3197	3197	3-UTR	A	G	12	58%
CSV12	3197	3197	3-UTR	A	G	7	43%
CSV15	3197	3197	3-UTR	A	G	38	61%
CSV16	3197	3197	3-UTR	A	G	10	60%
CSV2	3197	3197	3-UTR	A	G	11	55%
CSV20	3197	3197	3-UTR	A	G	5	100%

CSV21	3197	3197	3-UTR	A	G	14	100%
CSV24	3197	3197	3-UTR	A	G	11	64%
CSV6	3197	3197	3-UTR	A	G	12	25%
P3-KR	3197	3197	3-UTR	A	G	4	50%
Canis lupus lupus 168/I	3197	3197	3-UTR	A	G	34	100%
Canis lupus lupus 27/II	3197	3197	3-UTR	A	G	5	40%
CSV21	3233	3233	3-UTR	A	G	10	20%
CSV4	3333	3333	3-UTR	A	G	15	13%
CSV4	3344	3344	3-UTR	A	G	15	13%
CSV6	3349	3349	3-UTR	A	G	19	11%
CSV15	3359	3359	3-UTR	T	C	40	10%
CSV18	3445	3445	3-UTR	T	C	19	16%
CSV11	3469	3469	3-UTR	A	G	10	20%
CSV4	3485	3485	3-UTR	T	C	17	12%
Canis lupus lupus 27/II	3530	3530	3-UTR	G	A	6	33%
CSV4	3554	3554	3-UTR	T	C	15	13%
CSV23	3595	3595	3-UTR	T	C	18	11%
Canis lupus lupus 27/II	3622	3622	3-UTR	A	G	7	29%
CSV23	3630	3630	3-UTR	A	G	18	11%
CSV20	3634	3634	3-UTR	T	C	10	30%
LAB3	3654	3654	3-UTR	T	A	7	86%
CSV1	3664	3664	3-UTR	A	C	11	45%
CSV11	3664	3664	3-UTR	A	C	11	82%
CSV12	3664	3664	3-UTR	A	C	4	50%
CSV15	3664	3664	3-UTR	A	C	33	48%
CSV16	3664	3664	3-UTR	A	C	7	43%

CSV2	3664	3664	3-UTR	A	C	6	83%
CSV20	3664	3664	3-UTR	A	C	10	100%
CSV21	3664	3664	3-UTR	A	C	18	100%
CSV24	3664	3664	3-UTR	A	C	20	65%
CSV6	3664	3664	3-UTR	A	C	17	24%
Canis lupus lupus 168/I	3664	3664	3-UTR	A	C	37	100%
CSV6	3690	3690	3-UTR	A	G	19	11%
CSV21	3755	3755	3-UTR	A	G	21	10%
CSV2	3824	3824	3-UTR	C	T	9	22%
CSV23	3849	3849	3-UTR	T	C	13	15%
CSV21	3991	3991	3-UTR	-	C	21	14%
CSV11	4133	4133	3-UTR	A	G	3	67%
CSV23	4173	4173	3-UTR	T	C	8	25%
CSV15	4203	4203	3-UTR	T	C	18	11%

Tabulka 20: Detekované polymorfismy v exonových sekvencích genu *INHA*

Vzorek	Lokalizace polymorfismu		Číslo exonu	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení	Frekvence výskytu polymorfismu
	Začátek	Konec					
BRT1-KR	6063	6063	exon 2	C	T	8	100%
CSV14	6063	6063	exon 2	C	T	14	86%
CSV18	6063	6063	exon 2	C	T	16	100%
BRT1-KR	6072	6072	exon 2	C	G	7	100%
CSV14	6072	6072	exon 2	C	G	15	80%
CSV18	6072	6072	exon 2	C	G	16	87%
Canis lupus lupus 168/I	6085	6085	exon 2	G	A	13	100%
BRT1-KR	6150	6150	exon 2	G	A	9	100%
CSV14	6150	6150	exon 2	G	A	14	79%
CSV18	6150	6150	exon 2	G	A	16	100%
LAB3	6150	6150	exon 2	G	A	9	44%
BRT1-KR	6171	6171	exon 2	C	A	9	100%
CSV14	6171	6171	exon 2	C	A	12	75%
CSV18	6171	6171	exon 2	C	A	17	100%
LAB3	6171	6171	exon 2	C	A	11	100%
Canis lupus lupus 168/I	6171	6171	exon 2	C	A	18	100%
CSV12	6268	6268	exon 2	C	-	7	71%
LAB3	6321	6321	exon 2	C	T	11	36%
Canis lupus lupus 27/II	6384	6384	exon 2	C	-	2	100%
CSV14	6388	6388	exon 2	T	C	10	90%
CSV18	6388	6388	exon 2	T	C	10	100%

LAB3	6388	6388	exon 2	T	C	9	67%
Canis lupus lupus 168/I	6388	6388	exon 2	T	C	12	100%
BRT1-KR	6403	6403	exon 2	C	A	2	100%
CSV14	6403	6403	exon 2	C	A	11	91%
CSV18	6403	6403	exon 2	C	A	10	100%
LAB3	6403	6403	exon 2	C	A	8	75%
LAB3	6474	6474	exon 2	G	A	8	25%
Canis lupus lupus 168/I	6513	6513	exon 2	C	T	10	100%
CSV14	6578	6578	exon 2	A	G	12	100%
CSV18	6578	6578	exon 2	A	G	8	100%
LAB3	6578	6578	exon 2	A	G	7	100%
Canis lupus lupus 168/I	6578	6578	exon 2	A	G	8	100%

Tabulka 21: Detekované polymorfismy v exonových sekvencích genu *TIMP1*

Vzorek	Lokalizace polymorfismu		Číslo exonu	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení	Frekvence výskytu polymorfismu
	Začátek	Konec					
CSV6	2169	2169	exon 2	-	C	81	10%
Canis lupus lupus 27/II	3791	3791	exon 5	A	G	33	12%
CSV18	4670	4670	exon 6	T	C	11	18%

5.2 Přehled genotypů, které byly použity pro odvození jednotlivých haplotypů genů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1*

V následujících tabulkách je uveden přehled pyrosekvenovaných genotypů, které je možné přiřadit k jednotlivým haplotypům. Zařazení k haplotypům vychází z předpokladu, že každý haplotyp je charakterizovaný výskytem mutovaného místa bez ohledu na to, zdali se u daného jedince tato mutace vyskytovala v homozygotní nebo heterozygotní sestavě.

Tabulka 22: Přehled jednotlivých haplotypů u sekvencí genu *HOXA10*

Sekvence	Haplotyp	Zařazené genotypy
Exony	1	P3-KR
	2	CSV24
	3	Canis lupus lupus 168/I
	4	CSV17
	5	Canis lupus lupus 27/II
	6	CSV3
	7	CSV1, CSV12
	8	CSV2
	9	CSV18
	10	LAB3
	11	CSV10
	12	CSV15
	13	CSV11
	14	CSV4
	15	CSV6, CSV13
	16	CSV14
	17	BRT1-KR
	18	BOC4-KR, CSV21
	19	Ref.seq.
	20	CSV16, CSV20, CSV23

Tabulka 22: Přehled jednotlivých haplotypů u sekvencí genu *HOXA10* - pokračování

Sekvence	Haplotyp	Zařazené genotypy
AMK	1	P3-KR
	2	CSV24
	3	CSV15
	4	CSV18
	5	Canis lupus lupus 168/I
	6	CSV17
	7	BOC4-KR, CSV6, CSV13, CSV14, CSV21
	8	Ref.seq., BRT1-KR, LAB3, CSV4, CSV10, CSV11, CSV16, CSV20, CSV23
	9	CSV1, CSV3, CSV12
	10	Canis lupus lupus 27/II, CSV2

Tabulka 23: Přehled jednotlivých haplotypů u sekvencí genu *INSL3*

Sekvence	Haplotyp	Zařazené genotypy
Exony	1	CSV14
	2	CSV12
	3	CSV1
	4	Canis lupus lupus 168/I
	5	Ref.seq., BOC4-KR, LAB3, CSV3, CSV4, CSV10, CSV13, CSV17, CSV18, CSV23
	6	BRT1-KR, P3-KR, Canis lupus lupus 27/II, CSV2, CSV6, CSV11, CSV15, CSV16, CSV20, CSV21, CSV24
5-UTR	1	CSV24
	2	P3-KR
	3	Ref.seq., BRT1-KR, BOC4-KR, CSV3, CSV4, CSV13, CSV14, CSV17, CSV18, CSV23
	4	Canis lupus lupus 27/II, CSV6, CSV15, CSV20
	5	CSV10
	6	CSV1, CSV2, CSV11, CSV12, CSV16
	7	CSV21
	8	Canis lupus lupus 168/I, LAB3

Tabulka 23: Přehled jednotlivých haplotypů u sekvencí genu *INSL3* - pokračování

Sekvence	Haplotyp	Zařazené genotypy
3-UTR	1	Canis lupus lupus 27/II
	2	CSV1
	3	CSV15
	4	CSV4
	5	CSV16
	6	BRT1-KR
	7	CSV24
	8	CSV6
	9	CSV20
	10	CSV2
	11	Canis lupus lupus 168/I
	12	CSV21
	13	CSV11
	14	CSV18
	15	LAB3
	16	Ref.seq.
	17	CSV12
	18	P3-KR
	19	CSV23
	20	CSV 3, CSV10, CSV13
	21	BOC4-KR, CSV14, CSV17
AMK	1	CSV1
	2	Ref.seq., Canis lupus lupus 168/I, BOC4-KR, LAB3, CSV3, CSV4, CSV10, CSV13, CSV14, CSV17, CSV18, CSV23
	3	BRT1-KR, P3-KR, Canis lupus lupus 27/II, CSV2, CSV6, CSV11, CSV12, CSV15, CSV16, CSV20, CSV21, CSV24

Tabulka 24: Přehled jednotlivých haplotypů u sekvencí genu *INHA*

Sekvence	Haplotyp	Zařazené genotypy
Exony	1	Canis lupus lupus 168/I
	2	LAB3
	3	Ref.seq., BOC4-KR, P3-KR, Canis lupus lupus 27/II, CSV1, CSV2, CSV3, CSV4, CSV6, CSV10, CSV11, CSV12, CSV13, CSV15, CSV16, CSV17, CSV20, CSV21, CSV23, CSV24
	4	BRT1-KR
	5	CSV14, CSV18
3-UTR	1	-
AMK	1	Canis lupus lupus 168/I
	2	CSV14, CSV18
	3	Ref.seq., BRT1-KR, P3-KR, BOC4-KR, LAB3, Canis lupus lupus 27/II, CSV1, CSV2, CSV3, CSV4, CSV6, CSV10, CSV11, CSV12, CSV13, CSV15, CSV16, CSV17, CSV20, CSV21, CSV23, CSV24

Tabulka 25: Přehled jednotlivých haplotypů u sekvencí genu *TIMP1*

Sekvence	Haplotyp	Zařazené genotypy
Exony	1	Canis lupus lupus 27/II
	2	CSV18
	3	Ref.seq., BRT1-KR, P3-KR, BOC4-KR, LAB3, Canis lupus lupus 168/I, CSV1, CSV2, CSV3, CSV4, CSV6, CSV10, CSV11, CSV12, CSV13, CSV14, CSV15, CSV16, CSV17, CSV20, CSV21, CSV23, CSV24
5-UTR	1	-
3-UTR	1	-
AMK	1	Canis lupus lupus 27/II
	2	CSV18
	3	Ref.seq., BRT1-KR, P3-KR, BOC4-KR, LAB3, Canis lupus lupus 168/I, CSV1, CSV2, CSV3, CSV4, CSV6, CSV10, CSV11, CSV12, CSV13, CSV14, CSV15, CSV16, CSV17, CSV20, CSV21, CSV23, CSV24

5.3 Sekvence aminokyselin kódovaných jednotlivými haplotypy studovaných genů

Výstupem pyrosekvenace a následného bioinformatického zpracování dat byly informace o úplných sekvencích kódujících i nekódujících částí studovaných genů. Tyto sekvence byly zpracovány v programu BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999) a sloužily jako vstupní data pro program MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). Vzhledem k objemu dat, která byla získána, tyto sekvence v diplomové práci neuvádím. Přehlednější a stručnější je přehled aminokyselinových sekvencí proteinů odvozených na základě translace kódujících sekvencí. Tyto sekvence respektive jejich mnohonásobné porovnání (alignment) je prezentováno na následujících obrázcích.

Pro označení jednotlivých aminokyselin byl použit systém IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry – www.iupac.org). Program BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999) tyto sekvence zpracoval tak, že homologní – identické aminokyseliny byly řazeny pod sebou a na následujících obrázcích jsou označeny tečkou příslušné barvy. Aminokyseliny, u kterých došlo vzhledem k srovnávací sekvenci k delecí, jsou označeny pomlčkou. Sekvence, které se liší substitucí aminokyselin, jsou na obrázcích charakteristické patřičným písmenem označujícím substituovanou aminokyselinu.

Obrázek 4: Porovnání aminokyselinových sekvencí kódovaných jednotlivými haplotypy u genu *HOXA10*



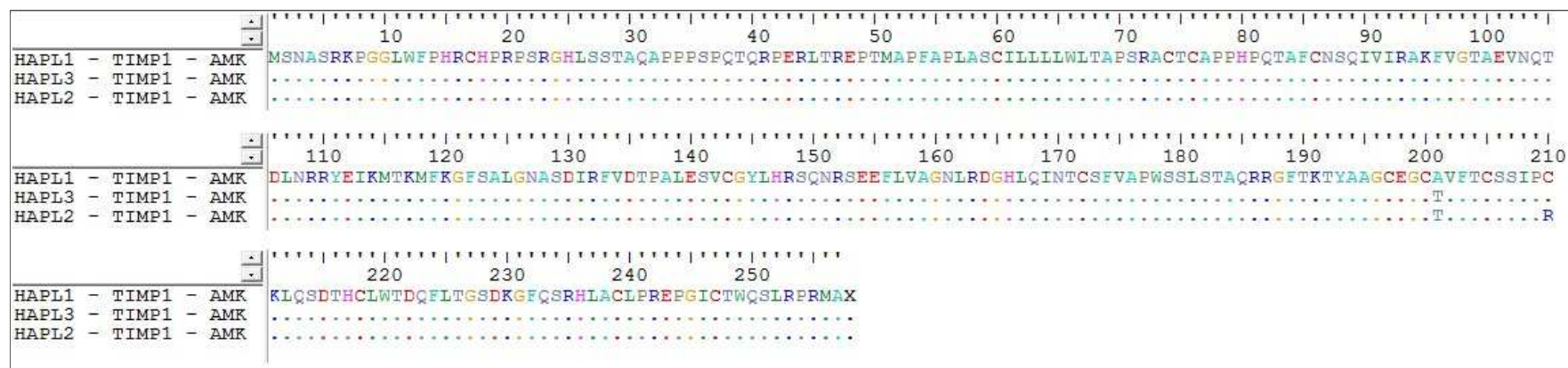
Obrázek 5: Porovnání aminokyselinových sekvencí kódovaných jednotlivými haplotypy u genu *INSL3*

			10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
HAPL1 - INSL3 - AMK	S	E	R	P	L	A	W	A	L	V	L	L
HAPL2 - INSL3 - AMK	G
HAPL3 - INSL3 - AMK
			110	120								
HAPL1 - INSL3 - AMK	G	E	Q	L	P	P	I	P	H	T	T	A
HAPL2 - INSL3 - AMK
HAPL3 - INSL3 - AMK

Obrázek 6: Porovnání aminokyselinových sekvencí kódovaných jednotlivými haplotypy u genu *INHA*

			10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
HAPL1 - INHA - AMK	M	L	P	Q	L	L	L	L	L	L	L	L
HAPL2 - INHA - AMK
HAPL3 - INHA - AMK
			110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
HAPL1 - INHA - AMK	Q	K	A	E	D	G	L	F	T	Y	M	F
HAPL2 - INHA - AMK
HAPL3 - INHA - AMK
			220	230	240	250	260	270	280	290	300	310
HAPL1 - INHA - AMK	P	E	A	T	F	L	V	A	H	T	R	A
HAPL2 - INHA - AMK
HAPL3 - INHA - AMK
			320	330	340	350	360					
HAPL1 - INHA - AMK	P	V	Q	P	L	S	L	V	P	G	A	Q
HAPL2 - INHA - AMK
HAPL3 - INHA - AMK

Obrázek 7: Porovnání aminokyselinových sekvencí kódovaných jednotlivými haplotypy u genu *TIMP1*



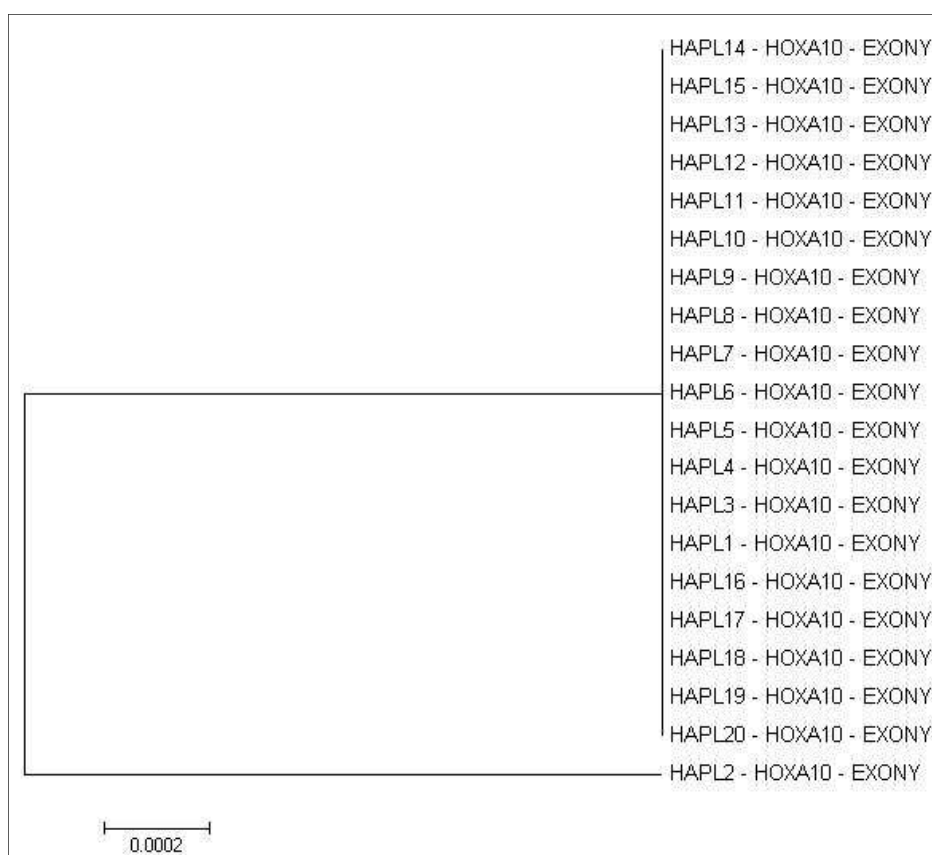
5.4 Kladogramy vyjadřující podobnosti haplotypů studovaných genů

Výstupem programu MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013), který byl využit k porovnání nalezených haplotypů jednotlivých genů, byly kladogramy znázorňující jejich fylogenetickou příbuznost a sekvenční podobnost.

5.4.1 Kladogramy exonových sekvencí genu *HOXA10* a proteinových produktů kódovaných tímto genem

Na obrázku 8 je uveden kladogram, který vyjadřuje evoluční podobnosti mezi haplotypy exonových částí genu *HOXA10*. Pro konstrukci kladogramu byla použita metoda maximální věrohodnosti s 3-parametrovým modelem (Tamura, 1992). Tento strom vykazuje nejvyšší hodnotu logaritmu pravděpodobnosti (-557,29).

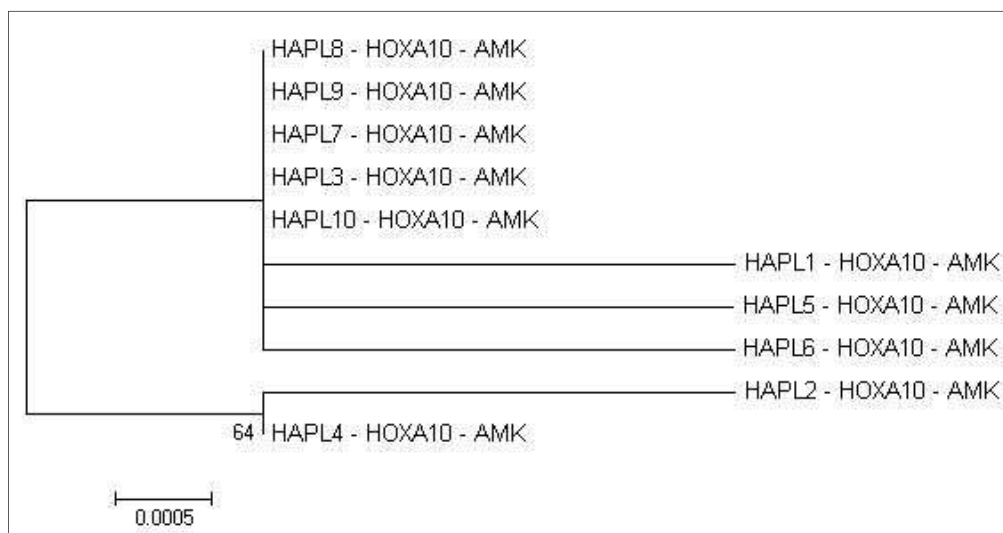
Obrázek 8: Kladogram vyjadřující sekvenční podobnosti haplotypů exonových oblastí genu *HOXA10*.



Program MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) na základě originálního stromu vyčlenil dvě odlišné větve, kdy k samostatné větvi byl zařazený haplotyp 2. Ostatní haplotypy byly zařazené do společné skupiny.

Na obrázku 9 je uveden kladogram, který byl sestaven na základě aminokyselinového složení polypeptidu kódovaného exony genu *HOXA10*. Tento kladogram je charakteristický nejvyšší hodnotou logaritmu pravděpodobnosti (-1214,85). Pro konstrukci kladogramu byl použit Dayhoffův model (Schwarz a Dayhoff, 1979).

Obrázek 9: Kladogram vyjadřující sekvenční podobnosti haplotypů aminokyselinových sekvencí genu *HOXA10*.

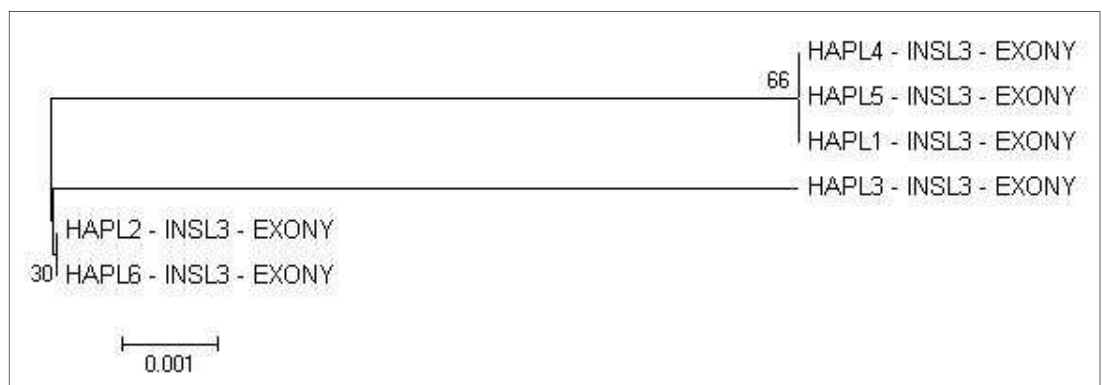


Na základě originálního stromu vyčlenil program MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) dvě odlišné větve, které se dále dělily do dalších dvou respektive čtyř skupin.

5.4.2 Kladogramy exonových a UTR sekvencí genu *INSL3*

Na obrázku 10 je uveden kladogram, který vyjadřuje evoluční podobnosti mezi haplotypy exonových částí genu *INSL3*. Pro konstrukci kladogramu byla použita metoda maximální věrohodnosti s 3-parametrovým modelem (Tamura, 1992). Tento strom vykazuje nejvyšší hodnotu logaritmu pravděpodobnosti (-183,33).

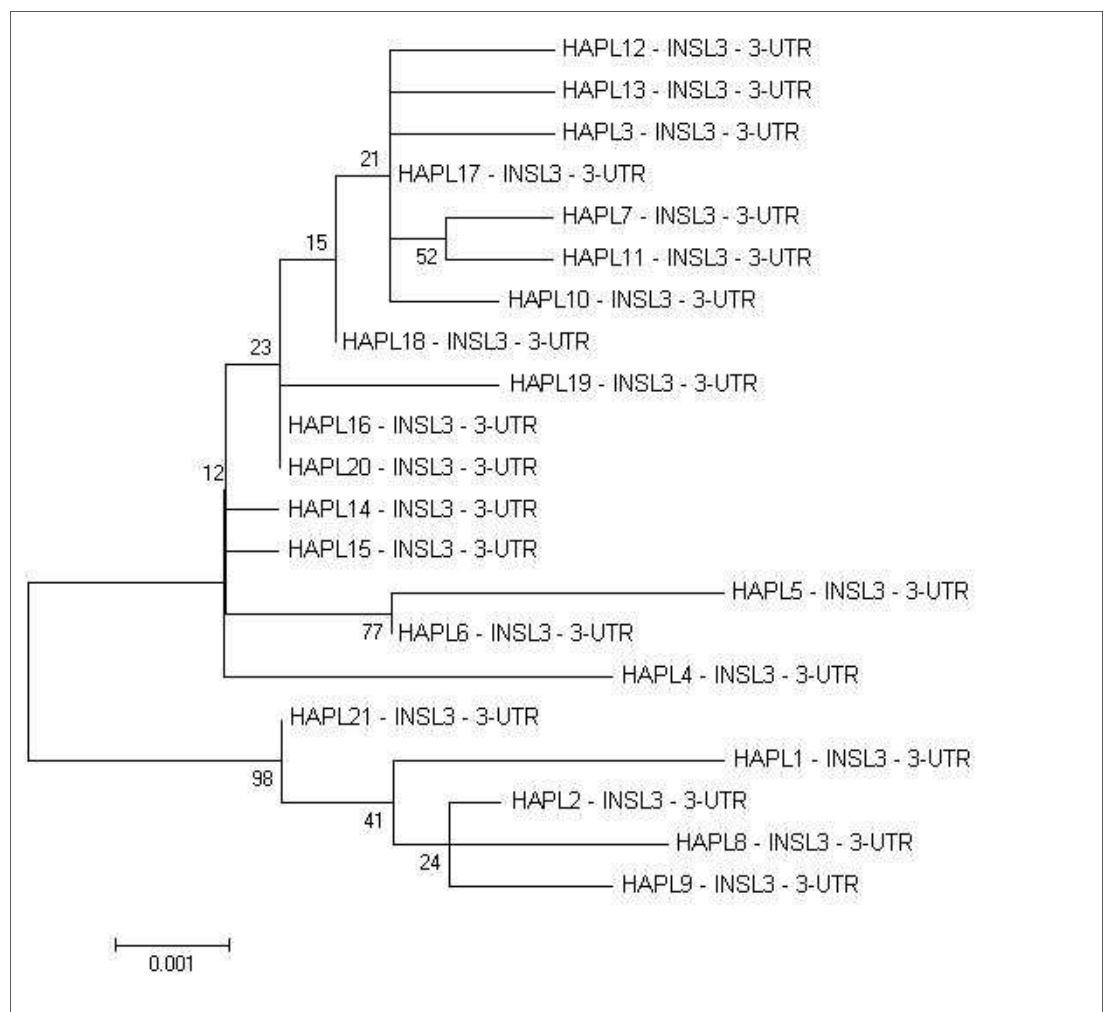
Obrázek 10: Kladogram vyjadřující sekvenční podobnosti haplotypů exonových oblastí genu *INSL3*.



Na základě originálního stromu byly programem MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) odlišeny tři různé větve. Samostatně byl zařazen haplotyp 3.

Na obrázku 11 je uveden kladogram, který vyjadřuje evoluční podobnosti mezi haplotypy 3-UTR sekvencí genu *INSL3*. Pro konstrukci kladogramu byla použita metoda maximální věrohodnosti s 2 parametrovým modelem a gama distribucí (Kimura, 1980). Tento strom vykazuje nejvyšší hodnotu logaritmu pravděpodobnosti (-3374,88).

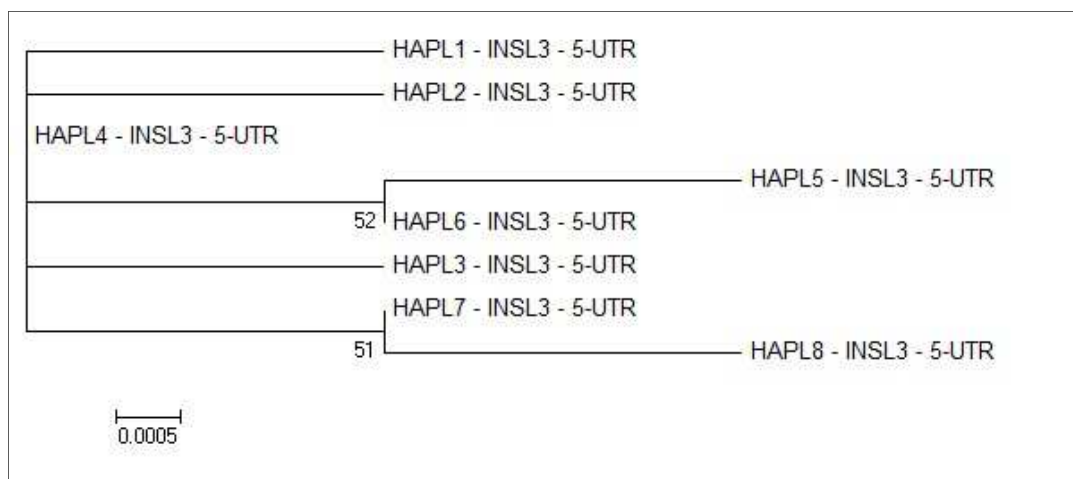
Obrázek 11: Kladogram vyjadřující sekvenční podobnosti haplotypů 3-UTR sekvence genu *INSL3*.



Z výše uvedeného obrázku vyplývá, že kladogram vyjadřující podobnost sekvencí 3-UTR oblastí genu *INSL3* vykazuje v porovnání s ostatními výsledky evoluční analýzy největší členitost. Na základě originálního stromu vyčlenil program MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) původní odlišné větve, od kterých jsou odvozeny ostatní haplotypy.

Na obrázku 12 je uveden kladogram, který vyjadřuje evoluční podobnosti mezi haplotypy 5-UTR sekvencí genu *INSL3*. Pro konstrukci kladogramu byla použita metoda maximální věrohodnosti modelem podle Jukes a Cantor (1969). Tento strom vykazuje nejvyšší hodnotu logaritmu pravděpodobnosti (-549,33).

Obrázek 12: Kladogram vyjadřující sekvenční podobnosti haplotypů 5-UTR sekvencí genu *INSL3*

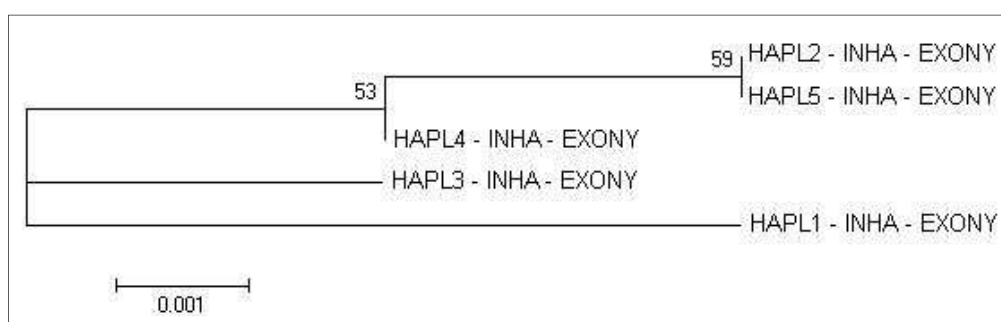


Výstup z programu MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013), který je na obrázku 12, znázorňuje, že z haplotypu 4 se postupnou evolucí vyvinuly zbývající typy haplotypů, přičemž haplotyp 5 a haplotyp 8 vykazují největší evoluční vzdálenost od haplotypu 4.

5.4.3 Kladogramy exonových sekvencí genu *INHA* a proteinových produktů kódovaných tímto genem

Na obrázku 13 je uveden kladogram, který vyjadřuje evoluční podobnosti mezi haplotypy exonových částí genu *INHA*. Pro konstrukci kladogramu byla použita metoda maximální věrohodnosti s 3-parametrovým modelem (Tamura, 1992). Tento strom vykazuje nejvyšší hodnotu logaritmu pravděpodobnosti (-514,74).

Obrázek 13: Kladogram vyjadřující sekvenční podobnosti haplotypů exonových oblastí genu *INHA*



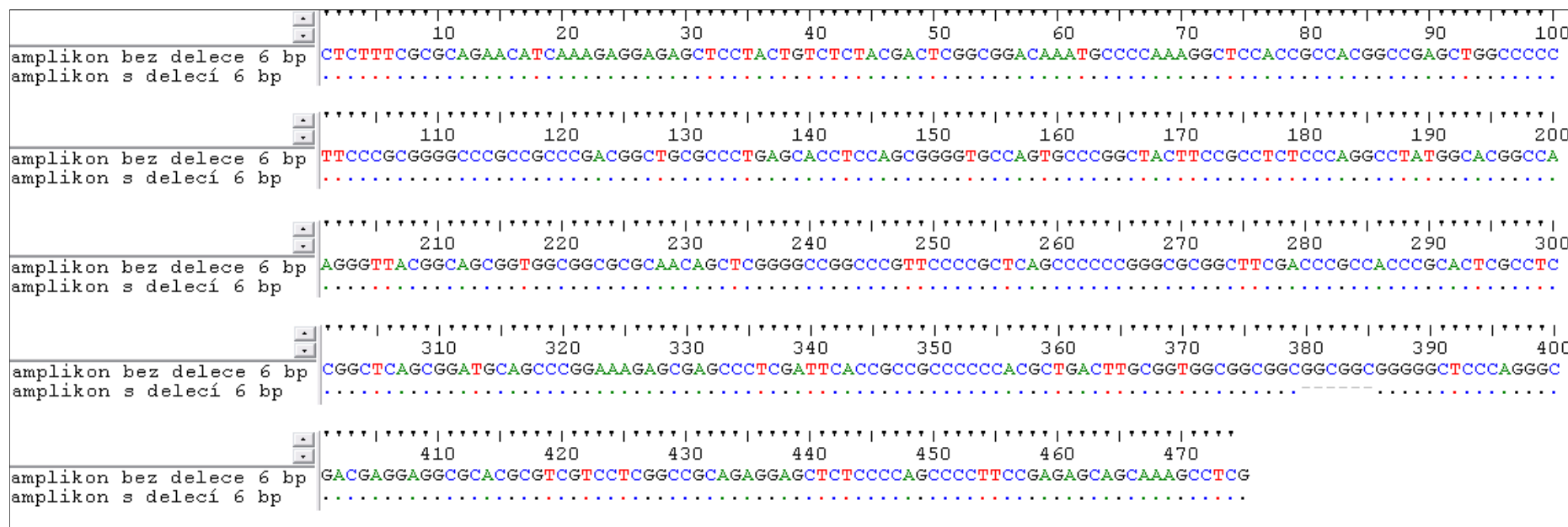
Program MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) na základě originálního stromu vyčlenil tři odlišné větve. K samostatné větvi byl zařazen haplotyp 1 a haplotyp 3. Třetí větev byla dále rozdělena na další dvě skupiny.

5.5 Variabilita PCR markeru delece 855-860 v exonu 1 genu *HOXA10*

5.5.1 Výsledky resekvenací oblasti s výskytem delece 855-860

PCR produkty byly úspěšně resekvenovány s využitím sekvenačních primerů *HOXA10*-855seq-F a *HOXA10*-855seq-R. Z těchto nově získaných sekvencí vyplynulo, že se v ampliconech nacházely identické mutace, které byly zjištěny pomocí pyrosekvence. Porovnání těchto sekvencí je uvedeno na obrázku 14.

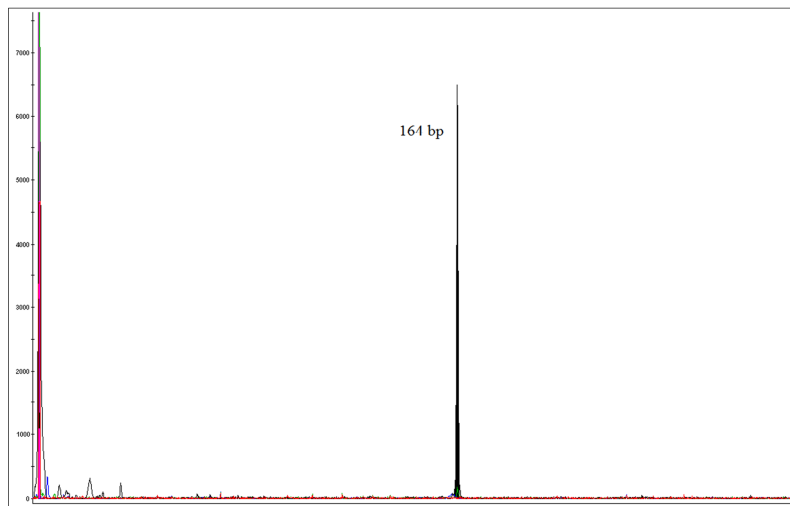
Obrázek 14: Porovnání sekvencí ampliconů bez delece 6 bp a s delecí 6 bp



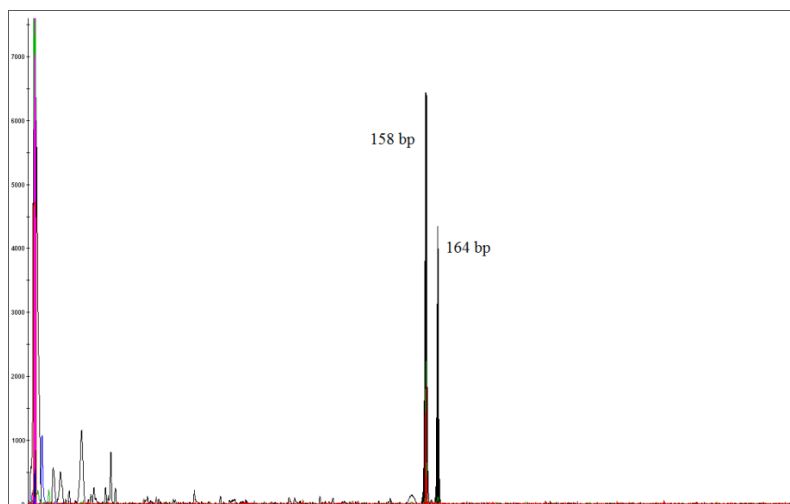
5.5.2 Délkový polymorfismus nově navrženého markeru delece 855-860 v exonu 1 genu *HOXA10* stanovený kapilární elektroforézou

Polymorfismus, který byl detekován fragmentační analýzou, odpovídal výsledkům, které byly zjištěny pomocí pyrosekvenace. Na následujících obrázcích jsou uvedeny příklady výstupu kapilární elektroforézy, kde jednotlivé píky představují velikostně odlišné alely navrženého markeru.

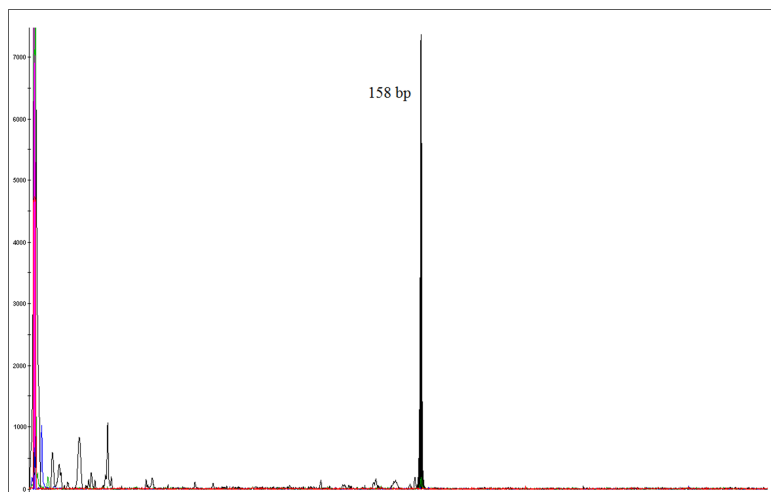
Obrázek 15: Výstup kapilární elektroforézy pro navržený marker delece 855-860 v exonu 1 genu *HOXA10* – alely 164/164



Obrázek 16: Výstup kapilární elektroforézy pro navržený marker delece 855-860 v exonu 1 genu *HOXA10* – alely 158/164



Obrázek 17: Výstup kapilární elektroforézy pro navržený marker delece 855-860 v exonu 1 genu *HOXA10* – 158/158



V následující tabulce 26 jsou uvedeny velikosti ampliconů u jedinců, kteří byli podrobeni genetické analýze pomocí pyrosekvenace. Ze psů uvedených v této tabulce vykazovali kryptorchismus pouze tři jedinci (BRT1-KR, P3-KR, P3-KR). Ostatní jedinci byli při pyrosekvenaci využiti pro studium kauzálních mutací dalších genů nesouvisejících s kryptorchismem. V případě mé diplomové práce tito jedinci sloužili jako negativní kontrola.

Tabulka 26: Zjištěné genotypy jedinců hodnocených pomocí pyrosekvenace vyjádřené velikostí ampliconů

Vzorek	Pohlaví	Genotyp
CSV1	fena	164/164
CSV2	fena	158/164
CSV3	fena	164/164
CSV4	fena	164/164
CSV6	pes	161/164
CSV10	pes	164/164
CSV11	pes	164/164
CSV12	pes	164/164
CSV13	pes	158/164
CSV14	pes	164/164
CSV15	pes	158/164
CSV16	pes	164/164
CSV17	pes	164/164
CSV18	pes	158/164
CSV20	fena	164/164
CSV21	pes	158/164
CSV23	pes	164/164
CSV24	fena	158/164
BRT1-KR	pes	164/164
LAB3	fena	164/164
P3-KR	pes	164/164
BOC4-KR	pes	158/158
Canis lupus lupus 168/I	pes	164/164
Canis lupus lupus 27/II	fena	158/164

Amplikon o velikosti 164 bp představuje sekvenci, která je shodná s referenční sekvencí, tzn. bez delece nukleotidů. Amplikon o velikosti 161 bp představuje deleci 3 bp ve srovnání s referenční sekvencí. Amplikon s velikostí 158 bp představuje deleci 6 bp ve srovnání s referenční sekvencí.

Z uvedené tabulky 26 vyplývá, že genotypizací 18 zástupců plemene československý vlčák bylo charakterizováno 6 jedinců (4 psi a 2 feny) s genotypem 158/164, jeden pes s genotypem 158/161 a 11 jedinců (8 psů a 3 feny) s nemutovaným genotypem 164/164. U kryptorchidních jedinců BRT1-KR a P3-KR byl rovněž zjištěn genotyp 164/164. U kryptorchidního jedince BOC4-KR byl však detekovány obě mutované alely 158/158.

Výše popsaná optimalizovaná metoda byla použita na další skupinu psů s výskytem kryptorchismu – viz následující tabulka.

Tabulka 27: Zjištěné genotypy a fenotypy kryptorchidních jedinců

Vzorek	Plemeno	Typ kryptorchismu	Kastrace	Genotyp
KR1	FXH	unilaterální	ano	158/164
KR2	BOC	unilaterální	ne	164/164
KR3	PAP	unilaterální	ano	158/164
KR4	SHI	unilaterální	ano (1 varle ponecháno)	164/164
KR5	BP	bilaterální	ne	158/158
KR6	PRT	unilaterální	ano (1 varle ponecháno)	158/164
KR7	ČSV	bilaterální	ano	158/164
KR8	SHE	bilaterální	ano	158/158
KR9	DV	bilaterální	ano	158/164
KR10	CP	unilaterální	ano	164/164
KR13	BOC	bilaterální	ne	164/164
KR14	AG	unilaterální	ne	158/164

V tabulce 27 je uvedeno dvanáct kryptorchidních zástupců jedenácti různých plemen psů. U sedmi jedinců byl diagnostikován unilaterální kryptorchismus a u pěti jedinců bilaterální kryptorchismus. Kromě fenotypu je u těchto psů uvedena i informace o tom, jestli byli nebo nebyli kastrováni. Z tabulky 27 vyplývá, že čtyři jedinci mají u studovaného polymorfismu genu *HOXA10* shodný genotyp 164/164 s referenční sekvencí. Nebyla u nich detekována delece v této oblasti genu. U šesti jedinců byla zjištěna heterozygotní alelická kombinace 158/164. U dvou jedinců byla detekována delece 6 bp v homozygotní sestavě s genotypem 158/158. Zároveň byla kromě výše zmíněných kryptorchidních jedinců analyzována i DNA dvou fen plemene chodský pes, u jejichž blízce příbuzných psů (ve vztahu bratr – sestra a matka – syn) byl diagnostikován kryptorchismus. U obou těchto fen byla zjištěna heterozygotní sestava 158/164.

Optimalizovaný metodický postup identifikace výše zmíněné delece byl aplikován rovněž na vzorek populace border teriérů o celkovém počtu 62 jedinců (28 psů a 34 fen), kde všichni jedinci bez ohledu na pohlaví vykazovali alelickou kombinaci 164/164, tzn. bez detekované delece.

Dále bylo stejným způsobem hodnoceno i 65 zástupců (35 psů a 30 fen) plemene border kolie a 68 zástupců (31 psů a 37 fen) plemene bearded kolie. U obou dvou plemen byla zjištěna u všech jedinců rovněž homozygotní kombinace alel 164/164, tudíž shodná s referenční sekvencí.

6 Diskuze

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na studium dědičné podstaty kryptorchismu u psů. Kryptorchismus patří mezi nejčastěji se vyskytující vrozené defekty, které se objevují i u člověka (Cox et al., 1978). Kryptorchismus není jednoduše mendelisticky dědičné onemocnění. Jeho příčina je multifaktorová a zahrnuje genetické i negenetické pozadí jedince (Cox et al., 1978, Cassata et al., 2008, Zhao et al., 2010). Pomocí komparativní genomiky a studia kandidátních genů bylo zjištěno, že pes je vhodným animálním modelem pro výzkum genetické podstaty kryptorchismu (Khanna et al., 2006). Proto jsem si pro svůj výzkum vybrala kandidátní geny, které se vyskytují jak v genomu psa, tak i v genomu člověka. Výběr genů jsem provedla na základě studia vědecké literatury.

Ráda bych poznamenala, že s rozvojem a dostupností nových molekulárních technik v oblasti genetiky se počet kandidátních genů pro kryptorchismus u různých živočichů stále mění, stejně jako informace o nich publikované. Například Cannistraci et al. (2013) uvádějí ve své publikaci výčet 35 kandidátních genů pro kryptorchismus. Na základě svého výzkumu vytvořili Cannistraci et al. (2013) internetovou databázi kandidátních genů pro kryptorchismus (http://www.integratomics-time.com/cryptorchidism/candidate_genes), do které mohou vědecké týmy vkládat informace o nových kandidátních genech. V uvedené databázi je kromě symbolu a názvu genu uvedena i citace odkazující na příslušnou studii daného genu, stručná charakteristika experimentu, výpis živočichů, u kterých byl gen v souvislosti s kryptorchismem analyzován, a jeho případná lokalizace v genomu člověka. Zmíněná databáze nyní obsahuje již 197 popsaných kandidátních genů pro kryptorchismus u člověka a různých druhů zvířat.

Mnou studované kandidátní geny *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1* byly doposud u psů studovány pouze na základě klasické Sangerovy sekvenační metody. Analýzou těchto genů pomocí pyrosekvenace jsem získala velké množství dat o exonových i intronových sekvencích genů. Tyto informace mohou být dále využity nejen při studiu uvedených genů u psů, ale i ke srovnávacím analýzám těchto genů u člověka a dalších živočichů.

6.1 Příprava vzorků pro pyrosekvenaci

Vysokomolekulární DNA bez přítomnosti kontaminujících látek je nezbytným předpokladem pro úspěšnou aplikaci různých genetických markerů. Hodnocení kvality a kvantity izolované DNA nebylo cílem diplomové práce, přesto jsem tyto parametry sledovala. Standardními molekulárními technikami jsem ověřila, že extrahovaná genomická DNA je vysokomolekulární a bez náznaků fragmentace.

Pomocí gelové elektroforézy jsem rovněž ověřila, že navržené dvojice primerů pro long-range PCR spolehlivě umožnily amplifikaci dlouhých fragmentů a byly získány produkty požadované velikosti u všech studovaných genů.

6.2 Pyrosekvenace

Pomocí pyrosekvenace byly analyzovány sekvence celkem šesti genů (*HOXA10*, *INSL3*, *INHA*, *TIMPI*, *SOD1*, *DNMI*). Nezbytným předpokladem pro jejich úspěšnou pyrosekvenaci bylo zvolení vhodné strategie pro přípravu DNA knihovny. Ta musela být sestavena s ohledem na kapacitu pyrosekvenátoru GS Junior System a zároveň měla umožnit větší počet čtení každého nukleotidu z důvodu minimalizace chybných výsledků z důvodu náhodných chyb vzniklých při sekvenování. Sekvenováno bylo šest genů u 24 jedinců, u kterých bylo detekováno celkem 2276 různých mutací. Jelikož je v tabulkovém výstupu výsledků programu GS Reference Mapper (Roche) uváděn i celkový počet čtení každého polymorfismu, bylo možné vypočítat průměrný počet čtení (neboli pokrytí z angl. coverage). Průměrný počet čtení činil 54.

V tabulkovém výstupu výsledků sekvenování je rovněž informace o frekvenci výskytu dané mutace. Vzhledem k množství detekovaných mutací a z důvodu minimalizace případných nesprávných závěrů na základě získaných výsledků byla data na základě těchto údajů filtrována. Pyrosekvenace neumožňuje rozlišit homozygotní a heterozygotní alelickou sestavu. Lze však předpokládat, že při frekvenci blížíci se 100 % byl jedinec z hlediska této mutace homozygotní, při frekvenci okolo 50 % heterozygotní. K dalším analýzám byly vybrány pouze mutace, které byly zjištěny s frekvencí výskytu větší než 10 %. Hraniční hodnota 10 % byla zvolena z důvodu možných nesespecifických chyb, o kterých se zmiňují v metodickém postupu diplomové práce.

Na základě výše popsaných údajů z pyrosekvenování mohu konstatovat, že strategie tvorby knihovny byla úspěšná a umožnila získat výsledky, které s největší pravděpodobností odpovídají skutečné sekvenci nukleotidů u studovaných jedinců.

6.3 Detekované polymorfismy studovaných genů pomocí pyrosekvenace

Cílem diplomové práce bylo studium kandidátních genů pro kryptorchismus. Po odfiltrování dat dle výše popsaného postupu bylo na základě pyrosekvenace 24 jedinců charakterizováno celkem 834 mutací oproti referenční sekvenci v kódujících i nekódujících úsecích studovaných genů. Konkrétně bylo detekováno celkem 113 mutací v genu *HOXA10*, 306 mutací v genu *INSL3*, 346 mutací v genu *INHA*, a 69 mutací v genu *TIMP1*. V sekvencích zralé mRNA bylo zjištěno 84 mutací genu *HOXA10*, 218 mutací genu *INSL3*, 34 mutací genu *INHA*, a pouze 3 mutace v genu *TIMP1*.

Z důvodu neočekávaného velkého množství detekovaných polymorfních míst v kódujících úsecích kandidátních genů jsem se dále věnovala jen sledováním těchto mutací. Získané informace o nekódujících sekvencích však mohou být využity k dalším analýzám, ať už ve vztahu k výskytu kryptorchismu u psů či z hlediska jejich různých jiných funkcí. Jak vyplývá z literárního přehledu, jedná se o geny, které mají v organismu široké spektrum působnosti (Burger a Igarashi, 1988, Scott, 1993, Anderson a Brown, 2002, Truong et al., 2003).

6.4 Polymorfismy v exonových a UTR sekvencích genů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA*, *TIMP1*

Z hlediska výskytu detekovaných sekvenčních rozdílů v exonech studovaných genů vykazoval největší variabilitu gen *HOXA10*, v jehož exonech bylo pomocí pyrosekvenace odhaleno celkově 84 mutací u 24 sekvenovaných psů. V exonech genu *INSL3* bylo zjištěno celkem 31 mutací, genu *INHA* 34 mutací a v exonech genu *TIMP1* pouze 3 mutace.

U studovaných genů jsem vzhledem k jejich funkcím očekávala menší výskyt mutací. Zejména u genu *HOXA10*, který je klíčový pro ontogenetický vývoj jedince (Scott, 1993), jsem takovou variabilitu v exonových sekvencích nepředpokládala. Proto jsem se v další části výzkumu zaměřila právě na detekované mutace v exonu genu *HOXA10*.

Sekvence zralé mRNA genů mohou kromě exonů obsahovat i tzv. UTR oblasti (z angl. untranslated region). Sekvence 5-UTR a 3-UTR oblastí představují nepřekládané

oblasti, které se nacházejí na 5'konci a 3'konci mRNA. UTR sekvence však mají regulační funkci a ovlivňují stabilitu celé molekuly. Mutace v těchto oblastech mohou ovlivňovat expresi genu. O mutacích v regulačních UTR oblastech genů se diskutuje v souvislosti s možnými poruchami buněčných procesů včetně ontogenetického vývoje jedince nebo nádorového bujení (Chatterjee a Pal, 2009). Jak je uvedeno v mezinárodní nukleotidové databázi Ensembl, v genu *HOXA10* se UTR sekvence vůbec nenacházejí, gen *INHA* má pouze 3-UTR a geny *INSL3* a *TIMP1* 5-UTR i 3-UTR oblasti. U genů *INHA* a *TIMP1* nebyla detekována žádná mutace v těchto regulačních sekvencích. Naproti tomu u genu *INSL3*, kde jsou UTR sekvence mnohonásobně delší než samotné exony, bylo detekováno celkem 218 mutací v 5-UTR a 3-UTR oblastech. Takový počet mutací svědčí o velké variabilitě regulačních oblastí genu. Získané výsledky mohou být základem pro podrobnější studie těchto úseků genu *INSL3*.

6.5 Polymorfismy v aminokyselinách kódovaných jednotlivými haplotypy studovaných genů

U mutací detekovaných v exonech kandidátních genů jsem se zaměřila na jejich vliv z hlediska změny aminokyselinového složení řetězce. U všech jedinců hodnocených pomocí pyrosekvenace byla na základě získaných výsledků sestavena sekvence exonových částí studovaných kandidátních genů. Protože pyrosekvenace neumožňuje stanovení alelické kombinace, byli tito jedinci z hlediska detekované dané mutace považováni za homozygotní bez ohledu na frekvenci jejího výskytu. Cílem diplomové práce bylo získání detailních informací o vybraných kandidátních genech pro kryptorchismus. Pomocí pyrosekvenace bylo získáno velké množství dat, na základě kterých mohlo být rozhodnuto o dalších podrobnějších studiích. Z tohoto důvodu bylo možné sestavit sekvence DNA bez ohledu na sestavu alel, která se v polymorfních místech skutečně vyskytuje. Jsem si však vědoma toho, že při podrobnějších genetických analýzách či detekování konkrétního mutačního místa s ohledem na fenotyp jedince je četnost výskytu velmi důležitou informací. Jak uvádějí Huse et al. (2007), možnost stanovení mutací s frekvencí výskytu menší než 10% je jednou z hlavních výhod pyrosekvenace. Zejména v klinické genetice je tento údaj klíčový pro stanovení správné diagnózy.

Sestavené sekvence nukleotidů jednotlivých zvířat byly přeloženy do aminokyselinového řetězce a porovnány pomocí programu BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999). Ze získaných výsledků vyplývá, že většina detekovaných mutací v nukleotidovém řetězci

neměla vliv na sestavu aminokyselin v daném genu. Záměna aminokyselin v důsledku mutace může mít velký vliv na syntézu výsledného proteinu (Snustad a Simmons, 2009). Sekvence aminokyselin byly porovnány z hlediska haplotypů, které se u jednotlivých proteinů vyskytovaly.

U genů *INSL3*, *INHA* a *TIMP1* byly zjištěny vždy 3 různé haplotypy. Jak vyplývá z obrázků 5, 6 a 7, detekované mutace znamenaly záměnu jedné či dvou aminokyselin. Ani jedna z těchto změn proteinového řetězce nebyla popsána v žádné mnou studované vědecké literatuře. Naproti tomu záměna 22. aminokyseliny v genu *INSL3*, kterou ve své studii charakterizovali u bilaterálně kryptorchidního jedince Cassata et al. (2008), nebyla nalezena u žádného z pyrosekvenových jedinců. Cassata et al. (2008) popisují záměnu aminokyseliny alanin za aminokyselinu valin v důsledku záměny jedné báze. Mnou získané výsledky pyrosekvenace genu *INSL3* u 24 jedinců, mezi kterými byli i jeden bilaterálně a dva unilaterálně kryptorchidní jedinci, však ukázaly, že všichni analyzovaní jedinci měli v pozici 22. aminokyseliny alanin, tzn. nemutovaný triplet nukleotidů.

Gen *HOXA10* vykazoval z hlediska proteinových sekvencí největší variabilitu. Jak vyplývá z obrázku 4, na základě výsledků pyrosekvenace jsem popsala celkem 10 různých haplotypů. Z obrázku 4 rovněž vyplývá, že kromě záměn jedné či více aminokyselin došlo i ke změně počtu aminokyselin ve výsledném proteinovém řetězci v důsledku delecí celých tripletů. Jako nejvíce variabilní se jevila oblast okolo 855-860. nukleotidu delece šesti nukleotidů, která v produktu translace odpovídá ztrátě dvou aminokyselin.

V uvedeném úseku v pozicích 283. – 290. aminokyseliny je dle referenční sekvence (B8PZS7_CANFA ENSCAFG00000002963) sled 8 glycinů. Richards a Sutherland (1997) popisují, že opakující se počet aminokyselin v proteinovém řetězci může poukazovat na příčinu některých onemocnění u lidí. Právě počet aminokyselin v dané sekvenci může být i diagnostickým markerem. Z tohoto důvodu, i z hlediska četnosti výskytu a velikosti této mutace u pyrosekvenovaných zvířat, jsem se ve své diplomové práci dále zaměřila na navržení molekulárního markeru, který by byl schopen identifikovat tento polymorfismus v různých populacích psů.

6.6 Kladogramy vyjadřující podobnosti haplotypů studovaných genů

Pomocí programu MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) byly sestaveny kladogramy ukazující sekvenční podobnost jednotlivých haplotypů. Konstrukce fylogenetických stromů umožňuje znázornění evolučního vývoje sekvencí studovaných genů. Na základě analýzy evolučních změn v sekvencích genů různých organismů lze lépe odhadnout možný vývoj života na zemi a lépe pochopit některé biologické procesy (Snustad a Simmons, 2009). K hodnocení všech haplotypů byla využita metoda maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood). Tato metoda umožňuje ve vybraném evolučním modelu s určitou pravděpodobností stanovit, které evoluční větve mohly dát vzniknout ostatním. V případě mé diplomové práce lze na základě této metody odhadnout, které haplotypy studovaných kandidátních genů pro kryptorchismus jsou evolučně starší a které haplotypy z těchto vychází.

Z tabulky 17 je patrné, že ne všechny sekvence bylo možné hodnotit pomocí výše popsané statistické metody. Z kladogramů uvedených ve výsledkové části práce je rovněž možné vyčíst, že získané sekvence jsou z hlediska evolučního vývoje velmi konzervativní. Domnívám se, že je tomu tak z následujících důvodů. Haplotypy získané na základě pyrosekvenace představují sekvence 22 psů domácích (*Canis lupus familiaris* L.) pěti různých plemen a 2 vlků obecných eurasijských (*Canis lupus lupus*). Jak uvádějí Larson et al. (2012), jedná se úzce příbuzné druhy zvířat, vlk obecný (*Canis lupus*) je přímým předkem psa domácího (*Canis lupus familiaris* L.). I přesto jsem však z výsledků své práce vyčetla, že u obou dvou hodnocených vlků bylo detekováno větší množství mutací a rozdílných haplotypů oproti referenční sekvenci než u testovaných psů. Jelikož referenční sekvence představovaly sekvence genů psa domácího (*Canis lupus familiaris* L.), zjištěné rozdíly mohou poukazovat na evoluční změny genů v důsledku domestikace.

Dalším důvodem pro velkou konzervativnost haplotypů je dle mého názoru jejich porovnání pouze na základě kódujících úseků genů. Změny v kódujících sekvencích genů mohou mít rozsáhlé důsledky na složení výsledného proteinu a jeho funkci. Jak vyplývá z literárního přehledu diplomové práce, mnou studované kandidátní geny pro kryptorchismus se podílejí na mnoha biologických procesech v organismu různých živočichů (Burger a Igarashi, 1988, Scott, 1993, Anderson a Brown, 2002, Truong et al., 2003). Domnívám se, že široké spektrum působnosti výsledných proteinů genů a jejich výskyt u mnoha různých druhů zvířat je dalším důvodem poměrně malé evoluční rozmanitosti v analyzovaných úsecích mezi testovanými jedinci.

Členitost získaných evolučních stromů u jednotlivých genů jsem také porovnávala s množstvím detekovaných polymorfismů v daných sekvencích. Zjistila jsem, že počet větví fylogenetického stromu roste přímo úměrně s počtem mutací v daném úseku. Stejně tak vyšlo i porovnání vztahu členitosti stromu a délky sekvence. Nejrozmanitější evoluční strom je patrný u exonů genu *HOXA10* (20 různých haplotypů) a 3-UTR oblasti genu *INSL3* (21 různých haplotypů).

Cílem diplomové práce nebylo studium evoluční příbuznosti analyzovaných jedinců, přesto si myslím, že statistické zpracování výsledných haplotypů pomocí programu MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) poukázalo na možný fylogenetický vývoj sekvencí studovaných genů.

6.7 Variabilita navrženého markeru delece 855–860 v exonu 1 genu *HOXA10*

Z důvodů popsaných již v předchozím textu diplomové práce jsem si pro další analýzy vybrala variabilní úsek v oblasti 855-866. nukleotidu genu *HOXA10*. V kapitole 6.5 této práce jsem již popsala možný důsledek dané delece. Vzhledem k četnosti výskytu a velikosti této mutace jsem se rozhodla navrhnout genetický marker, který by snadno odhalil délkový polymorfismus v tomto úseku genu *HOXA10* a byl aplikovatelný na různé populace psů.

Nejprve jsem pomocí klasické Sangerovy metody sekvenování ověřila správnost údajů získaných pyrosekvenací. Po navržení dvojice primerů pro resekvenaci jsem zjistila, že v ampliconu vymezeném navrženými primery je velká koncentrace G + C párů bází. Z tohoto důvodu jsem pro amplifikaci zvolila postup, který ze stejného důvodu použili u studia dopaminového receptoru *DRD4* Niimi et al. (2001) a Ito et al. (2004). Zvolený postup vedl k úspěšné amplifikaci požadovaného fragmentu a vzorky byly resekvenovány pomocí kapilární elektroforézy. Vyhodnocení sekvencí potvrdilo, že mutace detekované pomocí pyrosekvenace se shodují s výsledky resekvenace této oblasti u všech testovaných jedinců. Pro charakteristiku délkového polymorfismu v oblasti 855-866. nukleotidu genu *HOXA10* pomocí kapilární elektroforézy byla úspěšně navržena další dvojice primerů, díky které bylo sekvenováním možno detekovat tři různé genotypy v mutačním místě, odpovídající velikostem ampliconů o délce 164 bp, 161 bp a 158 bp.

Uvedený optimalizovaný metodický postup byl aplikován na soubor 24 pyrosekvenovaných jedinců, soubor 12 kryptorchidních jedinců, populaci 62 border teriérů, 65 border kolií a 68 bearded kolií. Z výsledkové části diplomové práce vyplývá, že

všichni zástupci testovaného vzorku populací plemen border teriér, border kolie a bearded kolie byli bez ohledu na pohlaví z hlediska této mutace homozygotní bez delece 6 bp. Výsledek genotypizace napovídá tomu, že na výskyt delece 855-860 v exonu 1 genu *HOXA10* má vliv plemenná příslušnost jedince. Tuto domněnku potvrzuje i výsledek charakteristiky pyrosekvenovaných psů plemene československý vlčák, kde bylo ve vzorku pouhých 18 zástupců detekováno 7 jedinců s mutovanou alelou v místě studované delece. Na základě zjištěných údajů se domnívám, že plemeno československý vlčák je náchylnější k výskytu delečního polymorfismu v pozici 855-860. nukleotidu v exonu 1 genu *HOXA10*.

Z tabulky 27 ve výsledkové části práce vyplývá, že v souboru kryptorchidních jedinců je patrný výskyt délkového polymorfismu v místě studované delece. Jsem si však vědoma toho, že pro přesnější charakterizaci a případné potvrzení souvislosti této mutace s výskytem kryptorchismu u psů by bylo nutné testovat větší počet jedinců se zmíněným fenotypovým projevem. Hodnocený počet zvířat byl závislý na ochotě chovatelů psů poskytnout vzorek DNA ke genetickým analýzám. Dle dostupné vědecké literatury však nebyl výskyt této mutace u kryptorchidních psů doposud popsán. Jak uvádějí Kolon et al. (1999) a Bertini et al. (2004), pro určení genetické podstaty kryptorchismu je třeba rozsáhlých studií tohoto i dalších genů. Myslím, že získané výsledky mohou sloužit jako materiál pro další studium této problematiky.

Určení jednoznačné příčiny kryptorchismu není v současnosti u psů ani u lidí možné. Kryptorchismus je komplexní vada zapříčiněná vzájemným působením genetických a epigenetických faktorů a vlivem vnějšího prostředí (Cox et al., 1978; Rothschild et al., 1988; Amann a Veermachaneni, 2007; Foresta et al., 2008). Z důvodu vysoké frekvence výskytu tohoto vrozeného defektu u různých živočišných druhů včetně člověka pracuje mnoho vědeckých týmů na genetických analýzách možných kandidátních genů pro kryptorchismus. Mezi tyto výzkumy lze zařadit i tuto diplomovou práci, která přináší originální výsledky charakteristiky genů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1* u psů.

7 Závěr

Výsledky uvedené v této diplomové práci představují pilotní experimenty s pyrosekvenací eukaryotních genů na Katedře genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze. Získané výsledky je možné stručně shrnout do následujících bodů:

- Podařilo se oslovit některé majitele psů s diagnostikovaným kryptorchismem, aby se zapojili do molekulárně - genetického výzkumu genetických predispozic k tomuto onemocnění
- Byly navrženy takové primerové páry, pomocí kterých se podařilo úspěšně amplifikovat celé sekvence genů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1*. Tato vědecká hypotéza byla potvrzena tím, že získané amplikony měly předpokládanou velikost a současně výsledky sekvenace potvrdily specifitu amplifikovaných fragmentů. Optimalizovaný metodický postup pyrosekvenace umožnil současné stanovení sekvencí různých genů u většího počtu jedinců. Metoda označování sekvenovaných amplikonů pomocí MIDů umožnila odhalit sekvenční variabilitu analyzovaných psů.
- Výsledky pyrosekvenace potvrdily hypotézu o variabilitě vzniklé na základě mutací typu substituce, inserce a delece, které se nacházejí v kódujících částech genů. Pomocí pyrosekvenace byly zjištěny rozdíly ve výskytu mutací u studovaných genů. Nejvyšší frekvence mutací byla zjištěna v exonových částech genu *HOXA10*. Naopak nejméně polymorfní byl gen *TIMP1*.
- Metodou maximální věrohodnosti byly konstruovány kladogramy, které charakterizovaly sekvenční podobnosti nalezených haplotypů. Největší sekvenční variabilita byla zjištěna v 3-UTR oblasti genu *INSL3*. Tato vysoká variabilita bude zřejmě způsobena tím, že UTR oblasti nepředstavují kódující sekvence, a současně se jednalo o nejdelší sekvenovaný úsek.
- Největší variabilita kódujících sekvencí byla nalezena v exonové části genu *HOXA10*, a proto bylo provedeno navržení specifického PCR markeru pro detekci 6 resp. 3 bp delece v pozici 855.

- Výskyt delece v exonové části genu *HOXA10* byl potvrzen resekvenací. Navržený PCR marker měl charakter kodominantního markeru, který odhalil tři alely z hlediska přítomnosti nebo nepřítomnosti a velikosti delece. Navržený PCR marker umožnil pomocí kapilární elektroforézy charakterizovat variabilitu u kryptorchidních a zdravých psů.
- Výše uvedený marker vykazoval značnou plemennou specifičnost, u zdravých zástupců plemen border teriér, border kolie a bearded kolie byla detekována pouze homozygotní sestava alel bez 6 bp delece. Heterozygotní kombinace 6 bp deletované alely a původní nemutované alely byla naopak zjištěna u části populace československých vlčáků, kteří kryptorchismem netrpěli.
- Skupina genotypů psů s klinickými příznaky kryptorchismu byla charakteristická vyšším výskytem alely s delecí 6 bp. U této skupiny psů byli zjištěni jedinci s bilaterálním kryptorchismem, kteří byli z hlediska 6 bp delece homozygotní.
- Výsledky vyplývající z hodnocení kryptorchidních a zdravých psů navrženým markerem jednoznačně nepotvrdily, že 6 bp delece, která na úrovni produktu translace způsobuje ztrátu dvou molekul glycinu, představuje kauzální mutaci způsobující kryptorchismus.

Doporučení využití získaných výsledků v dalším výzkumu genomu psa:

Vzhledem k tomu, že poslední hypotéza nebyla jednoznačně potvrzena, je možné doporučit, aby informace týkající se variability exonových částí genů *HOXA10*, *INSL3*, *INHA* a *TIMP1* byly nadále studovány, a to zejména v souvislosti s fenotypovým hodnocením většího množství psů s příznaky kryptorchismu.

8 Seznam použité literatury

- Amann, R. P., Veeramachaneni, D. N. R. 2007. Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction*. 133 (3). 541 – 561.
- Anand-Ivell, R., Ivell, R. 2014. Insulin-like factor 3 as a monitor of endocrine disruption. *Reproduction*. 147 (4). 87 – 95.
- Anderson, C. L., Brown, C. J., 2002. Variability of X chromosome inactivation: effect on levels of *TIMPI* RNA and role of DNA methylation. *Human Genetics*. 110 (3), 271 – 278.
- Baumans, V., Dijkstra, G., Wensing, C. J. 1983. The role of a non-androgenic testicular factor in the process of testicular descent in the dog. *International Journal of Andrology*. 6 (6). 541 – 552.
- Bertini, V., Bertelloni, S., Valetto, A., Lala, R., Foresta, C., Simi, P. 2004. Homeobox *HOXA10* gene analysis in cryptorchidism. *Journal of pediatric endocrinology and metabolism*. 17 (1). 41 – 45.
- Burger, H. G., Igarashi, M. 1988. Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. *Endocrinology*. 122 (4), 1701 – 1702.
- Cannistraci, C. V., Ogorevc, J., Zorc, M., Ravasi, T., Dovc, P., Kunej, T. 2013. Pivotal role of the muscle-contraction pathway in cryptorchidism and evidence for genomic connections with cardiomyopathy pathways in RASopathies. *BMC Medical Genomics*. 6 (5).
- Cassata, R., Iannuzzi, A., Parma, P., De Lorenzi, L., Peretti, V., Perucatti, A., Iannuzzi, L., Di Meo, G. P. 2008. Clinical, cytogenetic and molecular evaluation in a dog with bilateral cryptorchidism and hypospadias. *Cytogenetic and Genome Research*, 120 (1–2), 140 – 143.

- Cox, V. S., Wallace, L. J., Jessen, C. R. 1978. An anatomic and genetic study of canine cryptorchidism. *Teratology*. 18 (2). 233 – 240.
- Dostál, J. 2007. *Genetika a šlechtění plemen psů*. DONA s. r. o. České Budějovice. 261 s. ISBN: 8073221047.
- Emmen, J. M., McLuskey, A., Adham, I. M., Engel, W., Grootegoed, J. A., Brinkmann, A. O. 2000. Hormonal control of gubernaculum development during testis descent: gubernaculum outgrowth in vitro requires both insulin-like factor and androgen. *Endocrinology*. 141 (12). 4720 – 4727.
- Ferlin, A., Simonato, M., Bartoloni, L., Rizzo, G., Bettella, A., Dottorini, T., Dallapiccola, B., Foresta, C. 2003. The *INSL3-LGR8/GREAT* ligand-receptor pair in human cryptorchidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88 (9). 4273 – 4279
- Foresta, C., Zuccarello, D., Garolla, A., Ferlin, A. 2008. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocrine Reviews*. 29 (5). 560 – 580.
- Gehring, W. J., Hiromi, Y. 1986. Homeotic Genes and the Homeobox. *Annual Review of Genetics*. 20. 147 – 73.
- Gharizadeh, B., Norberg, E., Löffler, J., Jalal, S., Tollemar, J., Einsele, H., Klingspor, L., Nyrén, P. 2004. Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. *Mycoses*. 47 (1–2), 29 – 33
- 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.
- Heyns, C. F. 1987. The gubernaculum during testicular descent in the human fetus. *Journal of Anatomy*. 153. 93 – 112.

- Holland, P. W. 2013. Evolution of homeobox genes. *Wiley Interdisciplinary Review: Developmental Biology*. 2 (1). 31 – 45.
- Huse, S. M., Huber, J. A., Morrison, H. G., Sogin, M. L., Welch, D. M. 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology*. 8 (7). 143.
- Hutson, J. M., Hasthorpe, S., Heyns, C. F. 1997. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocrine Reviews*. 18 (2). 259 – 280.
- Chatterjee, S., Pal, J. K. 2009. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biology of the Cell*. 101 (5). 251 – 262.
- Chowdhury, F., Chowdhury, A. 2012. Pyrosequencing – An alternative to traditional Sanger sequencing. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 8 (1), 14 – 20
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. 431 (7011). 931 – 945.
- 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). 815 – 820.
- Jarvie, T. 2005. Next generation sequencing technologies. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2 (3). 255 – 260.
- Jukes, T. H., Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. Academic Press. New York. 21 – 132.
- Kawakami, E., Tsutsui, T., Yamada, Y., Yamauchi, M. 1984. Cryptorchidism in the dog: Occurrence of cryptorchidism and semen quality in the cryptorchid dog. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 46 (3). 303 – 308.

- Kawamura, K., Kumagai, J., Sudo, S., Chun, S. Y., Pisarska, M., Morita, H., Toppari, J., Fu, P., Wade, J. D., Bathgate, R. A., Hsueh, A. J. 2004. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (19). 7323 – 7328.
- Kaye, J., Boddington, P., de Vries, J., Hawkins, N. and Melham, K. 2010. Ethical implications of the use of whole genome methods in medical research. *European Journal of Human Genetics*. 18 (4). 398 – 403.
- Khanna, C., Lindblad-Toh, K., Vail, D., London, C., Bergman, P., Barber, L., Breen, M., Kitchell, B., McNeil, E., Modiano, J. F., Niemi, S., Comstock, K. E., Ostrander, E., Westmoreland, S., Withrow, S. 2006. The dog as a cancer model. *Nature Biotechnology*. 24 (9). 1065 – 1066.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16 (2). 111 – 120.
- King, R. C., Stansfield, W. D., Mulligan, P. K. 2006. *A dictionary of genetics*. Oxford University Press. New York. 596 s. ISBN: 100195307623
- Kircher, M., Kelso, J. 2010. High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *Bioessays*. 32 (6). 524 – 536.
- Klonisch, T., Fowler, P. A., Hombach-Klonisch, S. 2004. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Developmental Biology*. 270 (1). 1 – 18.
- Kolon, T. F., Wiener, J. S., Lewitton, M., Roth, D. R., Gonzales, E. T., Lamb, D. J. 1999. Analysis of homeobox gene *HOXA10* mutations in cryptorchidism. *The Journal of Urology*. 161 (1). 275 – 280.

Larson, G., Karlsson, E. K., Perri, A., Webster, M. T., Ho, S. Y., Peters, J., Stahl, P. W., Piper, P. J., Langaas, F., Fredholm, M., Comstock, K. E., Modiano, J. F., Schelling, C., Agoulnik, A. I., Leegwater, P. A., Dobney, K., Vigne, J. D., Vilà C., Andersson, L., Lindblad-Toh, K. 2012. Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (23). 8878 – 8883.

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. 3rd., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., De Jong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C. W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., De Caprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K. P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C., Baldwin, J., Abebe, A., Abouelleil, A., Aftuck, L., Ait-Zahra, M., Aldredge, T., Allen, N., An, P., Anderson, S., Antoine, C., Arachchi, H., Aslam, A., Ayotte, L., Bachantsang, P., Barry, A., Bayul, T., Benamara, M., Berlin, A., Bessette, D., Blitshteyn, B., Bloom, T., Blye, J., Boguslavskiy, L., Bonnet, C., Boukhgalter, B., Brown, A., Cahill, P., Calixte, N., Camarata, J., Cheshatsang, Y., Chu, J., Citroen, M., Collymore, A., Cooke, P., Dawoe, T., Daza, R., Decktor, K., De Gray, S., Dhargay, N., Dooley, K., Dooley, K., Dorje, P., Dorjee, K., Dorris, L., Duffey, N., Dupes, A., Egbiremolen, O., Elong, R., Falk, J., Farina, A., Faro, S., Ferguson, D., Ferreira, P., Fisher, S., FitzGerald, M., Foley, K., Foley, C., Franke, A., Friedrich, D., Gage, D., Garber, M., Gearin, G., Giannoukos, G., Goode, T., Goyette, A., Graham, J., Grandbois, E., Gyaltzen, K., Hafez, N., Hagopian, D., Hagos, B., Hall, J., Healy, C., Hegarty, R., Honan, T., Horn, A., Houde, N., Hughes, L., Hunnicutt, L., Husby, M., Jester, B., Jones, C., Kamat, A., Kanga, B., Kells, C., Khazanovich, D., Kieu, A. C., Kisner, P., Kumar, M., Lance, K., Landers, T., Lara, M., Lee, W., Leger, J. P., Lennon, N., Leuper, L., Le Vine, S., Liu, J., Liu, X., Lokyitsang, Y., Lokyitsang, T., Lui, A., Macdonald, J., Major, J., Marabella, R., Maru, K., Matthews, C., McDonough, S., Mehta, T., Meldrim, J., Melnikov, A., Meneus, L., Mihalev, A., Mihova, T., Miller, K., Mittelman, R., Mlenga, V., Mulrain, L., Munson, G., Navidi, A., Naylor, J., Nguyen, T., Nguyen, N., Nguyen, C., Nguyen, T., Nicol, R., Norbu, N., Norbu, C., Novod, N., Nyima, T., Olandt, P., O'Neill, B., O'Neill, K., Osman, S., Oyono, L., Patti, C., Perrin, D., Phunkhang, P., Pierre, F., Priest, M.,

- Rachupka, A., Raghuraman, S., Rameau, R., Ray, V., Raymond, C., Rege, F., Rise, C., Rogers, J., Rogov, P., Sahalie, J., Settipalli, S., Sharpe, T., Shea, T., Sheehan, M., Sherpa, N., Shi, J., Shih, D., Sloan, J., Smith, C., Sparrow, T., Stalker, J., Stange-Thomann, N., Stavropoulos, S., Stone, C., Stone, S., Sykes, S., Tchuinga, P., Tenzing, P., Tesfaye, S., Thoulutsang, D., Thoulutsang, Y., Topham, K., Topping, I., Tsamla, T., Vassiliev, H., Venkataraman, V., Vo, A., Wangchuk, T., Wangdi, T., Weiland, M., Wilkinson, J., Wilson, A., Yadav, S., Yang, S., Yang, X., Young, G., Yu, Q., Zainoun, J., Zembek, L., Zimmer, A., Lander, E. S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438 (7069). 803 – 819.
- Mahood, K. I., McKinnell, C., Walker, M., Hallmark, N., Scott, H., Fisher, J. S., Rivas, A., Hartung, S., Ivell, R., Mason, J. I., Sharpe, R. M. 2006. Cellular origins of testicular dysgenesis in rats exposed in utero to di (n-butyl) phthalate. *International Journal of Andrology*. 29 (1). 148 – 154.
- Mardis, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. 2008. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 9. 387 – 402.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Yi-Ju, Ch., Zhoutao, Ch., Dewell, S. B., Lei, D., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Goodwin, B. C., Wen, H., Helgesen, S., Chun, H. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L. I., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Jong-Bum, K., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Ming, L., Jing, L., Lohman, K. L., Hong, L., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Yong, W., Weiner, M. P., Pengguang, Y., Begley, R. F. and Rothberg, J. M. 2005. Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature*. 437 (7057). 376 – 380.
- Marino, G., Zanghì, A. 2013. Activins and inhibins: expression and role in normal and pathological canine reproductive organs: a review. *Anatomia, histologia, embryologia*. 42 (1). 1 – 8.

- McGinn, S., Gut, I. G. 2013. DNA sequencing – spanning the generations. *New Biotechnology*. 30 (4). 366 – 372.
- Miller, N. A., Van Lue, S., J., Rawlings, C., A. 2004. Use of laparoscopic-assisted cryptorchidectomy in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 224 (6). 875 – 878.
- Nef, S, Parada, L. F. 1999. Cryptorchidism in mice mutant for *INSL3*. *Nature Genetics*. 22 (3), 295 – 299
- Nei, M., Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York. 352 s. ISBN: 0195135849
- 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.
- Pospíšilová, Š., Tichý, B., Mayer, J. 2009. Sekvenování lidského genomu – Technologie nové generace aneb budeme rutinně sekvenovat lidské genomy?. *Časopis lékařů českých*. 148. 296 – 302.
- Pritchard, D. J., Korf, B. R. 2007. *Základy lékařské genetiky*. Galén. Praha. 182 s. ISBN: 9788072624492.
- Purdue, M. P., Graubard, B. I., Chanock, S. J., Rubertone, M. V., Erickson, R. L., McGlynn, K. A. 2008. Genetic variation in the inhibin pathway and risk of testicular germ cell tumors. *Cancer Research*. 68 (8). 3043 – 3048
- Richards, R. I.; Sutherland, G. R. 1997. Dynamic mutation: Possible mechanisms and significance in human disease. *Trends in Biochemical Sciences*. 22 (11). 432 – 436.
- Roche. 2012a. *emPCR Amplification Method Manual – Lib-L. GS Junior Titanium Series*. 454 Life Sciences Corporation. (7). 0312.

- Roche. 2012b. Rapid Library Preparation Method Manual. GS Junior Titanium Series. 454 Life Sciences Corporation. (5). 0312.
- Roche. 2012c. Sequencing Method Manual. GS Junior Titanium Series. 454 Life Sciences Corporation. (6). 0312.
- Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyren, P. 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 281 (5375). 363 – 365
- Rothschild, M. F., Christian, L. L., Blanchard, W. 1988. Evidence for multigene control of cryptorchidism in swine. *Journal of Heredity*. 79 (4). 313 – 314.
- Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*. 132. 365 – 386.
- Scott, M. P. 1993. A rational nomenclature for vertebrate homeobox (HOX) genes. *Nucleic Acids Research*. 21 (8). 1687 – 1688.
- Shenker, N. S., Huynh, J., Farmer, P. J., Hutson, J. M. 2006. A new role for androgen in testicular descent: permitting gubernacular cell proliferation in response to the neuropeptide, calcitonin gene-related peptide. *Journal of Pediatric Surgery*. 41 (2). 407 – 412.
- Schwarz, R., Dayhoff, M. 1979. Matrices for detecting distant relationships. *Atlas of protein sequences*. National Biomedical Research Foundation. 353 – 358.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P. N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature*. 346 (6281). 240 – 244.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. 2009. *Genetika*. Masarykova Univerzita. Brno. 894 s. ISBN: 9788021048522.

- Stein, L. D. 2004. Human genome: end of the beginning. *Nature*. 431 (7011). 915 – 916.
- Šmarda, J., Dostál, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Masarykova Univerzita. Brno. 194 s. ISBN: 108021038411
- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content bases. *Molecular Biology and Evolution*. 9. 678 – 687.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30. 2725 – 2729.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22 (22). 4673 – 4680.
- Truong, A. Bogatcheva, N. V., Schelling, C., Dolf, G., Agoulnik A. I. 2003. Isolation and Expression Analysis of the Canine Insulin-Like Factor 3 Gene. *Biology of Reproduction*. 69 (5). 1658 – 1664.
- Tsiatis, A. C., Norris-Kirby, A., Rich, R. G., Hafez, M. J., Gocke, C. D., Eshleman, J. R., Murphy, K. M. 2010. Comparison of Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Melting Curve Analysis for the Detection of KRAS Mutations: Diagnostic and Clinical Implications. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 12 (4). 425 – 432.
- Vu, T. H., Werb, Z. 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes and Development*. 14 (17). 2123 – 2133.
- Wang, Y., Barthold, J., Kanetsky, P. A., Casalunovo, T., Pearson, E., Manson, J. 2007. Allelic variants in HOX genes in cryptorchidism. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*. 79 (4). 269 – 75.

- Weiss, P. a kol. 2010. Sexuologie. Grada Publishing. Praha, 724 s. ISBN: 9788024724928
- Yuan, F. P., Lin, D. X., Rao, C. V., Lei, Z. M. 2006. Cryptorchidism in LhrKO animals and the effect of testosterone-replacement therapy. *Human Reproduction*. 21 (4). 936 – 942.
- Zhao, X., Du, Z. Q., Rothschild, M. F. 2010. An association study of 20 candidate genes with cryptorchidism in Siberian Husky dogs. *Journal Of Animal Breeding and Genetic*. 127 (4). 327 – 331.
- Zimmermann, S., Steding, G., Emmen, J. M. A., Brinkmann, A. O., Nayernia, K., Holstein, A. F., Engel, W., Adham, I. M. 1999. Targeted Disruption of the *INSL3* Gene Causes Bilateral Cryptorchidism. *Molecular Endocrinology*. 13 (5). 681 – 691.
- Žák, P. 2009. Nové možnosti v sekvenování – sekvenátor GS-FLX. *Labor Aktuell*. 09 (3). 27 – 31.

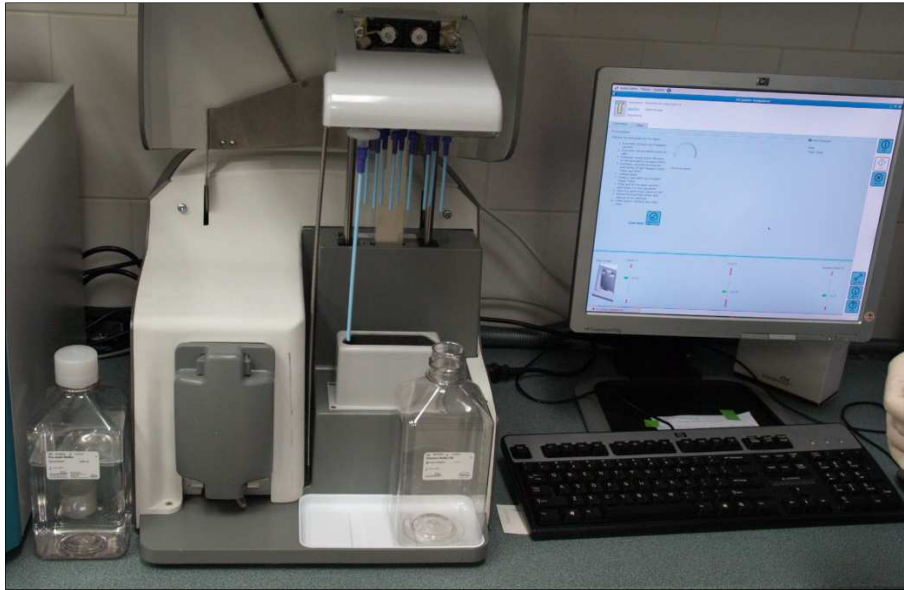
9 Seznam použitých zkratek

A	adenin
AG	americký buldog
Ala	alanin
AMK	aminokyselina
BIC	Bayesian Information Criterion
BOC	border kolie
BP	boloňský psík
bp	počet párů bází v molekule nukleové kyseliny
BRT	border teriér
C	cytosin
CCD	citlivá kamera pro snímání světelných signálů (z angl. Charge-Coupled Device“)
CP	chodský pes
ČSV	čecoslovenský vlčák
ddNTP	dideoxynukleotid (obecně)
DES	xenoestrogen diethylstilbestrol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>DNM1</i>	gen kódující <i>dynamin 1</i>
dNTP	deoxynukleotid (obecně)
<i>DRD4</i>	gen kódující <i>dopaminový receptor D4</i>
DV	dlouhosrstý vipet
EDTA	disodná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové
emPCR	emulzní polymerázová řetězová reakce (z angl. Emulsion Polymerase Chain Reaction)
FAPPZ ČZU	Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze
FSH	folikuly stimulující hormon
FXH	forxteriér hladkosrstý
G	guanin
<i>GREAT</i>	receptor hormonu <i>INSL3</i> (z angl. <i>G protein-coupled Receptor Affecting Testis descent</i>)

<i>HOXA10</i>	gen <i>Homeobox A10</i>
<i>INHA</i>	gen kódující <i>Inhibin alfa</i>
<i>INSL3</i>	gen kódující <i>Inhibin-like factor 3</i>
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JC	statistický model JC (Jukes a Cantor, 1969)
K2+G	statistický model K2 + G (Kimura 1980)
KR	kryptorchidní jedinec
<i>KRAS</i>	onkogen <i>Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog</i>
LAB	labrador retriever
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MID	specifický identifikátor (z angl. Multiplex Identifier)
mRNA	messenger RNA, též mediátorová nebo informační RNA
NGS	sekvenování nové generace (z angl. New-Generation Sequencing)
PAP	papillon
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PPi	pyrofosfát
Primer F	přímý primer
Primer R	zpětný primer
PRT	parson russell teriér
SHE	šeltie
SHI	shih-tzu
SMRT	sekvenování jednotlivých molekul DNA v reálném čase (z angl. Single Molecule Real-Time sequencing)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (z angl. Single Nucleotide Polymorphism)
<i>SOD1</i>	gen kódující <i>superoxid dismutázu 1</i>
T	thymin
T92	statistický model T92 (Tamura, 1992)
Taq	termostabilní polymeráza pocházející z <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-borátový pufr (Sambrook et al., 1989)
<i>TIMP1</i>	gen <i>Metalloproteinase inhibitor 1</i> (Tissue Inhibitors of Metalloproteinase)
MMPs	matrixové metaloproteinázy
UTR	nepřekládaná oblast mRNA (z angl. Untranslated Region)
Val	valin

Příloha 1 – Fotodokumentace vybraných kroků pyrosekvenace

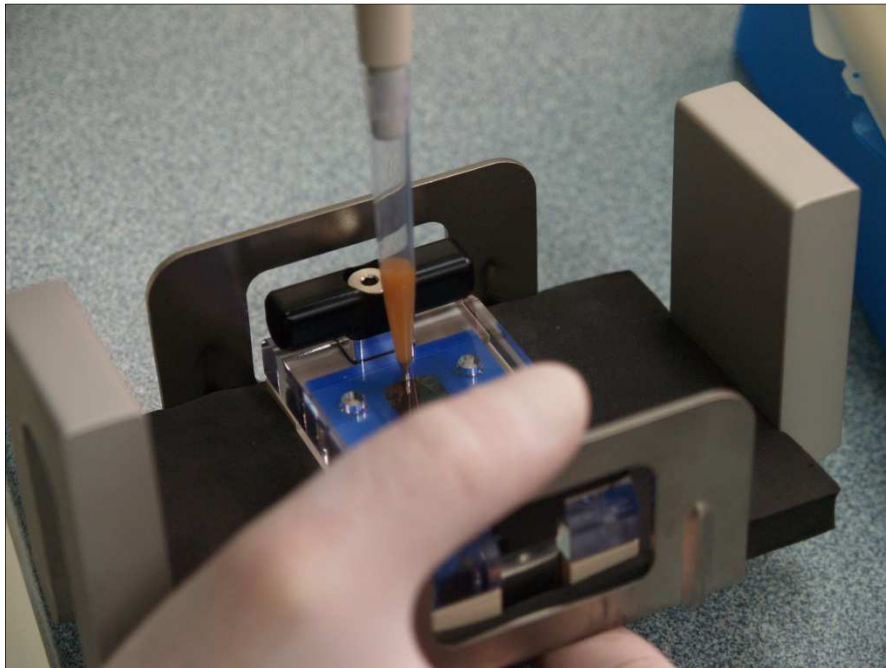
Pyrosekvenátor GS Junior System (Vejl, 2013)



Separace kuliček s navázanými molekulami DNA (Vejl, 2013)



Plnění pikotitrační destičky (PicoTiterPlate) různými typy kuliček (Vejl, 2013)



Pohled na umístění PTP-cartridge a umístění optického čipu pro snímání světelného signálu CCD kamerou (Vejl, 2013)



Příloha 2 – Pufry a roztoky použité při gelové elektroforéze

Vzorkový pufr (Sambrook et al., 1989)

- 0,25 % bromfenolové modři - sodná sůl (Serva, SRN)
- 0,25 % xylencyanolové modři FF (Sigma, USA)
- 15,0 % ficolu (Sigma, USA)
- vše rozpustit ve sterilní 2x deionizované H₂O
- uchovávat při 4°C

10xTBE pufr (Sambrook et al., 1989)

- 450 mM Tris-kyselina boritá (Sigma, USA), pH 8,0
- 10 mM EDTA (Sigma, USA)
- uchovávat při 4°C

1xTBE pufr (Sambrook et al., 1989)

- naředit 10xTBE pufr 1x deionizovanou H₂O
- uchovávat při 4°C

Zásobní roztok ethidium bromidu (Sambrook et al., 1989)

- 10 mg ethidium bromidu (Sigma, USA)
- 1 ml sterilní 2x deionizované H₂O
- při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných rukavicích
- uchovávat ve tmě při teplotě 4°C

Elektrodový pufr

- 1500 ml 1xTBE
- 75 µl zásobního roztoku ethidium bromidu
- při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných rukavicích
- pufr je určen pro okamžité použití.

1x TE Sambrook et al., 1989)

- 10 mM Tris (pH 8) (Sigma, USA)
- 1 mM EDTA (Sigma, USA)
- pufr byl připravován jako 10x koncentrovaný zásobní roztok

Poznámka: Veškeré operace s roztoky a gely, které obsahují ethidium bromid, je nutno provádět vždy v ochranných latexových rukavicích.