

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

Bakalářská práce

**Genová terapie u dědičných onemocnění vázaných na pohlaví
u psa domácího**

Adéla Molnárová

Chov zájmových zvířat – Kynologie

Vedoucí práce: Ing. Vladimíra Sedláková, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Genová terapie u dědičných onemocnění vázaných na pohlaví u psa domácího“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 28. 4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Vladimíře Sedlákové, Ph.D. za její odborné vedení, podporu a cenné rady, které mi poskytla během zpracování mé bakalářské práce. Rovněž děkuji všem dalším osobám, které mi nabídly pomoc a povzbuzení při tvorbě této práce.

Genová terapie u dědičných onemocnění vázaných na pohlaví u psa domácího

Souhrn

Bakalářská práce se zaměřuje na principy genové terapie jako budoucího nástroje pro léčbu onemocnění, u kterých dosud nebyla nalezena jiná možnost terapie, a popisuje její využití u dědičných onemocnění vázaných na pohlaví, konkrétně vázaných na chromozom X, u psa domácího (*Canis familiaris*). K úplnému porozumění tématu je část práce věnována genetickým základům a principům dědičnosti. Historický kontext psa domácího poukazuje na fakt, že umělá selekce, jež dala vzniknout moderním plemenům, měla za následek zvýšení výskytu genetických chorob v populaci psů. Část práce je věnována popisu genetické podstaty, klinických příznaků, diagnostických metod a terapeutických možností vybraných dědičných onemocnění vázaných na X chromozom, jako je hemofilie A a B, progresivní retinální atrofie a svalová dystrofie. Vzhledem ke genetické podobnosti mezi psem a člověkem jsou psi často využíváni jako preklinické modely pro testování genové terapie u odpovídajících nemocí lidí. Tyto studie poskytují důležité poznatky, které přispívají k rozvoji terapeutických možností v rámci humánní medicíny. Hlavní část této práce se zabývá principy genové terapie, zahrnující historický přehled, využití vektorů jako nosičů terapeutických genů, současné trendy zahrnující konkrétní metodu CRISPR a řešerši úspěšných terapií u vybraných dědičných chorob. Na závěr jsou zmíněny diskutované překážky v genové terapii, mezi které patří především bezpečnostní aspekty jako toxicita a imunitní reakce, ale také otázky týkající se welfare laboratorních zvířat. Genovou terapii lze obecně považovat za naději v inovativním přístupu léčby nemocí, které mají významný dopad na kvalitu života psů i lidí. Její účinnost a efektivita byla potvrzena několika studiemi na psích modelech, nicméně je nutné neustále tuto metodu rozvíjet tak, aby její využití bylo bezpečné a docílilo požadovaných dlouhodobých terapeutických výsledků.

Klíčová slova: genová terapie, hemofilie A a B, dystrofie svalové tkáně, retinální atrofie, pohlaví

Gene therapy for sex-linked inherited diseases in the domestic dog

Summary

The bachelor thesis focuses on the principles of gene therapy as a future tool for treating diseases for which no other therapeutic option has been found so far. It describes its application in sex-linked hereditary diseases, specifically on the X chromosome, in the domestic dog (*Canis familiaris*). To fully understand the topic, a part of the thesis is devoted to the genetic basis and principles of heredity. The historical context of the domestic dog highlights the fact that artificial selection, which led to the development of modern breeds, has resulted in increased occurrence of genetic diseases in the dog population. Part of this thesis is devoted to a description of the genetic basis, clinical signs, diagnostic methods, and therapeutic options for selected X-linked hereditary diseases such as hemophilia A and B, progressive retinal atrophy, and muscular dystrophy. Due to the genetic similarity between dogs and humans, dogs are often used as preclinical models for testing gene therapy for corresponding human diseases. These studies provide important insights that contribute to the development of therapeutic options within human medicine. The main part of the thesis is focused on the principles of gene therapy, including a historical overview, vectors used as carriers of therapeutic genes, current trends, specifically the CRISPR method, and a review of successful therapies for selected hereditary diseases. Finally, discussed obstacles in gene therapy are mentioned, including mainly safety aspects such as toxicity and immune reactions, but also laboratory animal welfare issues. In general, gene therapy can be considered a promising innovative approach for the treatment of diseases that significantly impact the quality of life for both dogs and humans. Its efficacy and effectiveness have been confirmed by several studies in canine models, however, it is crucial to continuously develop this method to ensure that its use is safe and achieves the desired long-term therapeutic outcomes.

Keywords: gene therapy, hemophilia A and B, muscular dystrophy, retinal atrophy, gender

Obsah

1 Úvod	9
2 Cíl práce	10
3 Historie psa domácího	11
3.1 Domestikace a vznik plemen	11
4 Genetický přehled	12
4.1 Nukleové kyseliny	12
4.1.1 Deoxyribonukleová kyselina (DNA).....	12
4.1.2 Ribonukleová kyselina (RNA).....	13
4.2 Gen a jeho struktura	13
4.2.1 Gen Duchennovy muskulární dystrofie	13
4.3 Genom	14
4.3.1 Genom psa.....	15
4.4 Chromozom	15
4.5 Karyotyp psa	16
4.6 Alela	16
4.7 Genotyp a fenotyp	17
4.8 Mutace	18
4.8.1 Klasifikace mutací	18
4.9 Monogenní dědičnost onemocnění	18
4.9.1 Autozomální dědičnost recesivní	19
4.9.2 Autozomální dědičnost dominantní.....	19
4.9.3 Gonozomální dědičnost recesivní a dominantní.....	20
5 Dědičná onemocnění vázaná na pohlaví u psa domácího	21
5.1 Hemofilie	21
5.1.1 Hemofilie A.....	21
5.1.2 Hemofilie B.....	22
5.1.3 Příznaky	23
5.1.4 Diagnostika	23
5.1.5 Léčba.....	24
5.2 Progresivní retinální atrofie	24
5.2.1 Příznaky	25
5.2.2 Diagnostika	26
5.2.3 Léčba.....	27
5.3 Svalová dystrofie	27
5.3.1 Příznaky	28
5.3.2 Diagnostika	29
5.3.3 Léčba.....	30

6 Genová terapie	31
6.1 Historie genové terapie.....	31
6.2 Charakteristika genové terapie	31
6.2.1 <i>In vivo</i> a <i>Ex vivo</i>	32
6.3 Proces genové terapie	32
6.4 Vektory.....	32
6.4.1 Virové vektory.....	33
6.4.2 Nevirové vektory.....	35
6.5 CRISPR-Cas v genové terapii.....	36
6.5.1 CRISPR-Cas9 v genové terapii.....	36
6.5.2 Rizika CRISPR-Cas	37
6.6 Genová terapie u dědičných onemocnění u psů	37
6.6.1 Psi jako modelový organismus	37
6.6.2 Úspěšné korekce hemofilie A pomocí genové terapie.....	38
6.6.3 Úspěšné korekce hemofilie B pomocí genové terapie	40
6.6.4 Úspěšné korekce X-vázané progresivní retinální atrofie pomocí genové terapie	41
6.6.5 Úspěšné korekce svalové dystrofie pomocí genové terapie	42
6.7 Překážky v genové terapii.....	44
7 Závěr.....	45
8 Seznam literatury.....	47
9 Seznam zkratk.....	55
10 Seznam obrázků	57
11 Seznam tabulek.....	58

1 Úvod

Dlouhý evoluční vývoj psa domácího (*Canis familiaris*), provázený intervencemi umělé selekce, vedl k formování moderních plemen psů. Avšak tato evoluce s sebou přinesla kromě žádoucích behaviorálních a morfologických změn také nárůst genetických onemocnění. Významná část těchto chorob, kterých je okolo 350 v populaci psů, je monogenně dědičná (Parker et al. 2004). Tato onemocnění, charakteristická mutacemi v jediném genu, jsou dále klasifikována dle chromozomu, na kterém je umístěn mutovaný gen, na autozomální a gonozomální.

Gonozomálně dědičná onemocnění se vážou na pohlavní chromozomy (X a Y), častěji se vyskytují onemocnění vázána na chromozom X. V této práci jsou podrobně popsána vybraná X-vázaná dědičná onemocnění, včetně jejich genetické podstaty, příznaků, diagnostiky a léčby. Patří mezi ně hemofilie typu A a B, která způsobuje poruchy srážlivosti krve v důsledku nedostatku koagulačních faktorů (Mauser et al. 1996; Lozier et al. 2002), X-vázaná progresivní retinální atrofie, která postihuje fotoreceptorové buňky a vede k postupné ztrátě zraku (Parry 1953), a svalová dystrofie vedoucí k úbytku svalové hmoty (Shelton & Engvall 2002).

Rozsáhlé studie napříč psím genomem přispěly k lepšímu porozumění mutacím v jednotlivých genech, které vedou ke vzniku těchto onemocnění. Identifikace konkrétních genů a příslušných mutací umožňuje specifikovat inovativní léčebné postupy s cílem odstranění těchto genetických vad.

Genová terapie se v posledních letech svého výzkumu jeví jako potenciální nástroj k léčbě různých genetických poruch. Tato metoda využívá k úpravě nebo korekci vadných genů genetický materiál, který je různými způsoby dopravován do buněk (Pathak 2022). Cílem genové terapie není pouze potlačení symptomů, ale také eliminace samotného onemocnění. Klíčovým prvkem genové terapie je vývoj vektorů, které slouží k efektivnímu doručení terapeutických genů do cílových organismů. Zvláště aktuální je technologie CRISPR, která může celý proces genové terapie výrazně zjednodušit.

Pes domácí sdílí mnoho genetických podobností s lidmi, což z něj činí ideální modelový organismus pro studium genetických onemocnění a preklinické studie účinků genové terapie. Klinické studie na těchto savcích poskytují komplexní informace o účinnosti jednotlivých léčebných postupů. Avšak vedle efektivnosti genové terapie je nutné klást důraz na bezpečnostní a etické aspekty, tak aby splňovaly podmínky welfare.

2 Cíl práce

Cílem práce je shromáždit, prostudovat a posoudit současné literárně prezentované poznatky o využití metody genové terapie u dědičných onemocnění vázaných na pohlaví u psa domácího. Dílčím cílem bakalářské práce je poskytnout podrobný přehled o vybraných onemocněních se zaměřením na aktuální trendy ve výzkumu této problematiky.

3 Historie psa domácího

Pes domácí (*Canis familiaris*), jako jeden z nejstarších společníků člověka, prodělal dlouhý evoluční vývoj a jeho současná podoba je výsledkem intenzivního šlechtění a umělé selekce. Tento proces zásadně ovlivnil současnou populaci psů, která se vyznačuje rozmanitostí v tvarech těla, chování či vlohách, čímž se liší od mnoha jiných druhů savců. Bohužel tato diverzifikace předurčuje většinu plemen ke specifickým onemocněním dědičného původu. Různorodost psích plemen a související predispozice ke genetickým chorobám jsou úzce spojeny s domestikací (Galibert & André 2006).

3.1 Domestikace a vznik plemen

Proces domestikace psa domácího pravděpodobně započal již v době mladého paleolitu okolo 35 000 let př. n. l. Ačkoli není možné určit přesné datum, je jisté, že pes patřil mezi první domestikované druhy (Galibert et al. 2011). O původu psa se dlouhou dobu vedly diskuse, které zahrnovaly dva odlišné názory. Dle jednoho názoru, který zastával i Charles Darwin, je pes polyfyletického původu, naproti tomu panoval názor, že pes je původu monofyletického (Galibert et al. 2011). Studie zkoumající chování, vokalizaci, morfologii a molekulární struktury, označují vlka obecného (*Canis lupus*) jako hlavního, ne-li jedinečného předka (Vilà et al. 1997).

V průběhu domestikace dochází k reprodukční izolaci rodičovského páru od populace zvířat divokých a založení malé skupiny, která se postupně rozšiřuje a geneticky odlišuje. V dalších generacích se hromadí genotypové a fenotypové rozdíly vznikající v rámci adaptace na podmínky vytvořené lidmi (Galibert et al. 2011). Domestikované druhy vykazují ve srovnání se svými divokými předky řadu změn morfologických, fyziologických a behaviorálních (Hansen et al. 2020). U psů, ale i jiných zvířat, můžeme pozorovat změny ve tvaru obličeje, uší a ocasu, kapacity mozku, pigmentace srsti, změny v endokrinní soustavě nebo v pohlavním cyklu samic (Wilkins 2020). Tento jev je označován jako domestikační syndrom. Kromě uvedených anatomických a fyziologických změn je možné pozorovat také redukovanou agresivitu a zvýšenou sociabilitu (Hansen et al. 2020). Selekcí na právě zmíněné behaviorální vlastnosti vzniká jako vedlejší produkt morfologická pestrost určující variabilitu jednotlivých plemen (King et al. 2012).

Většina moderních plemen psů se začala formovat v 19. století díky úsilí chovatelů, kteří se zaměřovali na specifické atraktivní vlastnosti (Parker & Ostrander 2005). Dnes jsou psí plemena dokladem nekonečné variability ve všech vnímaných aspektech. Různorodost se projevuje ve velikosti těla, ale také v zbarvení, délce a struktuře srsti. Nelze opomenout ani plemena bez srsti, jako je například mexický naháč. Samotný ocas pak nabízí mnoho tvarů, od pevně zatočených až po srpovité (Scott & Fuller 1965). Tato fenotypová rozmanitost naznačuje pestré genetické dědictví (Vilà et al. 1997). V současnosti je popsáno přes 400 plemen a 350 dědičných onemocnění u čistokrevných populací (Parker et al. 2004).

4 Genetický přehled

Kapitola představuje základní teoretický rámec nezbytný pro porozumění tématu bakalářské práce. V této části jsou popsány klíčové pojmy z oblasti genetiky a principy dědičnosti.

4.1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny (NK) patří mezi makromolekulární sloučeniny, jejichž vznik je ovlivněn různými enzymy. NK hrají klíčovou roli ve spolehlivém uložení, přenosu a expresi genetické informace (Beránek 2016).

Strukturu nukleových kyselin tvoří lineární nebo kruhové polymerové řetězce, které jsou složeny z různých variant nukleotidů. Nukleotid sestává z nukleotidové báze, pentózy a zbytku kyseliny fosforečné (Beránek 2016). Skelet polynukleotidového řetězce je tvořen opakujícím se střídáním mezi pentózovým sacharidem a fosfátovým zbytkem, jež jsou spojeny fosfodiesterovými vazbami (Hruban & Majzlík 2007). Podle typu sacharidu ve struktuře se nukleové kyseliny dělí na deoxyribonukleovou kyselinu obsahující monosacharid deoxyribózu a kyselinu ribonukleovou, která obsahuje monosacharid ribózu (Beránek 2016).

4.1.1 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

Molekula DNA je nositelem dědičné informace, která obsahuje instrukce pro syntézu všech bílkovin v živém organismu (Pritchard & Korf 2021). Je tvořena dvěma dlouhými polynukleotidovými řetězci, které se skládají ze čtyř typů nukleotidových podjednotek. Základní části nukleotidů jsou spojeny vodíkovými vazbami a udržují tak oba řetězce pohromadě. Většina DNA se uchovává v jádře eukaryotických buněk. Menší část informací je přítomna v mitochondriích a u rostlinných a řasových buněk i v chloroplastech (Alberts et al. 2002).

Základní tvar DNA je pravotočivá dvoušroubovice, která utváří zpravidla uzavřené útvary. U většiny mnohobuněčných organismů je DNA lineární, avšak mitochondriální DNA, DNA virů, plazmidů a bakterií, vytváří cirkulární formy (Hruban & Majzlík 2007).

Dusíkaté báze se dělí do dvou skupin – purinové báze, mezi které řadíme adenin a guanin, a pyrimidinové báze, kam řadíme thymin a cytosin (Pritchard & Korf 2021). K párování bází dochází na základě komplementarity a umožňuje uspořádat páry bází tak, aby vytvářely energeticky nejvýhodnější struktury (Alberts et al. 2002). Adenin se páruje dvěma vodíkovými můstky s thyminem a guanin se páruje třemi vodíkovými můstky s cytosinem (Hruban & Majzlík 2007).

Geny obsahují úseky nekódující DNA nazývané introny, které jsou oddělovány úseky kódující DNA neboli exony (Alberts et al. 2002). Ve struktuře genů eukaryot se vyskytují převážně introny (Pritchard & Korf 2021). Nekódující DNA má důležitou funkci v regulaci exprese sousedních genů, což je klíčové pro formování složitých genů (Alberts et al. 2002).

4.1.2 Ribonukleová kyselina (RNA)

Stejně jako DNA je i RNA lineární polymer složený ze čtyř různých typů nukleotidů. Od molekuly DNA se ribonukleová kyselina odlišuje nejen monosacharidem, ale i bází a stavbou. V molekule RNA je báze thymin nahrazena uracilem. Zatímco DNA se v buňkách vyskytuje jako dvouvláknová šroubovice, struktura RNA je jednovláknová. Řetězce RNA se ale skládají do různých tvarů a kliček (Alberts et al. 2002).

V eukaryotické buňce se vyskytují různé typy ribonukleových kyselin, z nichž nejvýznamnější jsou mediátorová RNA (mRNA), která slouží k určení počtu a pořadí aminokyselin v bílkovinném řetězci, ribozomální RNA (rRNA), jež je integrovanou součástí ribozomů a společně s proteiny se podílí na vytváření jejich struktury, a transferová RNA (tRNA) sloužící k transportu aminokyselin a vzniku funkčních ribozomů (Hruban & Majzlík 2007).

4.2 Gen a jeho struktura

Gen je základní jednotka definující dědičnost organismu. Molekulární definice genu popisuje, že strukturní gen reprezentuje specifickou sekvenci nukleotidů nesoucí informaci, která je přepsána (transkripce) a přeložena (translace) k tvorbě jednoho polypeptidového řetězce (Hruban & Majzlík 2007).

Každý gen představuje úsek DNA obsahující genetickou informaci v podobě složitých kombinací stavebních jednotek – nukleotidů, které zodpovídají za tvorbu specifických proteinů (Kočárek 2008).

Geny lze rozdělit do dvou základních skupin:

- strukturní geny – nesou informaci o primární struktuře jednoho řetězce polypeptidu a patří sem geny kódující proteiny se stavební funkcí a geny, které kódují proteiny s biochemickou a fyziologickou funkcí,
- geny pro funkční RNA – transkripční produkty těchto genů nepodléhají translaci, zahrnují geny kódující tRNA a rRNA (Kočárek 2008).

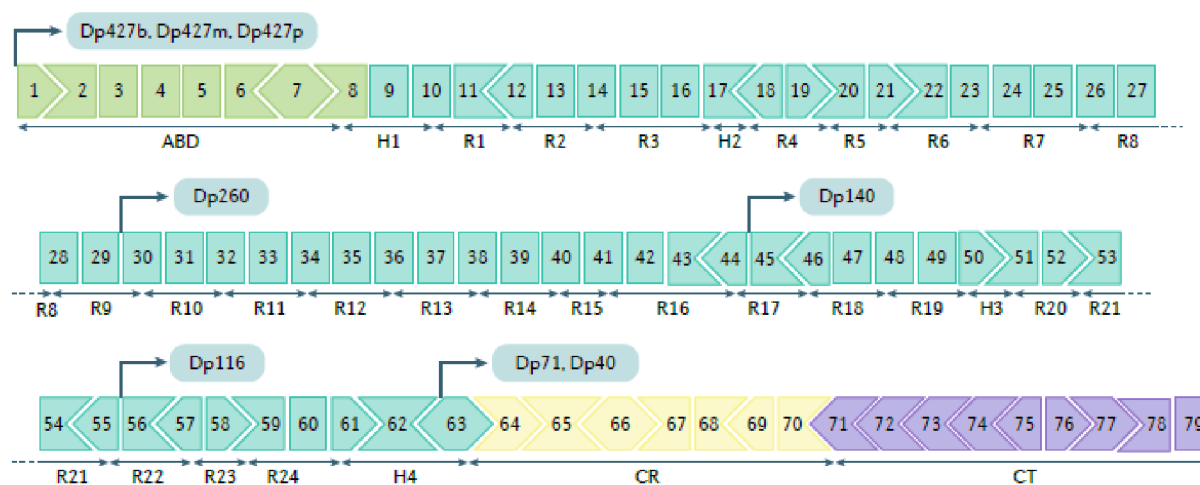
4.2.1 Gen Duchennovy muskulární dystrofie

Popis genu Duchennovy muskulární dystrofie (*DMD*) přispěje k lepšímu porozumění obecné struktury genů. Gen *DMD* dosahující délky přibližně 2,4 milionů bází je jedním z nejdelších v lidském genomu (Ahn & Kunkel 1993). Gen je lokalizován na pohlavním chromozomu X a jeho přesná pozice je označována jako *DMD locus* (chrX:26,288,910–28,335,720) (Shelton et al. 2022). Gen má složité uspořádání a obsahuje 79 exonů obsahujících informaci pro tvorbu finálního proteinu dystrofinu (Ahn & Kunkel 1993).

Čtrnáct kilobází (kb) mRNA dystrofinu kóduje protein o velikosti 427 kilodaltonů (kD), který obsahuje 3 685 aminokyselin. Jeho struktura je podobná cytoskeletálním proteinům spektrinu a aktinu, které plní strukturální úlohu ve statických a dynamických procesech všech typů buněk v organismu. Imunohistochemie ukazuje, že dystrofin lze nalézt na plazmatické membráně všech svalů a některých neuronů (Ahn & Kunkel 1993).

Gen dystrofinu je rozčleněn do čtyři hlavních domén (Obrázek 1):

- N-terminální doména (*N-terminal domain*), exony 1–8,
- střední tyčinková doména (*Central rod domain*), exony 9–63,
- doména bohatá na cystein (*Cysteine rich domain*), exony 64–70,
- C-terminální doména (*C-terminal domain*), exony 71–79 (Duan et al. 2021).



Obrázek 1: Struktura dystrofinu – N-terminální doména (zelená), střední tyčinková doména (modrá), doména bohatá na cystein (žlutá), C-terminální doména (fialová) (Duan et al. 2021).

4.3 Genom

Genom představuje komplexní soubor všech molekul DNA obsažených v organismu. U eukaryotických organismů lze genom rozdělit do dvou složek. První složkou je jaderný genom označující soubor genů obsažených v buněčném jádře. Druhou složkou je mimojaderný genom, který zahrnuje geny v mitochondriích a chloroplastech (Kočárek 2008).

Mitochondrie mají svůj vlastní genom umístěný v tzv. mitochondriální matrix. Mitochondriální DNA (mtDNA) má ve srovnání s jadernou DNA (nDNA) odlišnou strukturu. Jedná se o kruhovou dvoušroubovici sestávající se ze dvou řetězců:

- H řetězec – těžký, bohatý na guaniny,
- L řetězec – lehký, bohatý na cytosiny (Taanman 1999).

4.3.1 Genom psa

Psí genom sestává ze 78 chromozomů, tedy 39 párů, a jeho celková délka dosahuje 2,41 miliard bází (Gb). Genom feny boxera pokrývající celkovou délku byl úspěšně zmapován pomocí metody WGS (*whole-genome shotgun*). Výsledky ukázaly, že z celkové velikosti tvoří 2,38 Gb samotné nukleotidové sekvence a zbývající 1 % reprezentuje mezery mezi těmito sekvencemi. Sestavený genom tedy vyniká vysokou kontinuitou, kde většina genů ve svých sekvencích neobsahuje sekvenční mezery. Počet genů v psím genomu byl stanoven na základě vytvořené předpovědi metodou založenou na důkazech. Konečná kolekce obsahovala 19 300 psích genů, z nichž téměř všechny vykazovaly jasné podobnosti s již známými lidskými geny (Lindblad-Toh et al. 2005).

Již v předešlé studii byla provedena analýza genomové DNA samce standardního pudla, která poskytla odhadovanou velikost části genomu známé jako euchromatin pohybující se v rozmezí mezi 2,31 až 2,47 miliardami bází (Kirkness et al. 2003).

Analýza referenčního genomu CanFam_Bas (China) odhalila, že genom je strukturován do 632 scaffoldů se 149 mezerami (gaps) mezi nimi. Celková délka těchto mezer čítá 76 431 párů bází (bp) (Edwards et al. 2021).

Délka molekuly mtDNA psa domácího byla odhadnuta na 16 728 bp. V délce je zahrnuta i mitochondriální řídicí oblast (mtCR), dlouhá přibližně 1 270 bp, která se vyznačuje absencí kódovací schopnosti (Kim et al. 1998).

4.4 Chromozom

Chromozom představuje vláknitou strukturu uloženou v každém buněčném jádře, která slouží jako nosič genetické informace. Geny jsou na chromozomech uspořádány lineárně za sebou a místa, kde se nachází se nazývají lokusy (Kočárek 2008).

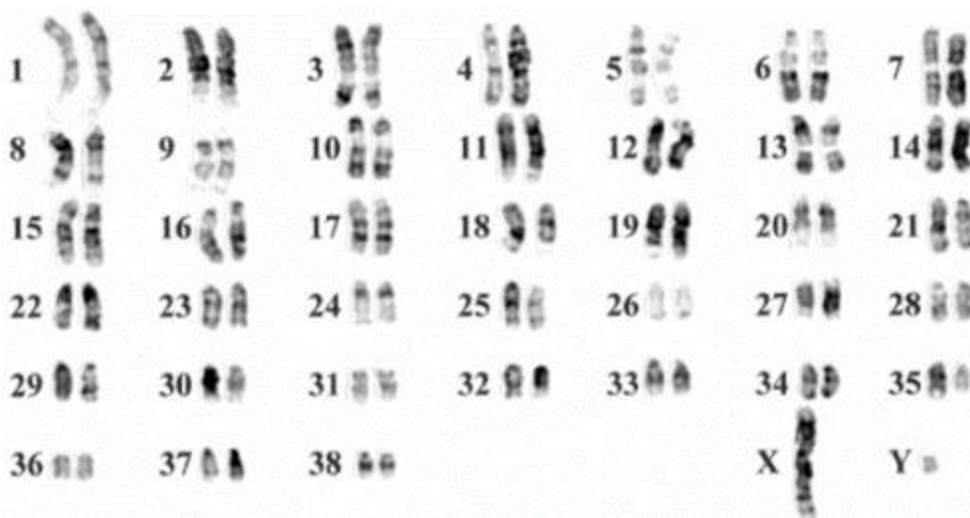
Chromozom je sestaven z molekuly DNA a histonových a nehistonových proteinů, které dohromady utváří základní stavební jednotku chromozomu – nukleohistonové vlákno (Kočárek 2008; Otová & Mihalová 2012).

Nukleohistonové vlákno je tvořeno difuzní strukturou nazývanou chromatin. Během procesu barvení chromozomu, který slouží ke snadnější identifikaci, jsou části chromatinu vybarveny buďto světleji nebo tmavěji. Světlejší části chromatinu jsou označovány jako euchromatin, tmavší oblasti jako heterochromatin (Snustad & Simmons 2017). Heterochromatin obsahuje jen málo nebo žádné aktivní geny, zatímco euchromatin obsahuje smyčky DNA s množstvím kódujících genů (Otová & Mihalová 2012).

Chromozom je tvořen útvarem zvaným chromatida a zpravidla se skládá ze dvou identických sesterských chromatid (Kočárek 2008; Otová & Mihalová 2012). Centromerou je chromozom rozdělen na dvě části, dlouhé a krátké raménko. Dle pozice centromery rozlišujeme 4 skupiny chromozomů – metacentrický, submetacentrický, akrocentrický a telocentrický. Každé raménko zakončují telomery, což jsou úseky neobsahující geny (Otová & Mihalová 2012).

4.5 Karyotyp psa

Karyotyp neboli kompletní sada chromozomů psa (Obrázek 2) obsahuje ve srovnání s ostatními domestikovanými savci nejvyšší diploidní počet chromozomů ($2n = 78$). Psí karyotyp sestává z 39 párů chromozomů, z nichž 38 párů jsou akrocentrické autozomy (somatické chromozomy) a zbývající dva chromozomy jsou metacentrické gonozomy (pohlavní chromozomy). Konkrétně se jedná o velký sub-metacentrický chromozom X a malý metacentrický chromozom Y. U samice se v karyotypu vyskytují dva chromozomy X, zatímco u samce je přítomen chromozom X a Y (Breen 2008). Chromozom X se řadí k největším v tomto souboru, naopak chromozom Y je nejmenší a bývá snadno identifikovatelný ve většině buněk (Gustavsson 1964).



Obrázek 2: Karyotyp samce psa (BreenLab@NCSU 2022).

4.6 Alela

Alela je termín představující projev genu neboli alternativní formu genu (Hruban & Majzlík 2007). Genofond zahrnuje všechny alely určitého genu v populaci téhož druhu. Ačkoli se za normálních podmínek v autozomech nacházejí maximálně dvě alely, celkový počet alel téhož genu v populaci může dosáhnout vysokých hodnot (Beránek 2016). Chromozomy v somatických buňkách tvoří páry, tudíž je každý gen tvořen dvojicí alel. Alela dominantní (z latinského *dominus* – pán) je v genotypu označovaná zpravidla velkým písmenem (A), naopak recesivní alela (z latinského *recedere* – ustupovat) je označovaná malým písmenem (a) (Kočárek 2008).

Mezi alelami téhož genu dochází k těmto interakcím:

- dominance – alela genu převládá a odpovídající znak je viditelný ve fenotypu,
- recesivita – alela genu je potlačena a odpovídající znak není viditelný ve fenotypu.

V některých situacích dominantní alela nedokáže úplně potlačit účinek recesivní alely a ve fenotypu se projeví alely obě. Tento jev se nazývá neúplná dominance (Hruban & Majzlík 2007).

Příkladem neúplné dominance u psů je zbarvení Merle, což je charakteristické zbarvení srsti projevující se skvrnami zředěného pigmentu, které se prolínají s normálním melaninem a dodávají srsti mramorovaný vzor (O'Sullivan & Robinson 1988). Jedinci s genotypem m/m mají normální zbarvení. Dominantní homozygoti (M/M), jinak také „double-merle“, projevují výraznější fenotyp než heterozygoti (M/m). Psi s Merle zbarvením mají nejčastěji modré oči a často se u nich projevují různé sluchové a oftalmologické abnormality, které mohou vést až k úplné slepotě či hluchotě (Sorsby & Davey 1954).

4.7 Genotyp a fenotyp

Genotypem se rozumí specifická podoba dědičné informace zakódované v nukleových kyselinách (Hruban & Majzlík 2007). Genotypy jedinců jsou různorodé, což znamená, že nesou různé kombinace alel. Termín homozygot označuje jedince, který má v genotypu pro určitý znak dvě shodné alely. Podle recesivity alel rozlišujeme dominantního homozygota (AA), kde obě alely jsou dominantní, a homozygota recesivního (aa), kde obě alely jsou recesivní. Jedince s párem odlišných alel označujeme jako heterozygota (Aa) pro daný znak (Kočárek 2008).

Fenotyp je používán k popisu konkrétních pozorovatelných vlastností jedince, které jsou výsledkem jeho genotypu (Beránek 2016). Fenotyp manifestuje dědičnou informaci, která může být do větší či menší míry ovlivněna různými faktory vnějšího prostředí (Hruban & Majzlík 2007).

Pro lepší pochopení vztahu genotypu a fenotypu uvádím gen ovlivňující délku ocasu. Mutace C295G v genu *T* způsobuje přirozené zkrácení ocasu známé jako „Natural bobtail“ (Obrázek 3). Mutace spadá do oblasti autozomální dědičnosti dominantní, kde znak je řízen dvojicí alel. Recesivní alela „C“ (nemutovaná) podmiňuje normální délku ocasu a dominantní alela „G“ (mutovaná) podmiňuje přirozené zkrácení ocasu (Indrebø et al. 2008). U jedince s genotypem C/C očekáváme normální délku ocasu. Heterozygot s genotypem C/G se rodí s přirozeně zkráceným ocasem (Indrebø et al. 2008). Délka ocasu se odvíjí od počtu ocasních obratlů, psi se rodí s krátkým ocasem (brachyurie) nebo zcela bez ocasu (anurie) (Hytonen et al. 2009). Genotyp G/G nebyl u živých jedinců pozorován, jelikož psi umírají již v embryonálním stádiu. Narozené štěně s genotypem G/G by pravděpodobně trpělo vážnými vývojovými vadami, které jsou neslučitelné se životem, jako je např. deformace páteře nebo nedostatečně vyvinuté plíce (Indrebø et al. 2008)



Obrázek 3: Bourbonský ohař krátkosrstý s normální délkou ocasu (vlevo), se zkráceným ocasem (uprostřed), bez ocasu (vpravo) (Hytonen et al. 2009).

4.8 Mutace

Mutace jsou změny v genetickém materiálu, které mohou být způsobeny chybou při replikaci DNA nebo poškozením molekuly DNA chemickými či fyzikálními faktory. Mutace mohou být somatické nebo gametické, které se přenáší pohlavními buňkami na potomstvo (Snustad & Simmons 2017).

Geny postižené mutací neboli mutantní geny představují časté příčiny vzniku vývojových vad a dědičných onemocnění (Otová & Mihalová 2012; Snustad & Simmons 2017). Řada mutací je letálních a mohou tak způsobovat smrt embrya nebo smrt jedince po narození (Otová & Mihalová 2012). Mutace s sebou nesou i pozitivní aspekt, jelikož do populace přináší genetickou variabilitu, která organismům umožňuje se adaptovat na nepříznivé podmínky (Snustad & Simmons 2017).

4.8.1 Klasifikace mutací

Z hlediska rozsahu a povahy změn klasifikujeme mutace do tří skupin – genomové, chromozomové a genové. Genomové mutace, vznikající nesprávnou segregací chromozomů, vedou ke změně počtu chromozomů v karyotypu. Tyto mutace mohou vyvolat vážná onemocnění nebo vést až k úmrtí jedince. Chromozomové mutace jsou charakteristické změnou struktury jednotlivých chromozomů. V rámci monogenně dědičných chorob jsou nejčastější genové neboli bodové mutace. Ty vznikají na úrovni genu jako nereparované chyby během replikace DNA (Beránek 2016).

Genové mutace lze dále rozdělit do tří skupin. Substituce zahrnuje nahrazení nukleotidu v DNA za jiný, delece představuje odstranění jednoho nebo více nukleotidů, a inserce, při níž dochází k zařazení nadbytečné báze do DNA (Hruban & Majzlík 2007).

Rozdělení bodových mutací dle dopadu na proteosyntézu:

- nonsense mutace – vedou ke vzniku terminačního kodonu, signalizujícího konec procesu translace prostřednictvím substituce, inserce nebo delece,
- missense mutace – dochází k záměně nukleotidu, která může či nemusí způsobit změnu aminokyseliny v polypeptidovém řetězci,
- frameshift mutace – v důsledku vložení nebo odstranění nukleotidů nastává posun čtecího rámce, při kterém může dojít k nepravidelnému sestřihu, deleci nebo duplikaci exonů,
- silent mutace – vyskytují se v nekódujících částech DNA nebo se jedná o mutace, které nenarušují průběh transkripce či translace (Beránek 2016).

4.9 Monogenní dědičnost onemocnění






















Dědičná onemocnění vznikají v důsledku mutací v zárodečné linii a jsou přenášena prostřednictvím gamet do následujících generací. Téměř všechny vrozené choroby jsou monogenetické, což znamená, že jsou způsobeny mutacemi v jediném genu (Svoboda et al. 2000; Beránek 2016).

Monogenní dědičnost lze klasifikovat do dvou kategorií – autozomální dědičnost, která je spojena se somatickými buňkami a představuje situaci, kdy je mutovaný gen umístěn na autozomech, a gonozomální dědičnost, která se váže k pohlavním buňkám, kde je mutovaný gen lokalizován na gonozomech (Svoboda et al. 2000). Více než 200 genetických chorob psů je řízeno monogenně a až 70 % z nich je autozomálně recesivního charakteru (Ruvinsky & Sampson 2001).

4.9.1 Autozomální dědičnost recesivní

Autozomálně recesivní dědičnost je nejběžnějším typem přenosu genetických chorob u zvířat i lidí. Recesivně homozygotní jedinec, nesoucí v genotypu dvě mutované (recesivní) alely, projevuje klinické příznaky onemocnění. Dominantně homozygotní jedinec, který má obě alely dominantní, je zdravý a neprojevuje žádné příznaky onemocnění. Tento jedinec není schopen mutovanou alelu přenášet na potomky. Heterozygotní jedinec, který má jednu mutovanou alelu, je klinicky zdravý a v případě recesivní dědičnosti není klinicky odlišitelný od dominantního homozygota. Heterozygoti představují nositele recesivních alel, které mohou přenést na své potomky (Svoboda et al. 2000).

Podrobnější přehled o pravděpodobnosti štěpení jednotlivých fenotypů v rámci autozomálně recesivní dědičnosti lze nalézt v Tabulce 1.






















	 AA	 Aa	 aa
 AA	 100 %	 50 %  50 %	 100 %
 Aa	 50 %  50 %	 25 %  25 %  50 %	 50 %  50 %
 aa	 100 %	 50 %  50 %	 100 %

Tabulka 1: Autozomálně recesivní dědičnost (zelená – zdravý, žlutá – přenašeč, červená – postižený) (AnimaLabs 2016).

4.9.2 Autozomální dědičnost dominantní

Autozomálně dominantní typ dědičnosti je relativně vzácný, protože každý jedinec nesoucí mutaci manifestuje klinické příznaky, což usnadňuje jeho eliminaci z chovu. Postižený jedinec projevující klinické příznaky je buď dominantní homozygot nebo heterozygot. Naopak zdravý jedinec má pouze recesivně homozygotní genotyp a nenesí žádnou mutovanou alelu (Svoboda et al. 2000).

V Tabulce 2 je znázorněna pravděpodobnost štěpení jednotlivých fenotypů v kontextu dominantní dědičnosti.






















	 aa	 Aa	 AA
 aa	 100 %	 50 %  50 %	 100 %
 Aa	 50 %  50 %	 25 %  25 %  50 %	 50 %  50 %
 AA	 100 %	 50 %  50 %	 100 %

Tabulka 2: Autozomálně dominantní dědičnost (zelená – zdravý, žlutá – postižený heterozygot, červená – postižený homozygot) (AnimaLabs 2016).

4.9.3 Gonozomální dědičnost recesivní a dominantní

V rámci gonozomální dědičnosti vzniká téměř většina mutací na chromozomu X. Nejčastějším typem je pak gonozomálně recesivní dědičnost vázaná na X-chromozom (Svoboda et al. 2000). Onemocnění, která jsou řízena tímto způsobem, se dědí tzv. křížem. Samec (XY) je označován jako hemizygot, protože v jeho genotypu se vyskytuje pouze jedna alela, což je způsobeno tím, že se mutovaný gen nachází v oblasti chromozomu X, který nemá homologický úsek na chromozomu Y. Ačkoli se jedná o recesivní dědičnost, klinické příznaky se u samic projeví vždy, protože nikdy nedojde k potlačení recesivní alely. U samic (XX) se onemocnění projeví, jestliže se jedná o recesivního homozygota, ale pravděpodobnost této situace je velmi nízká (Svoboda et al. 2000). Vzácnější formou je dominantní dědičnost vázaná na X-chromozom, kde se klinické příznaky projevují u dominantních homozygotů a heterozygotů (AnimaLabs 2016).

V níže přiložené Tabulce 3 jsou zobrazeny detailní informace o pravděpodobnosti štěpení jednotlivých fenotypů u obou pohlaví.

		 X^AX^A	 X^AX^a	 X^aX^a
 X^AY-	♀	 100 %	 50 %  50 %	 100 %
	♂	 100 %	 50 %  50 %	 100 %
 X^aY-	♀	 100 %	 50 %  50 %	 100 %
	♂	 100 %	 50 %  50 %	 100 %

Tabulka 3: Gonozomálně recesivní dědičnost, X-vázaná (zelená – zdravý, žlutá – přenašečka, červená – postižený) (AnimaLabs 2016).

5 Dědičná onemocnění vázaná na pohlaví u psa domácího

Kapitola popisuje vybraná genetická onemocnění vázaná na X-chromozom, která postihují psa. Poskytuje základní přehled o hemofilii, progresivní retinální atrofii a svalové dystrofii včetně klinických projevů, diagnostiky a možností léčby.

5.1 Hemofilie

Hemofilie označuje skupinu geneticky podmíněných chorob sgonozomálně recesivní dědičností, která způsobuje chorobné krvácení u postižených jedinců. Onemocnění vyvolává poruchy hemostázy v důsledku abnormálního srážení krve, které je zapříčiněno nedostatkem koagulačních faktorů (Biggs et al. 1952).

5.1.1 Hemofilie A

Hemofilie typu A je způsobena nedostatkem koagulačního faktoru VIII, jež je důležitý pro správné srážení krve (Lozier et al. 2002). Koagulační faktor VIII, též nazývaný antihemofilní faktor, představuje plazmatický glykoprotein, který se účastní koagulační kaskády krve (Toole et al. 1986). Je převážně syntetizován v hepatocytech, ale lze jej nalézt v ledvinách, endoteliálních buňkách a lymfatické tkáni. Koagulační faktor je kódován jedním z největších genů v psím genomu, a to genem *F8*, který je umístěn na chromozomu X (Mazurkiewicz-Pisarek et al. 2016).

Mezi příčiny hemofilie A patří různé spontánní mutace probíhající v genu *F8*, které ovlivňují funkci koagulačního faktoru VIII (Lozier & Nichols 2013). Jednou z mutací, která způsobuje poruchy FVIII je inverze genu, při které dochází k přeskupení částí genu tohoto faktoru na chromozomu X. Inverze spočívá v rekombinaci mezi aktivně transkribovaným genem uvnitř intronu 22 a jeho kopií (Lozier et al. 2002). Výsledkem této inverze je zachování standardní transkripce prvních 22 exonů genu, avšak exony 23 až 26 jsou nahrazeny sekvencí, která způsobuje nefunkčnost faktoru (Lozier & Nichols 2013). U německého ovčáka byla na základě analýzy sekvence DNA prokázána nová mutace v exonu 1. Během této mutace došlo k záměně adeninu za guanin (TGG>TAG) na pozici 98, což způsobilo tvorbu stop kodonu (Mischke et al. 2011a).

Detailní přehled plemen psů, u kterých byla studována hemofilie A a probíhající mutací v genu *F8* je zobrazen v Tabulce 4.

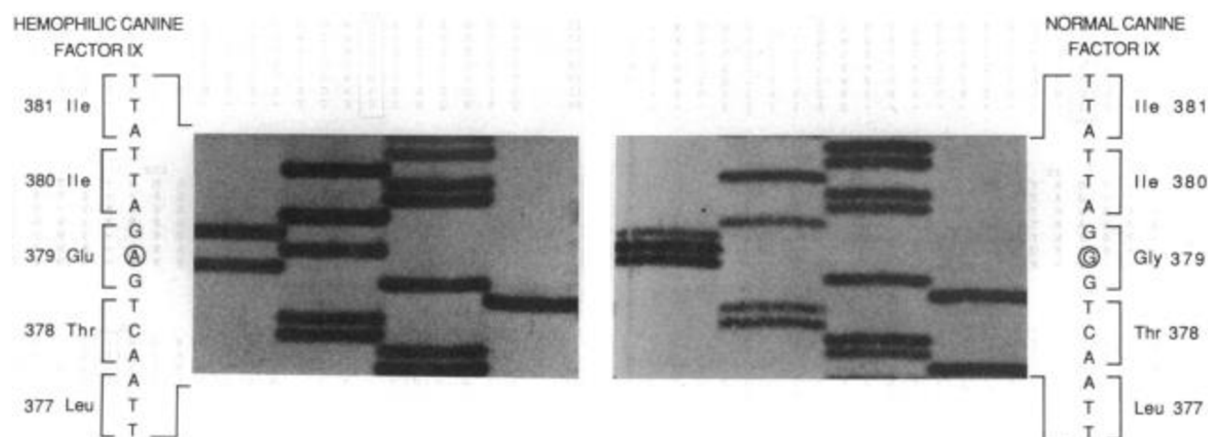
Plemeno	Mutace	Plemeno	Mutace
bobtail	nonsense	labradorský retrívr	delece
boxer	missense	malý knírač	substituce
border kolie	delece	německý ovčák	missense
irský setr	substituce	rhodéský ridgeback	inzerce

Tabulka 4: Plemena psů s hemofilii A a mutace probíhající v genu *F8* (Nicholas et al. 2021a).

5.1.2 Hemofilie B

Hemofilie typu B je spojena s nedostatkem či poruchou funkce koagulačního faktoru IX a jedná se o méně častou formu tohoto onemocnění (Mauser et al. 1996). Koagulační faktor IX, který je kódován genem *F9* na chromozomu X, je plazmatický glykoprotein, který je nezbytný pro aktivaci faktoru IX v koagulační kaskádě (Mischke et al. 2011b).

Genetická porucha způsobující hemofilii B je způsobena bodovými mutacemi, které probíhají v genu *F9* a mají zásadní vliv na funkci koagulačního faktoru. Sekvenováním DNA (Obrázek 4) z jaterní krve psů byl odhalen defekt faktoru IX způsobující záměnu adeninu za guanin (GGG>GAG), což mělo za následek substituci glycinu za kyselinu glutamovou na 379. aminokyselině v katalytické doméně (Evans et al. 1989).



Obrázek 4: Nukleotidové sekvence psího FIX u hemofilického (vlevo) a normálního (vpravo) psa, které znázorňují substituci bází na aminokyselinové pozici 379 (Evans et al. 1989).

Analýza genu *F9* u plemene lhasa apso odhalila změnu v nukleotidové sekvenci, při které došlo k delecii pěti bází na pozici nukleotidů 772 až 776. Současně byla identifikována substituce thyminu za cytosin na pozici nukleotidu 777. Tato genetická změna způsobila nestabilitu mRNA a tvorbu předčasněho terminačního kodonu (Mauser et al. 1996). U jedinců postižených touto mutací je charakteristická absence faktoru IX v plazmě, což je pravděpodobně způsobeno nestabilitou proteinu a jeho nemožností se uvolnit do krevního oběhu (Lozier & Nichols 2013).

U plemene labradorský retrievr, u kterého došlo k úplné delecii genu *F9*, byly prokázány inhibiční protilátky proti FIX, které mohou později znemožnit léčbu, jelikož blokují funkci faktoru a brání tak zastavení krvácení (Brooks et al. 1997).

Detailní přehled studovaných plemen psů s hemofilií B a mutací v genu *F9* je zobrazen v Tabulce 5.

Plemeno	Mutace	Plemeno	Mutace
cairn teriér	missense	novofundlandský pes	inzerce
erdelteriér	inzerce	německý drátosrstý ohař	inzerce
hovawart	delece	pitbulteriér	delece
labradorský retrívr	delece	rhodéský ridgeback	missense
lhasa apso	delece		

Tabulka 5: Plemena psů s hemofilií B a mutace probíhající v genu *F9* (Nicholas et al. 2023b).

5.1.3 Příznaky

Projevy obou typů hemofilie sdílejí do jisté míry společné charakteristiky. Psi s hemofilií A jsou náchylní ke spontánnímu krvácení, které se často projevuje podkožními hematomy (Obrázek 5), krvácením z dásní při přezubování, hromaděním krve v hrudní (hemothorax) nebo břišní (hemoabdomen) dutině a nadměrným krvácením po chirurgickém zákroku. Vzácně může docházet ke krvácení do páteřního kanálu s možným důsledkem komprese míchy. Častým místem krvácení je podkožní tkáň a kloubní prostory. Někdy může také docházet ke krvácení do průdušnic, nosních dutin (Obrázek 5) nebo parenchymu penisu (Aslanian et al. 2014).

Symptomy projevující se u hemofilie B jsou obdobné jako u typu A a zahrnují hematomy, hemartrózu způsobující kulhání a nadměrné krvácení z ran. Příznaky jsou vážnější u velkých a mladých psů a při dlouhodobém krvácení mohou ohrozit život jedince (Kim et al. 2011).



Obrázek 5: Spontánní krvácení z nosní dutiny (vlevo) a podkožní hematom (vpravo) u hemofilického psa (Kim et al. 2011).

5.1.4 Diagnostika

Diagnostika hemofilie u psů je klíčovou součástí prevence a léčby této vážné choroby. K dispozici jsou různé diagnostické metody zahrnující analýzu krve a měření koncentrace koagulačních faktorů VIII a IX (Brooks 1999).

Pro charakterizaci přesného proteinu nebo metabolické poruchy, která je zodpovědná za pozorovaný fenotyp, jsou nezbytné specifické funkční, kvantitativní a strukturální analýzy. Příkladem funkčního testu je například doba srážení krve (Brooks 1999). Funkční testování koagulačních faktorů, zahrnující test srážlivosti, je používáno jako screeningový test k zjištění, zda jedinec trpí koagulopatií. Specifické kvantitativní a strukturální analytické testy jsou používány k určení přesné povahy onemocnění (Barr & McMichael 2012).

Další metodou je genetická analýza, která může pomoci určit specifickou mutaci, která je zodpovědná za výskyt hemofilie u konkrétního jedince. Genetické testování rovněž umožňuje identifikaci přenašeče této mutace (Brooks 1999). Genetický test deficiencie faktorů je k dispozici u společnosti LABOKLIN. Cena jednoho testu k lednu 2024 činila u faktoru VIII 1 720 Kč a u faktoru IX 1 997 Kč (LABOKLIN 2024).

5.1.5 Léčba

Dnešní léčebné možnosti zahrnují různé možnosti, jako jsou transfúze krevních destiček, nahrazení koagulačních faktorů a použití antifibrinolytických látek. Zároveň je důležitá léčba symptomů, tj. krvácení, prostřednictvím transfúze krve. V léčbě hemofilie se běžně využívá čerstvě zmražená plazma, která obsahuje klíčové koagulační faktory sloužící k zástavě krvácení (Barr & McMichael 2012). Jako alternativu lze využít kryoprecipitát, který úspěšně obnovuje hladinu von Willebrandova faktoru (vWF) v plazmě, a tím zkracuje dobu krvácení (Giles et al. 1982). Tato forma léčby je relevantní pouze pro hemofilii typu A, v případě hemofilie B je tento typ terapie neúčinný (Barr & McMichael 2012). Důležitou součástí je také prevence, která zahrnuje optimální dentální hygienu a také opatrnost při hrách a předcházení zbytečným úrazům (Barr & McMichael 2012).

5.2 Progresivní retinální atrofie

Progresivní retinální atrofie (PRA) představuje skupinu geneticky podmíněných onemocnění, která jsou charakterizována degenerací fotoreceptorových buněk sítnice. Poškození fotoreceptorů vede k postupným poruchám zraku a konečné slepotě u postižených zvířat (Parry 1953). PRA je geneticky velice variabilní a vyskytuje se u více než 100 plemen psů (Downs et al. 2013).

Ačkoli je většina forem PRA autozomálně recesivního charakteru, byly potvrzeny a současně jsou známy dvě formy X-vázané progresivní retinální atrofie (XLPRA), které jsou způsobeny mutacemi v genu *RPGR* (Petersen-Jones 2005). Gen *RPGR* leží na krátkém raménku chromozomu X a obsahuje informace pro tvorbu RPGR (*Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator*) proteinu, který je nezbytný pro normální funkci zraku (Meindl et al. 1996). Přestože přesná role tohoto proteinu zůstává dosud neobjasněna, díky současným pokrokům se daří lépe porozumět jeho funkci. Bylo potvrzeno, že RPGR je klíčový v řízení ciliární brány, jež hraje roli v regulaci přenosu proteinů (Megaw et al. 2015).

X-vázaná PRA typu 1 (XLPRA1) postihující plemena sibiřský husky a samojed vzniká v důsledku delece pěti nukleotidů (GAGAA), což způsobuje posun čtecího rámce a předčasné ukončení tvorby proteinu (Zhang et al. 2002). Stejná forma vyskytující se u čistokrevného plemene byla studována u plemene výmarský ohař, kde sekvenováním genomu došlo k identifikaci delece zahrnující první čtyři exony genu *RPGR* (Kropatsch et al. 2016). X-vázaná PRA typu 2 (XLPRA2) vyskytující se u křížených linií psů představuje závažnější formu. V případě XLPRA2 byla zjištěna delece dvou nukleotidů (GA), která vede k posunu čtecího rámce a významné změně odvozené sekvence peptidu (Zhang et al. 2002). U formy XLPRA1 můžeme také pozorovat fenotypovou variabilitu, která je výsledkem působení sekundárně modifikujících genů (Guyon et al. 2007).

Výzkum zaměřující se na progresivní retinální atrofii, která byla dříve objevena u plemene border kolie, odhalil novou formu onemocnění spojenou s gonozomální dědičností. Analýza vyloučila mutace v genu *RPGR*, což naznačuje existenci nové X-vázané formy PRA (XLPRA3), která podle provedené studie může sloužit jako potenciální model pro lidskou *retinitis pigmentosa* (Vilboux et al. 2008).

Přehled studovaných plemen s progresivní retinální atrofií a mutací v genu *RPGR* je prezentován v Tabulce 6.

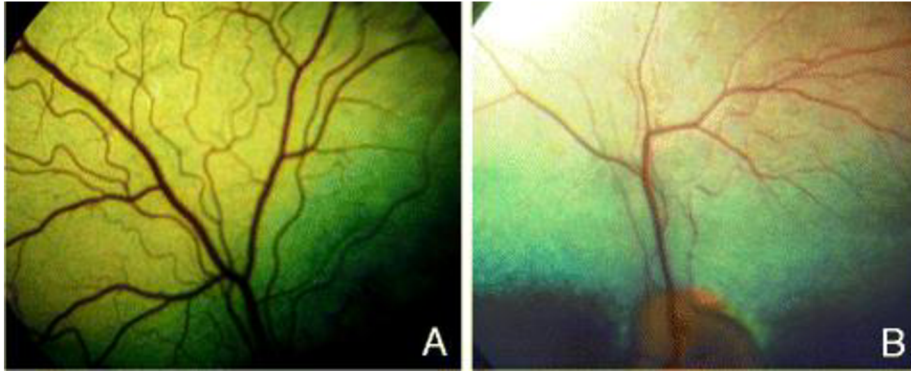
Plemeno	Mutace	Plemeno	Mutace
kříženci	delece	sibiřský husky	delece
samojed	delece	výmarský ohař	delece

Tabulka 6: Plemena psů s XLPRA a probíhající mutace v genu *RPGR* (Nicholas et al. 2021a; Nicholas et al. 2021b).

5.2.1 Příznaky

Progresivní retinální atrofie způsobuje degeneraci fotoreceptorových buněk sítnice. Primárně jsou zasaženy buňky tyčinek, což má za následek ztrátu nočního vidění. Později dochází k postižení čípků a zhoršení kvality denního vidění, onemocnění ve většině případů končí úplnou slepotou (Petersen-Jones 2005).

Zornice psa bývají obvykle rozšířené a vykazují zvýšený odraz světla označovaný jako „oční záře“ (Obrázek 6). U forem s pozdějším nástupem onemocnění je běžný vývoj sekundární katarakty, která způsobuje zakalení čočky. Změny na sítnici způsobené XLPRA jsou bilaterální a symetrické a mimo jiné zahrnují stenózu cév (Obrázek 6), depigmentaci a hyperpigmentaci na non-tapetálním fundu a v pokročilé fázi může docházet i k atrofii hlavy zrakového nervu, která je způsobena ztrátou axonů gangliových buněk (Petersen-Jones 2005).

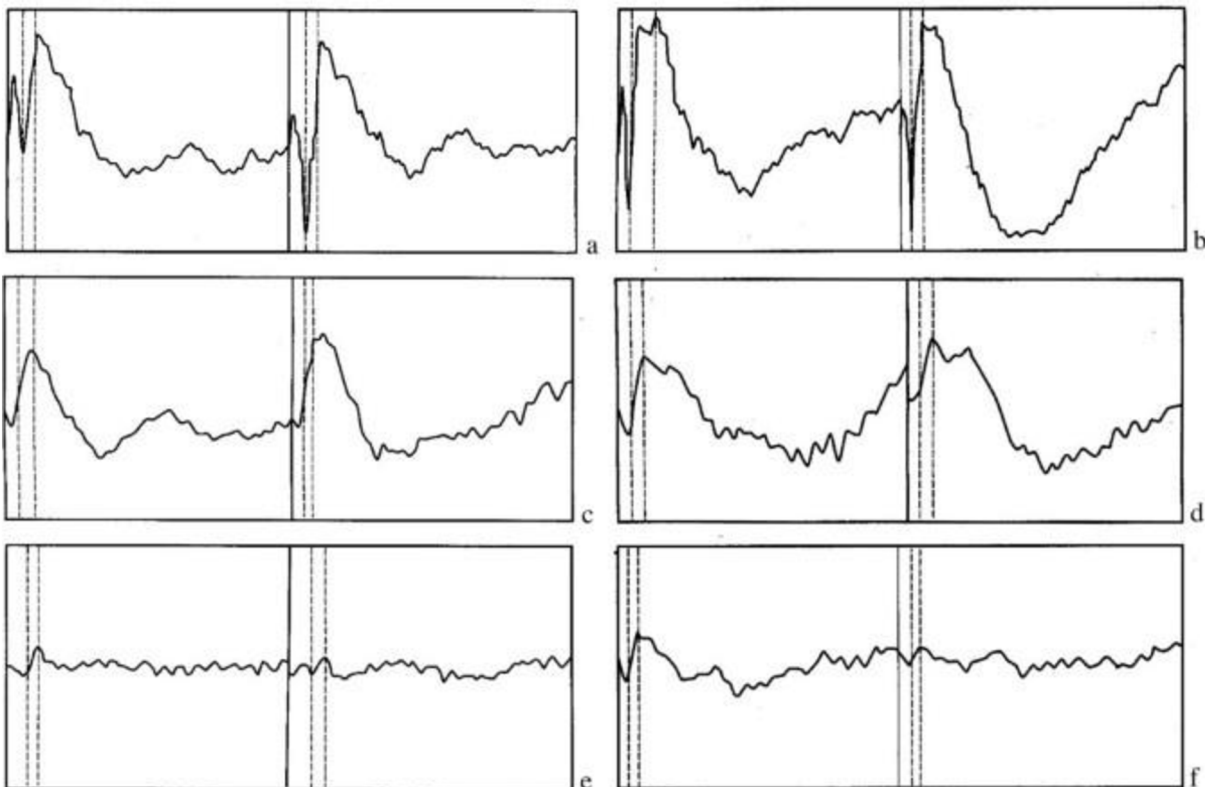


Obrázek 6: Oftalmoskopie sítnice – zdravé oko (A), postižené oko vykazující stenózu cév a hyperreflexi (B) (Kropatsch et al. 2016).

5.2.2 Diagnostika

Diagnóza progresivní retinální atrofie, včetně X-vázané formy, je založena na kompletní anamnéze. Klinické vyšetření zahrnuje pečlivé oftalmoskopické hodnocení abnormalit probíhajících na sítnici (Kelewala et al. 2017).

Dalším způsobem vyšetření změn na sítnici je elektroretinografie (ERG), která zaznamenává reakce sítnice podněcované světelnými stimuly v podobě křivky (Obrázek 7). ERG slouží ke zhodnocení neobvyklého vývoje fotoreceptorových buněk. U XLPRA2 jsou abnormality pozorovatelné již ve věku 6 týdnů, u XLPRA1 až v 6 měsících. Informace o poškození buněk v rané fázi lze odhalit také pomocí histologických vyšetření, která mohou ukázat, zda se fotoreceptory vyvíjejí normálně či nikoli (Petersen-Jones 2005).



Obrázek 7: Elektroretinogramy – zdravý jedinec (a, b), postižený jedinec s lézemi na specifických místech (c, d), postižený jedinec s rozsáhlými lézemi (e, f) (Vilboux et al. 2008).

Molekulárně genetické testování, při kterém se provádí analýza genu *RPGR* umožňuje odhalení konkrétní mutace genu a také případných přenašečů. Využívá se metody kandidátních genů, která zahrnuje výběr potenciálních genů a identifikaci polymorfních markerů. Druhou metodou je genetické mapování využívající polymorfních markerů v celém psím genomu, které umožňují chromozomální lokalizaci lokusů spojených s daným onemocněním (Petersen-Jones 2005). LABOKLIN poskytuje genetické testování pro XLPRa u plemen samojed a sibiřský husky. Cena k lednu 2024 byla 1 720 Kč (LABOKLIN 2024).

5.2.3 Léčba

Dosud neexistuje žádná oficiálně schválená léčba pro progresivní retinální atrofii. Prozatím nebyl prokázán měřitelný účinek při používání antioxidantů nebo vitamínů. Avšak tyto látky nejsou pro psa škodlivé a mohou pomoci oddálit progresi onemocnění a zlepšit kvalitu života postižených zvířat (Llera et al. 2023).

5.3 Svalová dystrofie

Svalová dystrofie reprezentuje závažné degenerativní onemocnění svalů, které se projevuje postupným úbytkem svalové hmoty a celkovým chabnutím svalů (Shelton & Engvall 2002). Svalová dystrofie psů vázaná na X-chromozom (*Canine X-linked muscular dystrophy*) klinicky a patologicky napodobuje lidskou svalovou dystrofii (Valentine et al. 1992).

Onemocnění vzniká v důsledku nedostatku či absence proteinu známého jako dystrofin, která bývá zapříčiněna mutacemi v genu *DMD* – *Duchenne muscular dystrophy gene* (gen Duchennovy muskulární dystrofie) (Cooper et al. 1988). Dystrofin je rozsáhlý cytoskeletální protein, který je především přítomen v kosterní a srdeční svalovině, ale i v mozku, a je kódován genem na chromozomu X (Straub & Campbell 1997).

Duchennova svalová dystrofie (DMD) představuje běžnější formu u zvířat i lidí, naopak Beckerova svalová dystrofie (BMD) není příliš častá. BMD je zároveň ve srovnání s DMD mírnější formou, protože v případě BMD je protein dystrofin produkován, byť v abnormální podobě (Shelton & Engvall 2002).

Je třeba poznamenat, že všechny působící mutace se vyskytují v genu dystrofinu, ale jejich molekulární základ se může lišit dle jednotlivých plemen. Například u rottweilerů byla zaznamenána mutace typu nonsense v exonu 58 (Winand et al. 1994 cit. dle Kornegay et al. 2012), zatímco u německých krátkosrstých ohařů došlo k delecím, které vedly k úplné ztrátě funkce dystrofinu (Schatzberg et al. 1999). U kavalír king charles španělů byla identifikována missense mutace v exonu 50, která vedla ke zkrácení překládaného proteinu (Walmsley et al. 2010).

V Tabulce 7 je znázorněn souhrn studovaných plemen se svalovou dystrofií a mutací v genu *DMD*.

Plemeno	Mutace	Plemeno	Mutace
border kolie	delece	labradoodle	nonsense
bretaňský ohař	inzerce	německý ohař krátkosrstý	delece
francouzský buldoček	inzerce	norfolkský teriér	delece
jack russell teriér	delece	rottweiler	nonsense
japonský špic	inverze	tibetský teriér	delece
kavalír king charles španěl	missense	trpasličí pudl	delece
kokršpaněl	delece	welsh corgi pembroke	inzerce
labradorský retrívr	inzerce	zlatý retrívr	splicing

Tabulka 7: Plemena psů se svalovou dystrofií a probíhající mutace v genu *DMD* (Nicholas et al. 2023c).

5.3.1 Příznaky

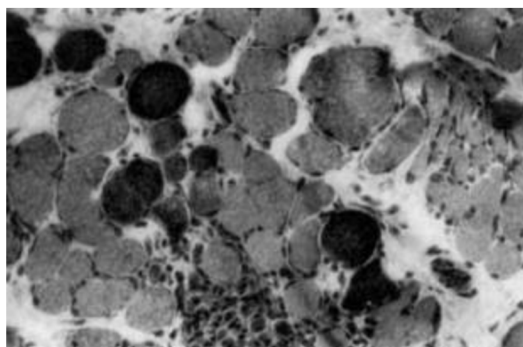
U postižených psů se klinické příznaky objevují několik týdnů po narození a jejich povaha bývá různorodá. Charakteristickým znakem onemocnění je celková slabost spojená s postupným úbytkem svaloviny. Postižení psi vykazují slabost svalů, která je způsobena atrofií či hypertrofií svalové tkáně, což může vést k abnormalitám v postoji a chůzi (Shelton 2004). Typickým znakem je shrbený postoj (Obrázek 8), kterému předchází zakřivení v oblasti páteře (Valentine et al. 1992). Mezi další klinické příznaky patří obtíže s polykáním, regurgitace a dušnost, které jsou důsledkem hypertrofie svaloviny jazyka, hltanu a jícnu. Může také docházet k obtížím s otevíráním čelisti nebo k hypersalivaci. U některých jedinců mohou být pozorovány i abnormality srdeční svaloviny, které mohou vést až k selhání srdce. Obecně jsou psi neschopni zvládat fyzickou zátěž a během chůze projevují krátké a tuhé kroky (Shelton 2004).



Obrázek 8: Labradorský retrívr s typickým abnormálním držením těla (Shelton & Engvall 2002).

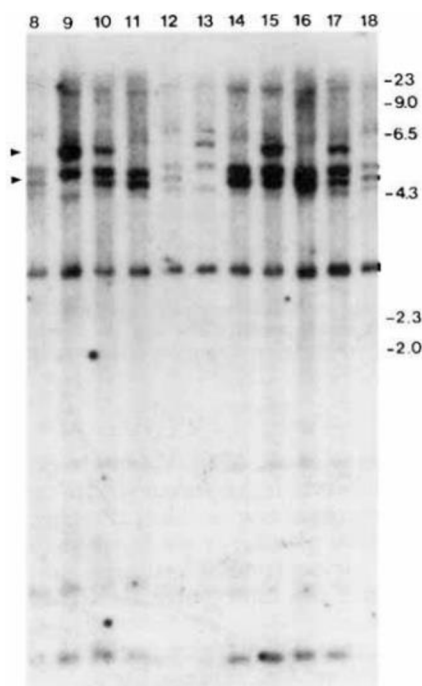
5.3.2 Diagnostika

Diagnostika svalové dystrofie prošla značným vývojem. Původně se diagnóza stanovovala na základě klinických a patologických změn. Ke studii morfologických abnormalit nervové, kosterní a srdeční svaloviny se běžně používal světelný mikroskop. S rozvojem moderních metod jsou svalové biopsie (Obrázek 9) podrobeny analýzám s využitím histologických a cytochemických technik (Prior & Bridgeman 2005). Imunohistochemickými testy je možné zjistit přítomnost proteinu dystrofinu ve svalové biopsii (Shelton & Engvall 2002).



Obrázek 9: Dystrofická svalová tkáň s viditelnými tmavými vlákny, která procházejí degenerací a infiltrací makrofágy (Valentine et al. 1992).

V současné době se diagnostika provádí pomocí molekulárních testů. Díky pokročilým metodám, jako jsou multiplex polymerázová řetězová reakce nebo např. Southernova metoda blottingu (Obrázek 10), je nyní možné onemocnění diagnostikovat bez potřeby invazivní svalové biopsie (Prior & Bridgeman 2005).



Obrázek 10: Analýza Southern blotu z DNA – šipky označují polymorfní restriční fragmenty. Řada 8, 11, 12 – postižení samci, řada 14 – postižená samice, řada 10, 15 – přenašečky, řada 9, 13, 16, 18 – zdraví samci, řada 17 – zdravá samice (Valentine et al. 1992).

Southern blot je laboratorní metoda sloužící k detekci specifických molekul DNA z biologického vzorku. Pomocí restriktivního enzymu je vzorek DNA rozštěpen na malé fragmenty, které jsou separovány dle velikosti pomocí gelové elektroforézy. Separovaná DNA je v nezměněné pozici přenesena na nosnou membránu. Membrána je poté ošetřena sondou, což je krátký úsek DNA či RNA, který je schopen se vázat s konkrétní sekvencí DNA. Sonda obvykle obsahuje radioaktivní nebo fluorescenční barvivo, které umožňuje detekci cílového DNA fragmentu (National Human Genome Research Institute 2024).

Metoda PCR je využívána především díky rychlosti provedení a může být využito pro prenatální diagnostiku. Při prenatální diagnostice je fetální DNA získána buď odběrem choriových klků nebo aminocentézou, důležité je potvrdit nepřítomnost mateřské DNA ve vzorku fetální DNA (Prior & Bridgeman 2005).

Genetická laboratoř GENOMIA nabízí testování DMD u plemen s predispozicí k tomuto onemocnění za 1 490 Kč. U kavalír king charles španělů je cena 1 690 Kč (GENOMIA 2024).

5.3.3 Léčba

Přístup k léčbě svalové dystrofie lze rozdělit do dvou období. V prvním období, které předcházelo identifikaci genu *DMD* a proteinu dystrofinu, se léčba zaměřovala na symptomy a užívání medikamentů, které cílily na mechanismy odvozené z patologických změn. Druhá fáze, navazující na toto období, se soustředí na genové a buněčné terapie, které nabízejí velký potenciál pro efektivnější léčbu. Objev genu *DMD* a proteinu dystrofinu otevřel cestu k cílenějším terapiím, avšak pokrok v genových terapiích byl značně pomalý a provázela ho řada komplikací. Nadále tak zůstávají glukokortikoidy a podpůrná léčba standardním postupem při léčbě svalové dystrofie a genová terapie je stále ve fázi vývoje (Kornegay 2017).

6 Genová terapie

Kapitola se zaměřuje na principy genové terapie, jako léčebného přístupu, a popisuje její využití v rámci dědičných chorob u psů. Detailněji jsou popsány konkrétní terapeutické přístupy u vybraných dědičných onemocnění.

6.1 Historie genové terapie

První kroky v genové terapii započaly v 60.–70. letech 20. století, kdy se uskutečnily první experimenty zkoumající potenciál této terapeutické metody. Tyto experimenty umožnily izolaci specifických savčích buněk a byly důkazem prvních úspěšných přenosů a expresí exogenní DNA v buňkách savců (Ray Bradley et al. 1962; Kao & Puck 1968; Friedmann 1992).

V první polovině 60. let byl kladen důraz na vývoj buněčných linií, které by umožnily otestování hypotézy, že cizí DNA může být trvale a stabilně přenesena do savčích buněk jako zdroj nové genetické funkce. Ačkoliv bylo potvrzeno, že savčí buňky mohou začlenit a exprimovat cizí DNA, nedostatečná efektivita dostupných metod přenosu genů v té době neumožňovala stabilní expresi genetické informace. V druhé polovině 60. let došlo k objevu, že efektivnější transformace může být dosažena s využitím exogenní genetické informace. Tato teorie vycházela z faktu, že viry integrují část své genetické informace do genomů cílových buněk a mohou být modifikovány tak, aby vnesly do poškozených buněk potenciálně terapeutické geny namísto svých vlastních (Friedmann 1992).

Vývoj genové terapie pokračoval až do 80. let, kdy byly vyvinuty efektivní retrovirové vektory umožňující korekci genetických vad v různých typech buněk spojených s genetickými chorobami. Pokroky v genové terapii vycházely z podrobného porozumění životního cyklu a transdukční schopnosti retrovirů (Friedmann 1992). Retrovirové vektory se jevily jako účinný nástroj pro užitečný genový přenos, což bylo demonstrováno několika úspěšnými experimenty (Doehmer et al. 1982; Tabin et al. 1982). V polovině 80. let se genová terapie stala konceptuální realitou, která čekala na technickou realizaci. Ačkoliv se genová terapie nacházela teprve na začátku svého vývoje, popsané mezníky představovaly klíčové události, které přivedly koncept genové terapie na scénu a učinily ji přijatelnou pro společnost (Friedmann 1992).

6.2 Charakteristika genové terapie

Genová terapie představuje inovativní metodu léčby chorob, které jsou způsobeny vadným nebo chybějícím genetickým materiálem (Pathak 2022). Cílem genové terapie je dosáhnout trvalé exprese terapeutického genu, tak aby došlo ke zmírnění nebo eliminaci symptomů onemocnění s minimem nežádoucích účinků (High & Roncarolo 2019). Pozitivního účinku může být dosaženo prostřednictvím několika strategií, mezi které patří vložení nového genu do organismu (*gene addition*), inhibice exprese mutovaného genu (*gene inhibition*), editace, jež zahrnuje modifikaci genu s cílem opravit mutaci a obnovit původní funkci (*gene editing*), nebo nahrazení funkce defektního či chybějícího genu novou funkční kopií (*gene replacement*) (Pathak 2022).

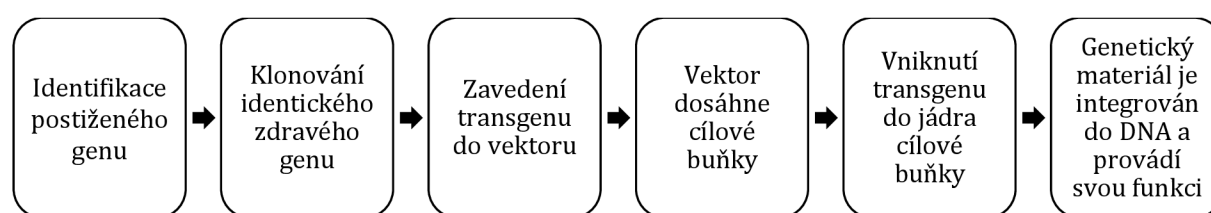
Genovou terapii lze provést v buňkách gamet, tedy ve spermích a vajíčkách, což nazýváme zárodečnou genovou terapií. Při této metodě je upravený gen přenášen do budoucích generací. Avšak častější je somatická genová terapie, při které modifikace genů probíhá v tělních buňkách, a nedochází tak k přenosu transgenu do dalších generací. Somatická terapie je považována za méně rizikovou oproti zárodečné terapii, která vyvolává obavy z neznámých rizik a nežádoucích účinků na organismus. Tato nejistota vedla v některých zemích k zákazu zárodečné genové terapie (Pathak 2022).

6.2.1 *In vivo* a *Ex vivo*

Přenos modifikovaných genů do buněk lze realizovat dvěma způsoby. První a častěji používaným způsobem je *in vivo*, při kterém je terapeutický gen přímo vpravován do těla cílového organismu. Druhým způsobem je *ex vivo*, který spočívá v genetické úpravě buněk, jež jsou izolovány mimo organismus, a následném transplantování těchto modifikovaných buněk zpět do těla (Wolfe 2009).

6.3 Proces genové terapie

Proces genové terapie, který je schematicky prezentován na Obrázku 11, začíná identifikací defektního genu, který je zodpovědný za projev onemocnění. Následně je provedeno klonování zdravého identického genu, který je označován jako terapeutický gen či transgen. Terapeutický gen je poté modifikován v souladu s terapeutickým cílem a vložen do vektoru (Ramamoorth 2015). Vektor je následně introdukován do těla buď lokálně (injekcí do tkáně), nebo systémovým podáním (intravenózně) (Rubanyi 2001). Primárním úkolem vektoru je transport transgenu do jádra cílové buňky, kde dochází k integraci genetického materiálu do DNA (Ramamoorth 2015). Následně dochází k tvorbě mRNA a její translaci do výsledného proteinu, který by měl po interakci s receptory buněk vyvolat odpovídající terapeutický efekt (Rubanyi 2001).



Obrázek 11: Schematické znázornění procesu genové terapie (Ramamoorth 2015).

6.4 Vektory

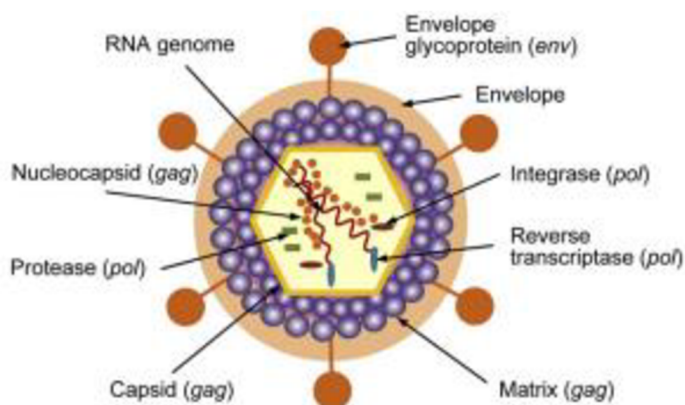
Vektory jsou využívány jako nosiče k přenosu nové funkční kopie vadného nebo chybějícího genu do buněk těla (Pathak 2022). V základu se pro genovou terapii využívají buď virové, nebo neviróvé nosiče genů. Kritériem pro výběr vhodného vektoru pro genovou terapii je zejména dostupnost cílové tkáně, která určuje, zda bude transdukcce provedena *in vivo* nebo *ex vivo*. Dalším rozhodujícím faktorem je délka exprese transgenu, která může být dočasná či trvalá. U terapeutických zásahů, kde je trvalá exprese genu nezbytná jsou preferovány retroviry a adenoasociované viry (Havenga et al. 1997).

6.4.1 Virové vektory

V průběhu evolučního vývoje získaly viry mnoho biologických charakteristik, které jim umožňují účinně rozpoznávat buňky a pronikat do nich. Viry jsou schopny se pohybovat v cílových buňkách směrem k jádru, kde následně exprimují své geny do hostitelské buňky (Rubanyi 2001). Tyto schopnosti jsou důvodem, proč jsou viry preferovanými vektory v rámci genové terapie (Pathak 2022). Nejčastěji využívané virové vektory jsou retroviry (RV), lentiviry (LV), adenoviry (Ad), adenoasociované viry (AAV) a viry herpes simplex (HSV). Vektory RV a LV disponují RNA genomy, které vyžadují krok reverzní transkripce (Wolfe 2009).

Virové vektory vykazují rovněž několik nedostatků, které zahrnují obtížnost v oblasti výroby, limitovanou schopnost opakovaných aplikací v důsledku zánětlivých reakcí a opožděné reakce imunitního systému (Al-Dosari & Gao 2009). Mezi další omezení patří jejich nižší nosná kapacita (Rodríguez-Gascón et al. 2013).

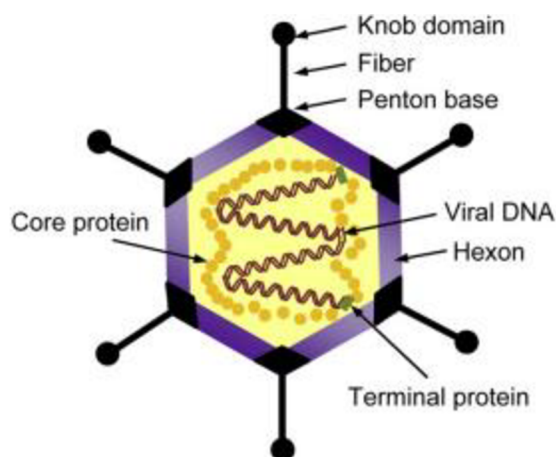
Retrovirus (Obrázek 12) je virus, který dokáže převést svůj genetický materiál z RNA genomu na dvouvláknovou DNA a kopie genomu jsou následně integrovány do chromozomů hostitelských buněk (Patil et al. 2012). Mezi výhody těchto virů patří dlouhodobá a stabilní exprese a schopnost integrace do genomu (Ratko et al. 2003). Využití retrovirů v genové terapii naráží na problém spojený s enzymem integrázy, který je schopen vložit genetický materiál viru do libovolného místa v genomu hostitele, což může vést k narušení funkce původních genů buněk a vzniku tzv. vložené mutagenese (Patil et al. 2012). Další nevýhodou je nutnost buněčného dělení (Ratko et al. 2003).



Obrázek 12: Struktura retroviru (Huang & Kamihira 2013).

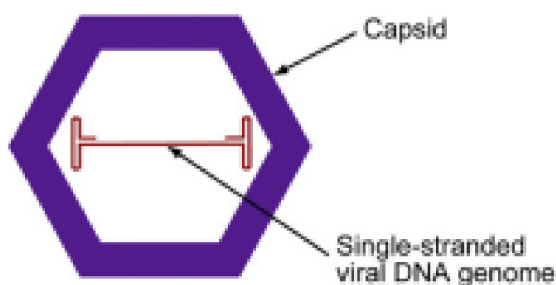
Lentivirus je kulovitá struktura složená z jednovláknové RNA. Hlavní výhodou vektoru je jeho dlouhodobá exprese (Ratko et al. 2003). Potenciální riziko u LV spočívá v možnosti vložení nežádoucích mutací do genomu hostitele. V současné době většina laboratoří není schopna vytvářet lentivirové vektory, které neintegrují svůj genetický materiál do hostitelské buňky, a proto jsou LV využívány v menší míře (Pan et al. 2021).

Adenovirus (Obrázek 13) je typem neobaleného viru s dvouvláknovou DNA, který se vyznačuje schopností infikovat širokou škálu hostitelů. Je využíván především díky své genetické stabilitě a velké nosné kapacitě pro přenos cizích genů (Pan et al. 2021). Adenovirus má schopnost infikovat různé typy buněk a jeho produkce je relativně snadná. Nevýhodou je dočasná exprese a riziko toxicity při opakované aplikaci. Kromě toho není adenovirus schopen integrace do genomu (Ratko et al. 2003).



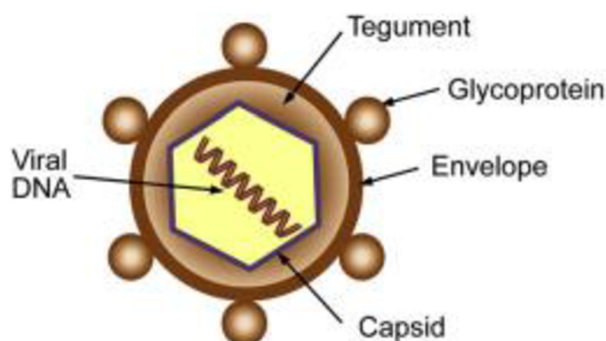
Obrázek 13: Struktura adenoviru (Huang & Kamihira 2013).

Adenoasociovaný virus (Obrázek 14) je neobalený jednovláknový DNA virus, který disponuje významnými biologickými vlastnostmi, genetickou stabilitou, vysokou a dlouhodobou účinností exprese a relativně snadnou manipulací (Pan et al. 2021). AAV k přenosu nevyžaduje buněčné dělení (Ratko et al. 2003). Avšak výrobní proces AAV je složitý a nákladný, což omezuje jeho širší využití (Pan et al. 2021). Další nevýhodou je omezená nosná kapacita a potenciální riziko vložení mutageny (Ratko et al. 2003).



Obrázek 14: Struktura adenoasociovaného viru (Huang & Kamihira 2013).

Viry herpes simplex (Obrázek 15) patří do skupiny dvouvláknových DNA virů, které mají schopnost cílit na určitý typ buněk, konkrétně neurony (Patil et al. 2012). Tento typ vektorů dokáže nést komplexní genové struktury díky vysoké nosné kapacitě. Zároveň HSV prokázaly schopnost efektivní transdukce *in vivo*. Mezi nevýhody patří vysoká toxicita a latentní exprese, která může vést k reaktivaci onemocnění. Celkově je exprese genů s využitím HSV krátkodobá (Ratko et al. 2003).



Obrázek 15: Struktura herpes simplex viru (Huang & Kamihira 2013).

V současné době jsou v reakci na rizika spojená s použitím virových vektorů v genové terapii vyvíjeny hybridní vektory. Tyto hybridní vektory jsou složeny z částí dvou či více různých virových vektorů, které jsou kombinovány s proteiny nebo genetickými složkami. Tímto způsobem získávají nové schopnosti nebo jsou zbaveny nežádoucích účinků, což zvyšuje jejich efektivitu a bezpečnost při terapeutickém využití (Huang & Kamihira 2013).

6.4.2 Nevirové vektory

Obavy z bezpečnosti spojené s virovými vektory podnítily vývoj vektorů, které nevyžadují potřebu virových systémů (Ginn et al. 2013). Nevirové vektory využívají syntetických a přírodních sloučenin nebo fyzikálních sil k dopravení DNA do buněk. Používané materiály jsou pro organismus méně toxické a mají nízkou imunogenitu (Al-Dosari & Gao 2009). Výhodami nevirálních vektorů jsou snadná výroba a možnost opakované aplikace, zároveň nejsou omezeny velikostí DNA molekuly. Nicméně, použití nevirálních vektorů je považováno za méně účinné a exprese genů bývá krátkodobá (Al-Dosari & Gao 2009; Rodríguez et al. 2013). V oblasti přenosu genů patří mezi nejjednodušší nevirální vektory tzv. „naked“ DNA, která je aplikována přímo do specifických tkání, ve kterých dochází k expresi genů (Ginn et al. 2013).

V současné době existují dvě hlavní kategorie nevirálních systémů – fyzikální metody a chemické nosiče. Fyzikální metody přenosu genů do buněk využívají sílu k dočasnému oslabení membrány cílové buňky, čímž je usnadněn intracelulární přenos genetického materiálu. Mezi fyzikální metody patří např. injekce jehlou, elektroporace, sonoporace či fotoporace. Chemické nosiče jsou klasifikovány na anorganické a biodegradovatelné částice (Ramamoorth 2015).

Anorganické částice jsou nanočástice, které chrání molekulu DNA před degradací a jsou schopny vstupovat do buněk. Obvykle se připravují z kovů (zlato, stříbro) nebo anorganických solí (vápník, hořčík, křemík), které mají schopnost dopravovat cizorodou nukleovou kyselinu do cytoplasmy nebo jádra postmitotických buněk přenášet a nevykazují téměř žádnou toxicitu (Al-Dosari & Gao 2009). Biodegradovatelné částice mohou být buď syntetické, nebo přírodní a zahrnují např. peptidové vektory, pevné lipidové nanočástice, lipidové nanoemulze či kationtové lipidy (Ramamoorth 2015).

6.5 CRISPR-Cas v genové terapii

Technologie CRISPR se stala populárním nástrojem v oblasti genové terapie, nabízejícím široké možnosti aplikace. Tato inovativní metoda vychází z přirozeného imunitního systému bakterií, který jim poskytuje ochranu proti plazmidům a virům (Doudna & Charpentier 2014).

Systém CRISPR-Cas poskytuje obranný mechanismus tím, že integruje cizí DNA do genomu, což umožňuje vyvinutí imunity proti invazivním elementům. Když cizí DNA pronikne do bakterie, proteiny Cas ji identifikují a rozštěpí na krátké fragmenty, které se integrují do CRISPR lokusů. Následně CRISPR produkuje krátkou RNA (crRNA), do které se zpracovávají cizí sekvence, a transaktivovanou CRISPR RNA (tracrRNA). Tyto molekuly společně s proteinem Cas tvoří komplex, který dokáže identifikovat a rozštěpit cizí DNA při další infekci. Celý proces zvyšuje odolnost bakterií a pomáhá účinně se bránit proti infekcím (Makarova et al. 2011). K navázání proteinu Cas na cílovou sekvenci DNA slouží specifická sekvence PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). Tato sekvence nukleotidů, která je rozpoznána a navázána na Cas protein, je klíčová pro správné cílení a navádění Cas proteinu ke konkrétnímu místu v DNA, kde má dojít k úpravě (Chemello et al. 2020).

Genová terapie pomocí systému CRISPR-Cas zahrnuje úpravu DNA za účelem korekce mutací. Systém CRISPR-Cas využívá RNA jako navigační prvek, který mutované úseky DNA zaměří a odstřihne. Jakmile je DNA rozštěpena, jsou aktivovány přirozené opravné mechanismy buňky, které odstraní nebo nahradí mutovanou sekvenci (Heinz & Mashreghi 2017). CRISPR-Cas může být účinně využit *in vivo* i *ex vivo*. Pro úspěšnou implementaci této technologie je klíčové efektivní doručení do cílových buněk, což lze realizovat pomocí virových či nevirálních vektorů nebo využitím fyzikálních metod. Díky své vysoké účinnosti a jednoduchosti se CRISPR-Cas systém stal jednou z nejoblíbenějších technologií pro úpravu genů (Huang et al. 2022).

CRISPR-Cas lze rozdělit do dvou hlavních kategorií. První kategorie využívá pro rozštěpení nukleové kyseliny složité komplexy proteinů, ale v genovém inženýrství u eukaryot se tento způsob příliš nepoužívá kvůli složitosti expresních mechanismů. Naopak, druhá kategorie k tomuto účelu využívá jediný protein, jako je Cas9, Cas12, Cas13 nebo Cas14 (Makarova et al. 2015).

6.5.1 CRISPR-Cas9 v genové terapii

CRISPR-Cas9 je momentálně nejvýkonnějším nástrojem pro úpravu genů (Huang et al. 2022). Jeho funkce spočívá v dodání enzymu Cas9 a specifické RNA (sgRNA) do cílových buněk. SgRNA, složená z crRNA a tracrRNA, navádí enzym Cas9 k cílové sekvenci. Po navázání Cas9 a sgRNA na cílovou sekvenci dochází ke štěpení DNA a vzniku zlomu. Buňka pak opraví zlom za pomoci přirozených opravných systémů jako je NHEJ (non-homologous end joining) nebo HDR (homology-directed repair). Výhodou HDR je, že využívá homologní oblast DNA jako předlohu a nedochází tak k nepřesným opravám a ztrátě funkce genu. Tato technologie umožňuje efektivní, přesnou a flexibilní úpravu genů u mnoha typů buněk a organismů (Heinz & Mashreghi 2017).

6.5.2 Rizika CRISPR-Cas

Přestože se systémy CRISPR stále vyvíjí a jsou využívány v léčbě mnoha genetických onemocnění, jedná se stále o rané stádium vývoje. Spolu s pozitivou přináší tato technologie i mnoho překážek, které ovlivňují její účinnost a bezpečnost přenosu. Hlavním problémem metody CRISPR je výskyt mimo-cílových účinků. RNA, která navádí enzym Cas9 k cílovému místu pro úpravu genu, může rozpoznat podobnou sekvenci a způsobit nechtěné změny v jiných genech. Dalším omezením je bezpečnost a efektivita přenosu CRISPR-Cas. Ačkoli jsou virové vektory efektivní v přenosu, mohou způsobit mutageneze mimo cíl a vyvolat imunitní reakce. Obdobně existují překážky i při použití nevirálních systémů (Huang et al. 2022).

Je proto důležité pečlivě vybírat metody přenosu podle konkrétního případu, neustále vyvíjet nové metody a optimalizovat stávající virové i nevirální vektory, aby bylo zaručeno jejich bezpečné a efektivní použití (Huang et al. 2022).

6.6 Genová terapie u dědičných onemocnění u psů

Genová terapie u psů vychází ze znalostí o genetickém pozadí těchto savců. Rozsáhlé studie napříč genomem umožnily lépe porozumět molekulární podstatě specifických fenotypů. Tyto znalosti byly a nadále jsou využívány v klinických studiích genové terapie, díky kterým se tento léčebný přístup neustále vyvíjí v oblasti veterinární i humánní medicíny (Switonski 2020).

6.6.1 Psi jako modelový organismus

Psi sehrávají významnou roli jako preklinické modely v oblasti genové terapie v humánní medicíně, jelikož více než 58 % genetických onemocnění diagnostikovaných u psů koreluje s chorobami, které se vyskytují v lidské populaci (Gopinath et al. 2015). Výhodou je také přístup k rozsáhlým rodokmenům, které umožňují sledování jednotlivých generací (Switonski 2020). Tyto modelové organismy slouží především k pečlivému posouzení bezpečnosti, účinnosti a dávkování vektorů (Gopinath et al. 2015).

První úspěchy v genové terapii u psů pro monogenní onemocnění byly zaznamenány v polovině 90. let dvacátého století. V Tabulce 8 je přehled prvních úspěšných terapií u vybraných chorob psů (Switonski 2020).

Rok	Onemocnění	Gen	Vektor
1993	hemofilie B	<i>F9</i>	retrovirus
1996	hemofilie A	<i>F8</i>	adenovirus
1998	svalová dystrofie	<i>DMD</i>	adenovirus
2012	X-vázaná progresivní retinální atrofie	<i>RPGR</i>	adenoasociovaný virus

Tabulka 8: První úspěšné genové terapie pro vybraná onemocnění psů (Switonski 2020).

6.6.2 Úspěšné korekce hemofilie A pomocí genové terapie

První úspěch genové terapie u hemofilie A byl zaznamenán v roce 1996. Korekce byla provedena pomocí rekombinantního adenovirového vektoru Av1ALAPH81, který obsahoval lidskou cDNA BDD FVIII, což je zkrácená verze faktoru VIII, která obsahuje pouze funkční domény A a C. Vektor byl aplikován intravenózně do hlavové žíly psů (Connelly et al. 1996).

Parametry hemokoagulace, jako je aktivovaný koagulační čas (ACT) a aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), byly vyhodnoceny před aplikací vektoru a sledovány několik dní poté. Během dvou dnů po aplikaci vektoru došlo k normalizaci těchto parametrů, avšak do 7. dne se vrátily do původních hodnot (Connelly et al. 1996). K posouzení hemokoagulace slouží také test CBT (*Cuticle bleeding time*), při kterém se provádí malý řez kutikulou nehtu psa. U zdravých psů by se mělo krvácení zastavit do 8 minut. Ačkoli se občas může prodloužit až na 12 minut, po zastavení krvácení by již nemělo docházet k jeho opětovnému spuštění. U hemofilických psů je trvání krvácení prodlouženo až na 20 minut. U některých jedinců může dojít k předčasnému zastavení krvácení, avšak se jedná pouze o dočasný stav (Giles et al. 1982). V rámci této studie CBT přesahoval před podáním vektoru 20 minut, po podání vektoru se do 2 dnů snížil na 2 minuty, poté se ustálil na 7,5 minut, což je normální hodnota (Connelly et al. 1996).

Analýza biologické aktivity FVIII ukázala zvýšení aktivity od 1. do 5. dne po podání vektoru, avšak poté se aktivita snížila pod hranici detekce. Úspěšnou korekci fenotypu naznačily výsledky z analýzy přítomnosti lidského FVIII antigenu v plazmě. Pro další posouzení exprese genu *F8* byly provedeny biopsie jater a sleziny. V těchto tkáních byla detekována DNA, která před léčbou nebyla přítomna. Omezená doba exprese lidského FVIII u hemofilního psa byla způsobena částečně vývojem protilátek proti lidskému proteinu. Tento pes bohužel nepřežil chirurgickou biopsii a zemřel na komplikace (Connelly et al. 1996).

S cílem minimalizovat imunitní odpověď na lidský FVIII byl druhý pes imunosuprimován cyklofosfamidem a prednisonem před a po aplikaci vektoru. I přesto, že se navýšila aktivita faktoru, plazmatické hodnoty FVIII byly nižší. Imunosupresivní léčba nezabránila vzniku imunitní odpovědi, a tím pádem neprodloužila dobu exprese (Connelly et al. 1996).

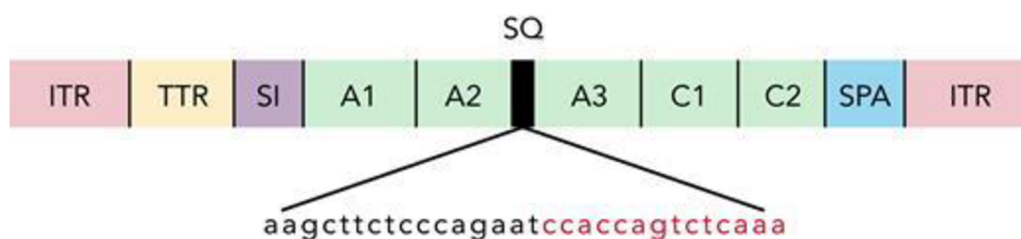
Studie prokázala korekci hemofilie A, avšak fenotypová korekce byla časově omezena imunitní odpovědí na lidský protein FVIII. Rychlý vývoj protilátek byl očekávaný, protože lidský FVIII je vysoce imunogenní při intravenózním podání u psů. Pokus o blokování aktivity protilátek významně neprodloužil dobu fenotypové korekce (Connelly et al. 1996).

Ve výzkumu zaměřeném na posouzení dlouhodobé účinnosti a bezpečnosti adenoasociovaného vektoru v léčbě hemofilie A byl AAV obsahující psí *F8* gen aplikován devíti postiženým psům. Infuze vektoru do organismu byla provedena dvěma způsoby, buď s oběma řetězci *F8* nebo s jedním řetězcem. Následně byli ošetření jedinci sledováni po dobu deseti let (Nguyen et al. 2021).

Během studie byly u všech psů udržovány stabilní hladiny aktivního psího FVIII, což vedlo ke snížení spontánních krvácení. U dvou psů byly zaznamenány zvyšující se hladiny FVIII čtyři roky po léčbě. Po ukončení studie byla provedena analýza jaterní tkáně, která odhalila nekontrolovatelné šíření transdukovaných jaterních buněk u pěti psů, což naznačovalo začlenění vektoru do genomu. U žádného psa nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky ani důkazy o tvorbě maligních buněk (Nguyen et al. 2021).

Stabilní exprese a korekce hemofilie byla pozorována u osmi psů, kterým byly aplikovány vektory AAV2 (n = 4), AAV6 (n = 3) a AAV8 (n = 1), obsahující BDD (B-domain-deleted) cFVIII, do portální žíly. Čísla 2, 6 a 8 za zkratkou AAV označují jednotlivé sérotypy, tedy různé varianty adenoasociovaného viru, čísla 4, 3 a 1 v závorkách určují počet psů, u kterých byl daný sérotyp použit. Konstrukce vektoru (Obrázek 16) zahrnovala promotor transthyretinu, syntetický intron, cDNA faktoru VIII s odstraněnou B doménou a syntetickou polyadenylační sekvenci (Batty et al. 2022).

Infúze AVV byla obecně tolerována, avšak u jednoho psa došlo k tachykardii, hypertenzi a otoku obličeje. Stabilní exprese FVIII byla pozorována po dobu více než 10let u 6 jedinců, což u nich vedlo k potlačení klinických příznaků a snížení krvácení. Počet spontánních krvácení se snížil z hodnoty 5,4 na hodnotu 0,6 za rok. U dvou psů nedošlo k reakci na terapii a dostatečné expresi faktoru z nejasných příčin, avšak i u těchto psů došlo ke zlepšení koagulačních testů a snížení krvácení. Snížení celkového koagulačního času z hodnot 15,4 na 5,6 minut bylo pozorováno u psů s odpovědí na vektor i bez odpovědi. Postmortální vyšetření provedené u všech psů nepotvrdilo žádné známky zánětu parenchymu jater ani poškození jaterních buněk. Ve všech jaterních vzorcích byla pomocí PCR detekovatelná cFVIII DNA, která nebyla detekována v ostatních orgánech, což potvrzuje, že zdrojem produkce faktoru byla výhradně játra. Trvalá exprese trvající přes 10 let a korekce fenotypu hemofilie potvrzují dlouhodobou účinnost a také bezpečnost AAV zprostředkované terapie (Batty et al. 2022).



Obrázek 16: Struktura vektoru AAV-cFVIII-BDD. Zahrnuje inverzní terminální repetice (ITR), syntetický intron (SI), syntetickou polyadenylaci (SPA), promotor (TTR) (Batty et al. 2022).

6.6.3 Úspěšné korekce hemofilie B pomocí genové terapie

Průlom v oblasti genové terapie u hemofilie B přišel s první úspěšnou terapií v roce 1993. Cílovým orgánem pro léčbu hemofilie B jsou játra, která produkují koagulační faktor IX, který je řízena genem *F9*. V rámci studie byla pro přenos genů do jaterní tkáně *in vivo* metoda prostřednictvím přímé infuze rekombinantních retrovirových vektorů do portálního krevního oběhu. Terapie byla testována na čtyřech psech, u nichž došlo k missense mutaci, která vedla k absenci antigenu v plazmě. U těchto modelových zvířat byla provedena částečná hepatektomie (odstranění jater), po které následovala infuze retroviru LX-cFIX v různých časových intervalech (Kay et al. 1993).

Koncentrace FIX v plazmě těchto psů byly sledovány pomocí biologických a imunologických testů. Kromě toho byly monitorovány hemostatické parametry, jako je celkový koagulační čas (WBCT) a parciální tromboplastinový čas (PTT). Výsledky ukázaly, že u prvního psa došlo k významnému zvýšení plazmatické hladiny FIX, která byla udržována na stabilní úrovni po dobu více než 5 měsíců. Tento jedinec také vykazoval zkrácení WBCT po dobu léčby ve srovnání s neléčenými jedinci. PTT u druhého a třetího psa byl také významně zkrácen. Čtvrté zvíře uhynulo v důsledku chirurgické komplikace a nebylo zařazeno do testování (Kay et al. 1993).

Výzkum potvrdil účinnost přenosu genů touto metodou, avšak uvádí nutnost zdokonalení postupů, tak aby bylo dosaženo vyšších hladin faktoru (Kay et al. 1993).

V rámci studie zaměřené na testování imunitních reakcí na transgen byl aplikován AAV-cFIX-Padua obsahující geny pro psí a lidský faktor IX. Vektor spolu s FIX byl injikován do žíly na zadní končetině třem psům, kteří vykazovali vysoké riziko tvorby protilátek (Crudele et al. 2015).

Během tříletého pozorování nebyly zjištěny žádné toxické účinky. Pozorována byla úplná normalizace WBCT, který u hemofilických zvířat může překročit 45 minut, zatímco u zdravých jedinců se pohybuje okolo 8 minut. Také došlo k vymizení spontánních krvácení. V průběhu studie byly pozorovány imunitní reakce na aplikaci AAV-cFIX-Padua. U jednoho psa byly zaznamenány výraznější zánětlivé cytokiny, které se během 800 dnů zlepšily, a ukázala se snižující tendence. Důležitým faktorem pro dosažení dlouhodobého účinku bylo dosažení imunitní tolerance k faktoru IX. Tyto výsledky potvrzují bezpečnost a efektivitu jaterní exprese cFIX pomocí AAV a rozšiřují možnosti genové terapie u pacientů náchylných k tvorbě inhibitorů (Crudele et al. 2015).

Cílem následující studie bylo posoudit bezpečnost a účinnost léčby hemofilie B pomocí lentivirové genové terapie. Pro tento účel byly vyrobeny tři lentivirové vektory. První vektor obsahoval modifikovanou dlouhou terminální opakovaní, která zabraňovala replikaci vektoru v hostitelské buňce. Druhý vektor obsahoval cDNA transgeny pro faktor IX pod kontrolou hepatocyt-specifického promotéru, což umožnilo expresi faktoru IX primárně v jaterních buňkách. Poslední vektor nesl čtyři tandemové repetice pro regulaci a optimalizaci exprese faktoru IX. Vektory byly aplikovány třem psům do portální žíly (Cantore et al. 2015).

Infúze prvního psa byla dobře tolerována s výjimkou krátkodobého zvýšení tělesné teploty o 1 °C. Druhý pes zažil akutní hypotenzi během infúze, která byla přičítána anafylaktoidní reakci na neznámou složku vektoru. Na základě těchto skutečností byl třetí pes před podáním vektoru podroben léčbě kortikosteroidy a antihistaminiky, po čemž nedošlo k žádným změnám krevního tlaku ani teploty. U prvních dvou psů došlo po infúzi k mírné hepatocelulární toxicitě, a u všech jedinců byla zvýšená koncentrace zánětlivých cytokinů (Cantore et al. 2015).

Všichni tři psi byli sledováni po dobu 5 let. Doba krevní koagulace se zkrátila a zůstala stabilní v rozmezí 15 až 20 minut, avšak nedosáhla normálních hodnot. U všech jedinců došlo ke zvýšení aktivity faktoru IX a nebyly zjištěny žádné protilátky proti tomuto faktoru. Celkově došlo ke zlepšení klinických příznaků u tří hemofilních psů, u kterých během sledování došlo ke snížení spontánních krvácení a zvýšení hladin srážecího faktoru. Lentivirus nebyl detekovatelný v krvi a spermích, což naznačuje dlouhodobou perzistenci LV v jaterních buňkách. Dlouhodobá toxicita nebyla potvrzena a genová terapie poskytla stabilní dlouhodobou korekci hemofilie (Cantore et al. 2015).

6.6.4 Úspěšné korekce X-vázané progresivní retinální atrofie pomocí genové terapie

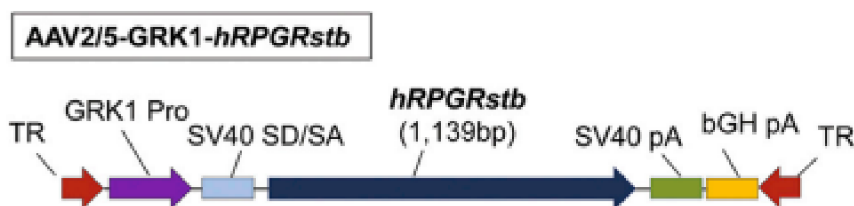
První úspěšný pokus o léčbu XLRA pomocí genové terapie byl zdokumentován v roce 2012. Terapie XLRA spočívala v aplikaci subretinální injekce adenovirového vektoru obsahujícího lidský gen *RPGR*, jehož exprese byla řízena promotory hIRBP a hGRK1, s cílem obnovit strukturu a funkci fotoreceptorů (Beltran et al. 2012).

U XLRA1 zabránila terapie aplikovaná před nástupem onemocnění jeho vzniku. Ošetření XLRA2 po nástupu onemocnění, kdy probíhal úhyn fotoreceptorových buněk, zastavilo progresi onemocnění a obnovilo morfologii zbývajících fotoreceptorů. Změny zasahující do citlivých oblastí byly vráceny do normálu, zejména při použití vektoru AAV2/5-hIRPB-*hRPGR*. Expresní aktivita terapeutického genu byla robustní v obou typech buněk, a to zejména díky použití promotoru hIRBP, který reguluje expresi terapeutického genu a udržuje ji na stabilní úrovni (Beltran et al. 2012).

Subretinální terapie provedená u psů s XLRA za pomoci vektoru AAV2/5 a lidské RPGRORF15 cDNA byla účinná při zachování struktury a funkce fotoreceptorů. Účinnost terapie byla ještě větší, když byl terapeutický transgen řízen promotorem hIRBP. Pro zkoumaná stádia onemocnění se tento terapeutický postup ukázal jako velmi účinný (Beltran et al. 2012).

Během studie, která měla za cíl optimalizovat terapeutický AAV pro klinické využití, byl subretinálně aplikován vektor AAV2/5-GRK1-*hRPGRstb* (Obrázek 17) do čtyř postižených očí psů s raným stádiem onemocnění (věk 5 týdnů). Po dvou letech byla provedena topografická analýza, která odhalila zachovanou tloušťku vnější jaderné vrstvy (ONL), která obsahuje jádra fotoreceptorů, na rozdíl od neošetřených oblastí, které vykazovaly redukci tloušťky ONL, což odpovídá přirozenému vývoji onemocnění. V další fázi studie bylo dvanáct očí psů ve středním stádiu onemocnění (věk 12 týdnů) ošetřeno buď kontrolním solným roztokem, nebo vektory s různými koncentracemi léčivého prvku. Oblasti injikované vektory projevovaly téměř zachovanou tloušťku ONL.

Oči ošetřené roztokem nevykazovaly žádné rozdíly v tloušťce ONL ve srovnání s neošetřenými oblastmi, naopak u nich byla pozorována redukce (Beltran et al. 2017).



Obrázek 17: Struktura vektoru AAV2/5-GRK1-*hRPGRstb*. Zahrnuje terminální repetice (TR), promotor (GRK1), donorový/akceptorový prvek pro splicing viru Simian 40 (SV40 SD/SA), polyadenylační signál Simian viru 40 (SV40 pA) a polyadenylační signál růstového hormonu skotu (bGH pA) (Beltran et al. 2017).

Výsledky naznačují, že vektor AAV nesoucí stabilizovanou lidskou cDNA *RPGR* pod kontrolou promotéru GRK1 vykazuje dlouhodobější účinnost léčby XLPRA u modelového organismu a naznačuje potenciál pro využití v léčbě RP u lidí (Beltran et al. 2017).

Následující studie sloužila k zhodnocení toxicity a účinnosti vektoru AGTC-501, který byl vyroben pomocí rekombinantního viru herpes simplex v kultivovaných buňkách ledvin křečka. Celkem šestnáct psů s diagnózou XLPRA2 ve věku okolo 6týdnů bylo rozděleno do tří skupin a ošetřeno subretinální injekcí vektoru rAAV2tYF-GRK1-*hRPGRco* (AGTC-501) do pravého oka. Každá skupina obdržela určitý objem dávky a následně byla pozorována po dobu 20 – 21týdnů. Kontrolní skupině byl injektován pouze nosič. Během celého průběhu studie byl sledován celkový zdravotní stav a provedena různá vyšetření jako oftalmoskopie, OCT, elektroretinografie, histopatologie a imunologie. Ke konci sledování byla všechna zvířata obětována, konkrétně vykřvena pod celkovou anestézií indukovanou nízkou dávkou eutanázie. Po vykřvení zvířat byla eutanázie dokončena. Kadávery psů byly podrobeny patologickému vyšetření a tkáně určené k analýze PCR, s výjimkou mozku, byly zmrazeny v tekutém dusíku (Dufour et al. 2020).

Na konci studie vykazovali všichni psi dobrý tělesný stav. Výsledky z OCT a elektroretinografie potvrdily zachování struktury a funkce fotoreceptorů ve všech skupinách léčených různými objemy dávky. Pozorováno bylo patrné zlepšení vizuálního vnímání a reakcí na světelné stimuly. U zvířat léčených vysokou dávkou byly zaznamenány příznaky zánětu sítnice a hlavy zrakového nervu v ošetřeném oku a u jednoho jedince došlo k zániku sítnice. Histologické vyšetření dále prokázalo zachování struktury v retinálních vrstvách. Výše uvedené výsledky naznačují potenciál genové terapie v léčbě onemocnění sítnice a navádí k dalším studiím (Dufour et al. 2020).

6.6.5 Úspěšné korekce svalové dystrofie pomocí genové terapie

První úspěšná genová terapie v rámci svalové dystrofie byla provedena v roce 1998. Výzkumná skupina zahrnovala osm třítydenních štěňat, z nichž tři byla postižená a pět bylo zdravých či přenašečů. Štěňata byla rozdělena do dvou skupin po čtyřech, kdy neimunosuprimovaná kontrolní skupina obsahovala jedno postižené štěně a imunosuprimovaná skupina dvě postižená štěňata. Imunosuprese byla dosažena pravidelným podáváním cyklosporinu (Howell et al. 1998).

Všechna štěňata obdržela intramuskulární injekce adenovirových vektorů obsahujících buď lidský dystrofinový minigen nebo kasetu exprese β -galaktosidázy. Svalové biopsie byly provedeny 10 a 60 dní po aplikování adenovirového vektoru. U všech psů byl přenesený lidský dystrofin snadno detekován. Po deseti dnech bylo pozorováno vysoké zastoupení svalových vláken v obou skupinách. Avšak po 60 dnech došlo k poklesu exprese terapeutického genu na hodnoty před aplikováním vektoru u psů, kteří nebyli imunosuprimováni. Naopak, vysoká exprese dystrofinu setrvala ve svalovině psů léčených cyklosporinem, ačkoli určité snížení exprese proteinu bylo zaznamenáno. Humorální odpověď proti transgenům byla pozorována u všech psů. U žádného z imunosuprimovaných psů nebyla zjištěna specifická protilátková reakce proti lidskému dystrofinu. Naopak silná imunoreaktivita proti lidskému dystrofinu byla zjištěna v sérech všech imunokompetentních psů (Howell et al. 1998).

Tato studie, představující první případ přenosu velkého množství dystrofinového minigenu do svaloviny psů, ukazuje, že úroveň exprese dystrofinu v kosterní svalovině může být u postižených jedinců dosažena pomocí genového přenosu, i když je nutná imunosuprese pro dosažení dlouhodobějšího efektu (Howell et al. 1998).

Studie, která se zaměřila na editaci genu s cílem obnovit expresi dystrofinu u psů, zkoumala možnost opravy genetického defektu způsobeného ztrátou exonu 50 a vynecháním exonu 51. K opravě čtecího rámce využila *Streptococcus pyogenes* Cas9 enzym spárovaný s jednovodičkovou RNA (sgRNA), která byla navržena tak, aby zaměřila oblast sousedící s akceptorovým místem exonu 51. K zavedení komponent CRISPR byl použit rekombinantní adenoasociovaný virus (AAV9), který byl aplikován intramuskulární injekcí do holenního svalu. Pro posouzení účinnosti genové terapie byla provedena histologie svalů 6 týdnů po aplikaci. Výsledky imunohistochemie (Obrázek 18) prokázaly expresi dystrofinu různé intenzity. Dále bylo potvrzeno obnovení svalového dystrofinu v ošetřené kosterní svalovině, ale také neošetřené, což je přisuzováno úniku vektoru do krevního oběhu. Svalová tkáň se jevila normalizovaná, s redukováným počtem nekrotických vláken (Amoasii et al. 2018).



Obrázek 18: Imunohistochemie dystrofinu – kontrolní (vlevo), neošetřený (uprostřed), ošetřený (vpravo) (Amoasii et al. 2018).

Na základě kladných výsledků byla provedena intravenózní aplikace vektoru, která vedla k expresi dystrofinu v různých typech svalů včetně srdce. Stejně jako u intramuskulární injekce došlo k obnovení dystrofinu a normalizaci svalové tkáně. Ačkoli výsledky studie naznačují účinnost této metody, je nutné uvést, že metoda CRISPR nese rizika v podobě vložených mutagenéz (Amoasii et al. 2018).

Úspěšnost metody CRISPR potvrdila i následující studie vedená výzkumníky z texaské univerzity, kteří systém CRISPR využili v léčbě DMD u plemene bígl. Hlavním cílem studie bylo zhodnotit účinnost terapeutického přístupu u velkého zvířete před rozšířením na delší a podrobnější experimenty s větším počtem psů, které by mohly vést k následnému zahájení klinických studií na lidech. Výzkum byl proveden pouze na 4 psech, u kterých byla DNA cíleně poškozena pomocí CRISPR. Tento zásah v místě mutace měl za cíl umožnit opětovnou produkci svalového proteinu dystrofinu. Přestože došlo k obnovení produkce dystrofinu v kritických svalových tkáních těla, u zvířat nebylo pozorováno zlepšení svalové funkce. Autoři rovněž doporučují provedení rozsáhlejších experimentů pro ověření bezpečnosti a efektivnosti metody (Cohen 2018).

6.7 Překážky v genové terapii

Genová terapie čelí několika překážkám, které ovlivňují její bezpečnost a účinnost. Jeden z problémů genové terapie představuje její krátkodobý charakter, který brání dosažení dlouhodobých terapeutických účinků. Účinnost genové terapie je omezena reakcí na cizí prvky v organismu, které stimulují imunitní systém. Určité problémy s sebou nesou i virové vektory, a patří mezi ně toxicita, reakce imunitního systému či zánětlivé reakce. Zároveň existuje šance, že se virový vektor v organismu opět stane nositelem nemoci. Integrace vektoru na nesprávném místě v genomu může vést k tvorbě rakovinotvorných buněk (Ugwu et al. 2019).

Etické aspekty experimentů na zvířatech reflektují otázky týkající se welfare. Na jedné straně se nacházejí výzkumníci, kteří experimenty obhajují s odůvodněním, že takový postup slouží k rozšíření vědeckých poznatků ve prospěch humánní medicíny. Na druhé straně stojí aktivisté za práva zvířat, kteří vědecké výzkumy na zvířatech považují za kruté aktivity, jež způsobují bolest a utrpení (Hansen & Kosberg 2019).

Již nějakou dobu existují zákony a předpisy, které mají za úkol chránit zájmy zvířat. Jedním z těchto zákonů je Animal Welfare Act (AWA), který stanovuje minimální požadavky na péči o určité druhy zvířat využívaných v laboratořích, jako je zajištění vody, potravy a útočiště. Nicméně tento zákon nedokáže plně pokrýt ochranu zvířete a jeho dodržování nemusí nutně znamenat, že zvíře netrpí (Kenehan 2019).

Využívání zvířat pro vědecké účely je řízeno příslušnými směrnicemi a musí být v souladu s principy pravidel 3R (Replacement, Reduction, Refinement). Experimentální protokoly podléhají schválení etickým výborem a příslušnými orgány. Principy 3R zajišťují, že psi jsou využíváni pouze ve finálních preklinických fázích, že jsou využívány moderní neinvazivní metody, a že jsou dodržovány podmínky chovu a péče o zdraví zvířat. Překonání všech překážek je klíčové pro posun vpřed a vyžaduje komplexní úsilí vědců, kteří cílí nejen na medicínské pokroky, ale také na bezpečnost a etický přístup této inovativní léčby (Barthélémy et al. 2019).

7 Závěr

Genová terapie, jejíž výzkum započal již v minulém století, představuje nadějnou strategii pro léčbu dědičných onemocnění a stavů, pro které neexistují žádné jiné léčebné možnosti. Tato inovativní metoda nabízí možnost opravy nebo nahrazení nefunkčních genů zodpovědných za projevy nemoci. Pro modifikaci genů jsou využívány vektory, které jsou rozděleny do dvou hlavních skupin – virové a neviróvé.

Virové vektory, mezi které patří adenoasociovaný virus nebo retrovirus, jsou primárně využívány díky své vysoké efektivitě přenosu. Mezi nejvyužívanější vektory patří AAV, které jsou populární pro svou nízkou imunogenicitu a schopnost udržovat dlouhodobou expresi transgenů. Přesto s sebou všechny virové vektory nesou i určitá omezení, jako je potenciální imunogenicitu a riziko vložení mutageny. Nevirové vektory, kam patří tzv. „naked“ DNA, představují další možnost pro přenos genů. Tyto vektory, využívající fyzikálních či chemických procesů, jsou méně imunogenní a mají nižší riziko mutageny ve srovnání s virovými vektory, ale zároveň jsou méně efektivní při expresi transgenů uvnitř buněk. Pro zvládnutí překážek a zvýšení bezpečnosti a účinnosti genové terapie se vyvíjejí hybridní vektory, které kombinují výhody různých virových, ale i neviróvých vektorů. Je důležité poznamenat, že volba vhodného vektoru závisí na specifickém onemocnění a požadovaném terapeutickém výsledku.

Současně se vyvíjí systém CRISPR-Cas9, který vychází z přirozeného imunitního systému bakterií. Systém CRISPR umožňuje přesné zaměření a editaci DNA, která následně aktivuje přirozené opravné mechanismy buňky pro korekci mutace. CRISPR-Cas9 prokázal schopnost opravy mutace v genu *DMD*, nicméně i tento systém s sebou nese riziko nechtěných genetických změn v důsledku vložení mutageny.

Studie genové terapie u psů, díky genetickým podobnostem s lidmi, slouží především jako modelové studie pro lidská dědičná onemocnění. Vybrané studie potvrzují účinnost genové terapie u vybraných dědičných onemocnění vázaných na X chromozom u psů. V případě hemofilie A byla úspěšně korigována nedostatečnost faktoru VIII prostřednictvím aplikace AAV nebo Ad vektoru, což vedlo k prokazatelnému zvýšení aktivity FVIII. U hemofilie B bylo dosaženo navýšení aktivity faktoru IX a zkrácení času srážlivosti krve díky genové terapii pomocí retroviru a adenoasociovaného viru. V léčbě hemofilie typu B byla genová terapie rovněž účinná a přinesla dlouhodobé pozitivní výsledky pro postižené psy, přičemž nedošlo k toxickým účinkům. Progresivní retinální atrofie byla léčena obnovením funkce fotoreceptorových buněk sítnice prostřednictvím adenoasociovaných virových vektorů s lidskými promotory. Studie poukázaly na rizika zánětů sítnice a hlavového nervu při podání vysokých dávek vektoru, avšak obecně potvrdily zlepšení zrakového vnímání a reakcí na světelné stimuly. První úspěšná korekce fenotypu svalové dystrofie u psů byla dosažena pomocí adenoviru k dodání funkční kopie genu *DMD*. Trvalá exprese proteinu dystrofinu v kosterní svalovině byla sledována u uměle imunosuprimovaných psů. Tento fakt naznačuje potřebu zaměřit se na možnost imunitní reakce organismu na virový vektor. Využívanou metodou v obnově exprese proteinu dystrofinu je také systém CRISPR-Cas9, jehož úspěšnost byla potvrzena u série studií.

Závěrem lze konstatovat, že genová terapie představuje slibnou naději pro léčbu dědičných onemocnění u psů, ačkoli stále zůstává nutné vyřešit otázky týkající se bezpečnosti, dlouhodobého účinku a etických aspektů preklinických studií u zvířat. Současný výzkum a klinické studie naznačují optimistickou budoucnost, kde by genová terapie mohla hrát klíčovou roli při záchraně nebo výrazném zlepšení životů postižených zvířat. Studie na psích modelech navíc pomáhají rozvoji genové terapie v humánní medicíně. Pro dosažení všech cílů je nezbytný další výzkum zaměřený na zdokonalení metod doručování terapeutických genů a minimalizaci potenciálních rizik.

8 Seznam literatury

Ahn AH, Kunkel LM. 1993. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genetics* **3**:283-291.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell*. Garland, New York.

Al-Dosari MS, Gao X. 2009. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *The AAPS Journal* **11**:671-681.

Amoasii L et al. 2018. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* **362**:86-91.

AnimaLabs. ©2016. Dog Genetics – Introduction to Modes of Inheritance. Available from <https://www.animalabs.com/dog-genetics-inheritance-modes/> (accessed November 2023).

Aslanian ME, Sharp CR, Rozanski EA, de Laforcade AM, Rishniw M, Brooks MB. 2014. Clinical outcome after diagnosis of hemophilia A in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **245**:677-683.

Barr JW, McMichael M. 2012. Inherited Disorders of Hemostasis in Dogs and Cats. *Topics in Companion Animal Medicine* **27**:53-58.

Barthélémy I, Hitte C, Tiret L. 2019. The Dog Model in the Spotlight: Legacy of a Trustful Cooperation. *Journal of Neuromuscular Diseases* **6**:421-451.

Batty P et al. 2022. Long-term follow-up of liver-directed, adeno-associated vector-mediated gene therapy in the canine model of hemophilia A. *Blood* **140**:2672-2683.

Beltran WA et al. 2012. Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**:2132-2137.

Beltran WA et al. 2017. Optimization of Retinal Gene Therapy for X-Linked Retinitis Pigmentosa Due to RPGR Mutations. *Molecular Therapy* **25**:1866-1880.

Beránek M. 2016. *Molekulární genetiky pro bioanalytiky*. Karolinum, Praha.

Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merskey C, O'Brien JR. 1952. Christmas Disease. *BMJ* **2**:1378-1382.

BREENLab@NCSU. ©2022. CANINE KARYOTYPE. Available from <https://www.breenlab.org/canine-karyotype/> (accessed July 2023).

Breen M. 2008. Canine cytogenetics – from band to basepair. *Cytogenetic and Genome Research* **120**:50-60.

Brooks M. 1999. A review of canine inherited bleeding disorders: biochemical and molecular strategies for disease characterization and carrier detection. *Journal of Heredity* **90**:112-118.

- Brooks MB, Gu W, Ray K. 1997. Complete deletion of factor IX gene and inhibition of factor IX activity in a Labrador Retriever with hemophilia B. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **211**:1418-1421.
- Cantore A et al. 2015. Liver-directed lentiviral gene therapy in a dog model of hemophilia B. *Science Translational Medicine* **7** DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa1405.
- Chemello F, Bassel-Duby R, Olson EN. 2020. Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing. *Journal of Clinical Investigation* **130**:2766-2776.
- Cohen J. 2018. In dogs, CRISPR fixes a muscular dystrophy. *Science* **361**:835-835.
- Connelly S, Mount J, Mauser A, Gardner JM, Kaleko M, McClelland A, Lothrop CDJ. 1996. Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood* **88**:3846-3853.
- Cooper BJ et al. 1988. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* **334**:154-156.
- Crudele JM, Finn JD, Siner JL, Martin NB, Niemeyer GP, Zhou S, Mingozi F, Lothrop CD, Arruda VR. 2015. AAV liver expression of FIX-Padua prevents and eradicates FIX inhibitor without increasing thrombogenicity in hemophilia B dogs and mice. *Blood* **125**:1553-1561.
- Doehmer J, Barinaga M, Vale W, Rosenfeld MG, Verma IM, Evans RM. 1982. Introduction of rat growth hormone gene into mouse fibroblasts via a retroviral DNA vector: expression and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**:2268-2272.
- Doudna JA, Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**. DOI: 10.1126/science.1258096.
- Downs LM, Bell JS, Freeman J, Hartley C, Hayward LJ, Mellersh CS. 2013. Late-onset progressive retinal atrophy in the Gordon and Irish Setter breeds is associated with a frameshift mutation in C2orf71. *Animal Genetics* **44**:169-177.
- Duan D, Goemans N, Takeda S, Mercuri E, Aartsma-Rus A. 2021. Duchenne muscular dystrophy. *Nature Reviews Disease Primers* **7**:13 DOI: 10.1038/s41572-021-00248-3.
- Dufour VL et al. 2020. Toxicity and Efficacy Evaluation of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Codon-Optimized RPGR Delivered by Subretinal Injection in a Canine Model of X-linked Retinitis Pigmentosa. *Human Gene Therapy* **31**:253-267.
- Edwards RJ et al. 2021. Chromosome-length genome assembly and structural variations of the primal Basenji dog (*Canis lupus familiaris*) genome. *BMC Genomics* **22**:188 DOI: 10.1186/s12864-021-07493-6.
- Evans JP, Brinkhous KM, Brayer GD, Reisner HM, High KA. 1989. Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**:10095-10099.
- Friedmann T. 1992. A brief history of gene therapy. *Nature Genetics* **2**:93-98.

- Galibert F, André C. 2006. The Dog Genome. *Vertebrate Genomes* **2**:46-59. KARGER, Basel.
- Galibert F, Quignon P, Hitte C, André C. 2011. Toward understanding dog evolutionary and domestication history. *Comptes Rendus Biologies* **334**:190-196.
- GENOMIA. ©2008–2024. Ceník služeb. Available from <https://www.genomia.cz/cz/cenik-sluzeb/> (accessed March 2024).
- Giles AR, Tinlin S, Greenwood R. 1982. A canine model of hemophilic (factor VIII: C deficiency) bleeding. *Blood* **60**:727-730.
- Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *The Journal of Gene Medicine* **15**:65-77.
- Gopinath C, Nathar T, Ghosh A, Hickstein D, Remington Nelson E. 2015. Contemporary Animal Models For Human Gene Therapy Applications. *Current Gene Therapy* **15**:531-540.
- Gustavsson I. 1964. THE CHROMOSOMES OF THE DOG. *Hereditas* **51**:187-189.
- Guyon R, Pearce-Kelling SE, Zeiss SJ, Acland GM, Aguirre GD. 2007. Analysis of six candidate genes as potential modifiers of disease expression in canine XLPR1, a model for human X-linked retinitis pigmentosa 3. *Mol Vis* **13**:1094-1105 PMID: 17653054.
- Hansen K, Kosberg K. 2019. Chapter 11 Ethics, Efficacy, and Decision-making in Animal Research. Pages 275-288 in *Animal Experimentation: Working towards a Paradigm Change*. Brill.
- Hansen Wheat C, van der Bijl W, Wheat CW. 2020. Morphology does not covary with predicted behavioral correlations of the domestication syndrome in dogs. *Evolution Letters* **4**:189-199.
- Havenga M, Hoogerbrugge P, Valerio D, van Es HHG. 1997. Retroviral Stem Cell Gene Therapy. *STEM CELLS* **15**:162-179.
- Heinz GA, Mashreghi MF. 2017. CRISPR-Cas-System als molekulare Schere für Gentherapie. *Zeitschrift für Rheumatologie* **76**:46-49.
- High KA, Roncarolo MG. 2019. Gene Therapy. *New England Journal of Medicine* **381**:455-464.
- Howell JM, Lochmüller H, O'Hara A, Fletcher S, Kakulas BA, Massie B, Nalbantoglu J, Karpati G. 1998. High-Level Dystrophin Expression after Adenovirus-Mediated Dystrophin Minigene Transfer to Skeletal Muscle of Dystrophic Dogs: Prolongation of Expression with Immunosuppression. *Human Gene Therapy* **9**:629-634.
- Hruban V, Majzlík I. 2007. *Obecná genetika*. 3. dotisk 1. vydání z roku 2002. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Huang J, Zhou Y, Li J, Lu A, Liang C. 2022. CRISPR/Cas systems: Delivery and application in gene therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **10** DOI: 10.3389/fbioe.2022.942325.

- Huang S, Kamihira M. 2013. Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnology Advances* **31**:208-223.
- Hytonen MK et al. 2009. Ancestral T-Box Mutation Is Present in Many, but Not All, Short-Tailed Dog Breeds. *Journal of Heredity* **100**:236-240.
- Indrebø A, Langeland M, Juul HM, Skogmo HK, Rengmark AH, Lingaas F. 2008. A study of inherited short tail and taillessness in Pembroke Welsh corgi. *Journal of Small Animal Practice* **49**:220-224.
- Kao FT, Puck TT. 1968. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **60**:1275-1281.
- Kay MA et al. 1993. In Vivo Gene Therapy of Hemophilia B: Sustained Partial Correction in Factor IX-Deficient Dogs. *Science* **262**:117-119.
- Kelewala DN, Patil DB, Parikh PV, Sneth MJ, Joshi CG, Reddy B. 2017. Clinical studies on progressive retinal atrophy in 31 dogs. *Iran J Vet Res* **18**:119–123 PMID: 28775752.
- Kenehan S. 2019. Chapter 8 The Moral Status of Animal Research Subjects in Industry: A Stakeholder Analysis: A Stakeholder Analysis. Pages 209-223 in *Animal Experimentation: Working towards a Paradigm Change*. Brill.
- Kim JH, Noh DH, Song RH, Lee DM, Cho HS, Yu DH, Park JH, Park C. 2011. Hemophilia B (factor IX deficiency) in a Labrador retriever dog. *Korean Journal of Veterinary Service* **34**:191-193.
- Kim KS, Lee SE, Jeong HW, Ha JH. 1998. The Complete Nucleotide Sequence of the Domestic Dog (*Canis familiaris*) Mitochondrial Genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **10**:210-220.
- King T, Marston LC, Bennett PC. 2012. Breeding dogs for beauty and behaviour: Why scientists need to do more to develop valid and reliable behaviour assessments for dogs kept as companions. *Applied Animal Behaviour Science* **137**:1-12.
- Kirkness EF et al. 2003. The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis. *Science* **301**:1898-1903.
- Kočárek E. 2008. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vydání. Scientia, Praha.
- Kornegay JN. 2017. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle* **7**:1-21.
- Kropatsch R, Akkad DA, Frank M, Rosenhagen C, Altmüller J, Nürnberg P, Epplen JT, Dekomien G. 2016. A large deletion in RPGR causes XLPR in Weimaraner dogs. *Canine Genetics and Epidemiology* **3**:7 DOI: 10.1186/s40575-016-0037-x.
- LABOKLIN Czech. 2024. Katalog cen genetiky 2024. Available from https://cz.laboklin.info/wp-content/uploads/geneticky-katalog-1_2024.pdf (accessed April 2024).

- Lindblad-Toh K et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* **438**:803-819.
- Llera R, Yuill C, Hunter T. 2023. Progressive Retinal Atrophy in Dogs. Available from <https://vcahospitals.com/know-your-pet/progressive-retinal-atrophy-in-dogs> (accessed December 2023).
- Lozier JN, Dutra A, Pak E, Zhou N, Zheng Z, Nichols TC, Bellinger DA, Read M, Morgan RA. 2002. The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**:12991-12996.
- Lozier JN, Nichols TC. 2013. Animal Models of Hemophilia and Related Bleeding Disorders. *Seminars in Hematology* **50**:175-184.
- Makarova KS et al. 2011. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **9**:467-477.
- Makarova KS et al. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **13**:722-736.
- Mauser AE, Whitlark J, Whitney KM, Lothrop CDJ. 1996. A deletion mutation causes hemophilia B in Lhasa Apso dogs. *Blood* **88**:3451-3455.
- Mazurkiewicz-Pisarek A, Płucienniczak G, Ciach T, Płucienniczak A. 2016. The factor VIII protein and its function. *Acta Biochimica Polonica* **63**:11-16 DOI: 10.18388/abp.2015_1056.
- Megaw RD, Soares DC, Wright AF. 2015. RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. *Experimental Eye Research* **138**:32-41.
- Meindl A et al. 1996. A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nature Genetics* **13**:35-42.
- Mischke R, Wilhelm C, Czwalińska A, Varvenne M, Narten K, von Depka M. 2011a. Canine haemophilia A caused by a mutation leading to a stop codon. *Veterinary Record* **169**:496-496.
- Mischke R, Kühnlein P, Kehl A, Langbein-Detsch I, Steudle F, Schmid A, Dandekar T, Czwalińska A, Müller E. 2011b. G244E in the canine factor IX gene leads to severe haemophilia B in Rhodesian Ridgebacks. *The Veterinary Journal* **187**:113-118.
- National Human Genome Research Institute. 2024. Southern Blot. Available from <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Southern-Blot> (accessed April 2024).
- Nguyen GN et al. 2021. A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells. *Nature Biotechnology* **39**:47-55.
- Nicholas FW, Tammen I, Hub SI. 2021a. Retinal atrophy, progressive X-linked, type 1 in *Canis lupus familiaris* (dog). Available from <https://www.omia.org/OMIA000831/9615/> (accessed February 2024).

Nicholas FW, Tammen I, Hub SI. 2021b. Retinal atrophy, progressive, X-linked, type 2 in *Canis lupus familiaris* (dog). Available from <https://www.omia.org/OMIA001518/9615/> (accessed February 2024).

Nicholas FW, Tammen I, Hub SI. 2023a. Haemophilia A in *Canis lupus familiaris* (dog). Available from <https://www.omia.org/OMIA000437/9615/> (accessed February 2024).

Nicholas FW, Tammen I, Hub SI. 2023b. Haemophilia B in *Canis lupus familiaris*. Available from <https://omia.org/OMIA000438/9615/> (accessed February 2024).

Nicholas FW, Tammen I, Hub SI. 2023c. Muscular dystrophy, Duchenne type in *Canis lupus familiaris* (dog). Available from <https://www.omia.org/OMIA001081/9615/> (accessed February 2024).

O'Sullivan N, Robinson R. 1988. Harlequin colour in the Great Dane dog. *Genetica* **78**:215-218.

Otová B, Mihalová R. 2012. *Základy biologie a genetiky člověka*. Karolinum, Univerzita Karlova v Praze.

Pan X, Veroniaina H, Su N, Sha K, Jiang F, Wu Z, Qi X. 2021. Applications and developments of gene therapy drug delivery systems for genetic diseases. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **16**:687-703.

Parker HG, Kim LV, Sutter NB, Carlson S, Lorentzen TD, Malek TB, Johnson GS, Defrance HB, Ostrander EA, Kruglyak L. 2004. Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog. *Science* **304**:1160-1164.

Parker HG, Ostrander EA. 2005. Canine Genomics and Genetics: Running with the Pack. *PLoS Genetics* **1**(e58) DOI: 10.1371/journal.pgen.0010058.

Parry HB. 1953. Degenerations of the Dog Retina: II. Generalized Progressive Atrophy of Hereditary Origin. *British Journal of Ophthalmology* **37**:487-502.

Pathak S. 2022. Gene therapy – Principles and applications. *Global Journal of Transfusion Medicine* **7**:3-6.

Patil PM, Chaudhari PD, Megha M, Duragkar NJ. 2012. Review article on gene therapy. *International Journal of Genetics* **4**:74-79.

Petersen-Jones S. 2005. Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases. *Journal of Small Animal Practice* **46**:371-380.

Prior TW, Bridgeman SJ. 2005. Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchenne Muscular Dystrophy. *The Journal of Molecular Diagnostics* **7**:317-326.

Pritchard DJ, Korf BR. 2021. *Základy lékařské genetiky*. 2. české vydání. Galén, Praha.

Ramamoorth M. 2015. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **9**:GE01-GE06 DOI: 10.7860/JCDR/2015/10443.5394.

Ratko TA, Cummings JP, Blebea J, Matuszewski KA. 2003. Clinical gene therapy for nonmalignant disease. *The American Journal of Medicine* **115**:560-569.

- Ray Bradley T, Roosa RA, Law LW. 1962. DNA transformation studies with mammalian cells in culture. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **60**:127-137.
- Rodríguez-Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA. 2013. Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy. *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*. InTech DOI: 10.5772/52704.
- Rubanyi GM. 2001. The future of human gene therapy. *Molecular Aspects of Medicine* **22**:113-142.
- Ruvinsky A, Sampson J. 2001. *The genetics of the dog*. CABI Publishing, New York.
- Scott JP, Fuller JL. 1965. *Dog behavior: The genetic basis*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Shelton GD. 2004. Muscular dystrophies: expanding our knowledge in companion animals. *The Veterinary Journal* **168**:6-8.
- Shelton GD, Engvall E. 2002. Muscular dystrophies and other inherited myopathies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **32**:103-124.
- Shelton GD, Minor KM, Vieira NM, Kunkel LM, Friedenber SG, Cullen JN, Guo LT, Zatz M, Mickelson JR. 2022. Tandem duplication within the DMD gene in Labrador retrievers with a mild clinical phenotype. *Neuromuscular Disorders* **32**:836-841.
- Schatzberg SJ et al. 1999. Molecular analysis of a spontaneous dystrophin 'knockout' dog. *Neuromuscular Disorders* **9**:289-295.
- Snustad DP, Simmons MJ. 2017. *Genetika. 2. aktualizované vydání*. Masarykova univerzita, Brno.
- Sorsby A, Davey JB. 1954. Ocular associations of dappling (or merling) in the coat colour of dogs. *Journal of Genetics* **52**:425-440.
- Straub V, Campbell KP. 1997. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Current Opinion in Neurology* **10**:168-175.
- Svoboda M, Senior DF, Doubek J, Klimeš J. 2000. *Nemoci psa a kočky 1. díl*. Noviko, a. s., Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat, Brno.
- Switonski M. 2020. Impact of gene therapy for canine monogenic diseases on the progress of preclinical studies. *Journal of Applied Genetics* **61**:179-186.
- Taanman JW. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* **1410**:103-123.
- Tabin CJ, Hoffmann JW, Goff SP, Weinberg RA. 1982. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Molecular and Cellular Biology* **2**:426-436.
- Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, Murtha P, Wasley LC, Kaufman RJ. 1986. A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**:5939-5942.

Ugwu GC, Egbuji JDI, Okanya LC, Omeje JN, Eyo JE. 2019. Gene Therapy, Physiological Applications, Problems And Prospects-A Review. *Animal Research International* **16**:3367-3392.

Valentine BA, Winand NJ, Pradhan D, Moise NS, de Lahunta A, Kornegay JN, Cooper BJ. 1992. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: A review. *American Journal of Medical Genetics* **42**:352-356.

Vilà C, Savolainen P, Maldonado JE, Amorim IR, Rice JE, Honeycutt RL, Crandall KA, Lundeberg J, Wayne RK. 1997. Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog. *Science* **276**:1687-1689.

Vilboux T, Chaudieu G, Jeannin P, Delattre D, Hedan B, Bourgain C, Queney G, Galibert F, Thomas A, André C. 2008. Progressive Retinal Atrophy in the Border Collie: A new XLPRA. *BMC Veterinary Research* **4**:10 DOI: 10.1186/1746-6148-4-10.

Walmsley GL et al. 2010. A Duchenne Muscular Dystrophy Gene Hot Spot Mutation in Dystrophin-Deficient Cavalier King Charles Spaniels Is Amenable to Exon 51 Skipping. *PLoS ONE* **5** (e8647) DOI: 10.1371/journal.pone.0008647.

Wilkins AS. 2020. A striking example of developmental bias in an evolutionary process: The “domestication syndrome” **22**:143-153.

Winand N, Pradhan D, Cooper. 1994. Molecular characterization of severe Duchenne-type muscular dystrophy in a family of Rottwiler dogs. In: Kornegay JN et al. 2012. Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. *Mammalian Genome* **23**:85-108.

Wolfe JH. 2009. Gene Therapy in Large Animal Models of Human Genetic Diseases. *ILAR Journal* **50**:107-111.

Zhang Q, Acland GM, Wu WX, Johnson JL, Pearce-Kelling S, Tulloch B, Vervoort R, Wright AF, Aguirre GD. 2002. Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration. *Human Molecular Genetics* **11**:993-1003.

9 Seznam zkratek

AAV: adenoasociovaný virus

ACT: aktivovaný koagulační čas

Ad: adenovirus

APTT: aktivovaný parciální tromboplastinový čas

AWA: Animal Welfare Act

BDD: B-domain-deleted, odstraněná B doména

bGH pA: polyadenylační signál růstového hormonu skotu

BMD: Beckerova muskulární dystrofie

bp: base pair, pár bází

CBT: Cuticle Bleeding Time

cDNA: komplementární DNA

cFIX: psí faktor IX

cFVIII: psí faktor VIII

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice

crRNA: CRISPR RNA

DMD: Duchennova muskulární dystrofie

DNA: deoxyribonukleová kyselina

ERG: elektroretinografie

FIX: koagulační faktor IX

FVIII: koagulační faktor VIII

Gb: gigabase, miliarda bází

HDR: homology-directed repair, homologicky řízená oprava

HSV: herpes simplex virus

ITR: inverzní terminální repetice

kb: kilobase, tisíc bází

kDa: kilodalton

LV: lentivirus

mtCR: mitochondriální řídicí oblast

mtDNA: mitochondriální deoxyribonukleová kyselina

mRNA: mediátorová (messenger) RNA

nDNA: jaderná (nuclear) DNA

NHEJ: non-homologous end joining, nehomologní spojování konců

NK: nukleová kyselina

OCT: optická koherentní tomografie

ONL: vnější jaderná vrstva

PAM: Protospacer-Adjacent Motif, sousední motiv protospaceru

PCR: Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce

PRA: progresivní retinální atrofie

PTT: parciální tromboplastinový čas

RNA: ribonukleová kyselina

RP: retinitis pigmentosa

RPGR: Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator

rRNA: ribozomální RNA

SI: syntetický intron

sgRNA: single-guide RNA

SPA: syntetická polyadenylace

SV40 pA: polyadenylační signál Simian viru 40

SV40 SD/SA: donorový/akceptorový prvek pro splicing viru Simian 40

tracrRNA: transaktivovaná CRISPR RNA

tRNA: transferová RNA

TR: terminální repetice

vWf: von Willebrandův faktor

WBCT: Whole Blood Clotting Test, celkový koagulační čas

WGS: Whole Genome Shotgun

XLRA: X-vázaná progresivní retinální atrofie

10 Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura dystrofinu – N-terminální doména (zelená), střední tyčinková doména (modrá), doména bohatá na cystein (žlutá), C-terminální doména (fialová)	14
Obrázek 2: Karyotyp samce psa.....	16
Obrázek 3: Bourbonský ohař krátkosrstý s normální délkou ocasu (vlevo), se zkráceným ocasem (uprostřed), bez ocasu (vpravo).....	17
Obrázek 4: Nukleotidové sekvence psího FIX u hemofilického (vlevo) a normálního (vpravo) psa, které znázorňují substituci bází na aminokyselinové pozici 379.	22
Obrázek 5: Spontánní krvácení z nosní dutiny (vlevo) a podkožní hematoma (vpravo) u hemofilického psa	23
Obrázek 6: Oftalmoskopie sítnice – zdravé oko (A), postižené oko vykazující stenózu cév a hyperreflexi (B)	26
Obrázek 7: Elektroretinogramy – zdravý jedinec (a, b), postižený jedinec s lézemi na specifických místech (c, d), postižený jedinec s rozsáhlými lézemi (e, f).....	26
Obrázek 8: Labradorský retriever s typickým abnormálním držením těla.....	28
Obrázek 9: Dystrofická svalová tkáň s viditelnými tmavými vlákny, která procházejí degenerací a infiltrací makrofágy	29
Obrázek 10: Analýza Southern blotu z DNA – šipky označují polymorfní restriční fragmenty. Řada 8, 11, 12 – postižení samci, řada 14 – postižená samice, řada 10, 15 – přenašečky, řada 9, 13, 16, 18 – zdraví samci, řada 17 – zdravá samice.....	29
Obrázek 11: Schematické znázornění procesu genové terapie.....	32
Obrázek 12: Struktura retroviru	33
Obrázek 13: Struktura adenoviru	34
Obrázek 14: Struktura adenoasociovaného viru	34
Obrázek 15: Struktura herpes simplex viru.....	35
Obrázek 16: Struktura vektoru AAV-cFVIII-BDD. Zahrnuje inverzní terminální repetice (ITR), syntetický intron (SI), syntetickou polyadenylaci (SPA), promotor (TTR)	39
Obrázek 17: Struktura vektoru AAV2/5-GRK1-hRPGRstb. Zahrnuje terminální repetice (TR), promotor (GRK1), donorový/akceptorový prvek pro splicing viru Simian 40 (SV40 SD/SA), polyadenylační signál Simian viru 40 (SV40 pA) a polyadenylační signál růstového hormonu skotu (bGH pA)	42
Obrázek 18: Imunohistochemie dystrofinu – kontrolní (vlevo), neošetřený (uprostřed), ošetřený (vpravo)	43

11 Seznam tabulek

Tabulka 1: Autozomálně recesivní dědičnost (zelená – zdravý, žlutá – přenašeč, červená – postižený).....	19
Tabulka 2: Autozomálně dominantní dědičnost (zelená – zdravý, žlutá – postižený heterozygot, červená – postižený homozygot)	20
Tabulka 3: Gonozomálně recesivní dědičnost, X-vázaná (zelená – zdravý, žlutá – přenašečka, červená – postižený)	20
Tabulka 4: Plemena psů s hemofilií A a mutace probíhající v genu <i>F8</i>	21
Tabulka 5: Plemena psů s hemofilií B a mutace probíhající v genu <i>F9</i>	23
Tabulka 6: Plemena psů s XLPRa a probíhající mutace v genu <i>RPGR</i>	25
Tabulka 7: Plemena psů se svalovou dystrofií a probíhající mutace v genu <i>DMD</i>	28
Tabulka 8: První úspěšné genové terapie pro vybraná onemocnění psů	37

