

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Molekulární detekce mutace genu RYR1 způsobující maligní hypertermii u psů

Bakalářská práce

Autor práce: Klára Krausová

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Molekulární detekce mutace genu RYR1 způsobující maligní hypertermii u psů" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce doc. Dr. Ing. Pavlovi Vejlovi za odborné vedení této bakalářské práce, cenné rady a trpělivost. Ing. Daniele Čílové bych ráda poděkovala za odborný dohled, konzultace, ochotu a cenné připomínky při práci v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala Ing. Jakubu Vaškovi Ph. D. za dohled nad vybranými laboratorními procedurami.

Molekulární detekce mutace genu *RYR1* způsobující maligní hypertermii u psů

Souhrn

Tématem této práce jsou metody molekulární detekce mutace v genomu psa, způsobující maligní hypertermii.

Práce je rozdělena na dvě hlavní části. První částí je literární rešerše shrnující poznatky o maligní hypertermii z oblasti humánní i veterinární anesteziologie, molekulární biologie a genetiky. V druhé části práce je popsána metodika a závěry vlastní molekulární detekce výše zmíněné mutace, provedené v laboratoři katedry genetiky.

Literární rešerše se zabývá syndromem maligní hypertermie. Cílem je seznámení se symptomatickými projevy, spouštěči, mechanismy, průběhem akutní maligní hypertermie a klinickou diagnostikou. V práci jsou popsány první případy pozorování syndromů maligní hypertermie a historie výzkumu, který vedl k podrobnému popsání tohoto onemocnění u člověka, psa a ostatních druhů nesoucích mutaci podmiňující maligní hypertermii.

Další částí literární rešerše je shrnutím poznatků o mechanismu mutace, detekci sekvencí obsahujících tuto mutaci a vlivu na uspořádání proteinů v ryanodinových receptorech.

V poslední části literární rešerše byly vybrány a popsány laboratorní metody, které jsou běžně využívány k neinvazivní detekci mutací akreditovanými genetickými laboratořemi. Zmíněn je i výčet laboratoří provádějících diagnostiku mutace genu *RYR1* v České republice.

Experimentální bakalářské práce byla zaměřena optimalizací molekulárního markeru umožňujícího detekci kauzální mutace *RYR1* genu pomocí metody polymorfismu délky restričních fragmentů (PCR-RFLP). Tato metoda byla aplikována na 338 zástupců různých plemen psů. Provedená analýza nepotvrdila výskyt mutované alely v populacích hodnocených plemen. Výsledek metody PCR-RFLP byl potvrzen sekvenční analýzou.

Získané výsledky byly diskutovány s literárními zdroji, které ve většině případů nehodnotí reálná plemena, ale pracují s modelovými vyšlechtěnými liniemi s předpokládanou segregací mutované alely. Byly vysloveny závěry, že v rámci hodnocených plemen chovaných v České republice nebude představovat mutace genu *RYR1* významné onemocnění. Sporadický výskyt této mutace byl konzultován rovněž s komerčními genetickými laboratořemi.

Klíčová slova: pes domácí, *Canis lupus f. familiaris*, maligní hypertermie, *RYR1*, mutace, PCR, sekvenace

Molecular detection RYR1 gene mutation causing malignant hyperthermia in dogs

Summary

The theme of this work are methods for molecular detection of mutations in the dog genome, causing malignant hyperthermia.

The work is divided into two main parts. The first part is a literary research summarizing knowledge about malignant hyperthermia from the human and veterinary anesthesiology, molecular biology and genetics. The second part of the work describes the methodology and conclusions drawn from the molecular detection of above-mentioned mutation, which was conducted in the laboratory of the Department of genetics.

The literary research deal with malignant hyperthermia syndrome. The aim is to familiarize with symptomatic manifestations, triggers, the mechanisms, the development of acute malignant hyperthermia and its clinical diagnosis. The first cases of observation of malignant hyperthermia syndrome are also described, as well as the history of the research, which led to a detailed description of this disease in humans, dogs and other species bearing malignant hyperthermia causing mutation.

The next part of literary research is a summary of knowledge about the mechanism of mutation, the detection of sequences containing this mutation and influence on the arrangement of proteins in the ryanodine receptors.

For the last part of literary research commonly used laboratory techniques of non-invasive mutation detection were chosen. These techniques are mostly used by accredit genetics laboratories. Listing of Czech laboratories performing diagnostic of gene RYR1 mutation is also contained.

Experimental part of barchelor's thesis is focussed on molecular marker optimalization for casual mutation in RYR1 gene detection by technique of restriction fragment length polymorphism (PCR – RFLP). This technique was apply to 338 deputies of different dog breeds. Accomplished analysis didn't confirm presence of the mutated allele in assessed breed's population. Result of PCR – RFLP technique was confirmed by sequence analysis.

Results were discussed with literary sources, which didn't judge real breeds, but are developing a model special bred line with presumed mutated allele segregation. The results indicated, that the mutation of gene RYR1 don't represent an influential disorder in breeds harbored in Czech Republic. Sporadic presence of this mutation was consulted with commercial genetic laboratories.

Keywords: dog, *Canis lupus f. familiaris*, malignant hyperthermia, RYR1, mutation, PCR, sequencing

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Maligní hypertermie	3
3.1.1	Historie	4
3.1.2	Klinické projevy	6
3.1.3	Diagnostika	6
3.1.4	Maligní hypertermie u psů	9
3.2	Mutace v genu RYR1	9
3.2.1	Exon 17	9
3.2.2	Exon 15	10
3.2.3	Vliv mutace na uspořádání RYR1	12
3.3	Molekulární detekce mutace genu RYR1	12
3.3.1	Polymerázová řetězová reakce	12
3.3.2	Polymerázová řetězová reakce - polymorfismus délky restrikčních fragmentů	13
3.3.3	Značení pomocí genetických markerů	14
3.3.4	Elektroforetická separace nukleových kyselin na agarózovém gelu	14
3.3.5	Sekvenace	15
3.4	Akreditované genetické laboratoře testující maligní hypertermii u psů	18
4	Materiál a metody	19
4.1	Gen RYR1 F a R primery	19
4.2	Izolace DNA	20
4.3	Restrikční enzym <i>MscI</i> (<i>MslI</i>)	21
4.4	Složení premixu pro PCR	21
4.5	Program C 1000 RYR1	22

4.6	Výběr plemen	23
4.7	Amplifikace vzorků DNA	24
4.8	Elektroforetická separace nukleových kyselin.....	24
4.9	Restrikční štěpení	25
4.10	Výběr vzorků pro jednokapilárovou obousměrnou sekvenaci.....	26
4.11	Amplifikace vzorků na jednokapilárovou obousměrnou sekvenaci	26
4.12	Čištění vzorků pro jednokapilárovou obousměrnou sekvenaci	27
4.13	Sekvenační reakce	28
4.14	Interpretace sekvenovaných fragmentů.....	30
5	Výsledky.....	31
5.1	Detekce mutace za použití restrikčního enzymu <i>MslI</i>	31
5.2	Detekce mutace jednokapilárovou obousměrnou sekvenací.....	32
5.3	Shrnutí výsledků.....	33
6	Diskuze	34
7	Závěr.....	37
8	Bibliografie.....	38
9	Seznam příloh.....	42
10	Přílohy	43

1 Úvod

Maligní hypertermie je autozomálně dominantní mutace v genomu psa, lokalizována na autozomu 1. Jedná se o bodovou mutaci v genu kódujícím proteiny ryanodinových receptorů kontraktilních svalových buněk. Tyto receptory mají zásadní význam v distribuci vápenatých iontů do cytoplazmy, což iniciuje svalovou kontrakci. Substituce pyrimidinových bází v tripletu má v tomto případě za následek translaci jiné aminokyseliny. Tím dojde ke změně proteinového uspořádání ryanodinového receptoru a při styku s volatilními anestetiky nebo depolarizujícími svalovými relaxanty, uvolňuje nadměrné množství vápenatých iontů. Vysoká koncentrace vápenatých iontů má za následek svalové křeče, hypermetabolickou odezvu svalových buněk a prudké zvyšování teploty. Pokud není včas zakročeno, může vést až k smrti.

Jedná se o velmi vážnou poruchu, proto je doporučováno jedincům, kteří mají v rodinné anamnéze maligní hypertermii, podstoupit vyšetření. Test na maligní hypertermii je používán již od konce 80. let minulého století. Jedná se o invazivní metodu, avšak se vzestupem oboru molekulární biologie se objevila možnost testování neinvazivního.

Maligní hypertermie je velice dobře prozkoumána a popsána u několika živočišných druhů. Na základě toho lze porovnávat úseky DNA, které byly označeny, jako nosiče mutace u jednoho druhu, s druhem jiným. Díky genetickému mapování vybraných živočišných druhů a sekvenace genomu člověka, se možnosti srovnávání velice usnadnily.

Volná dostupnost ke genovým databázím, ve kterých se dají dohledat sekvence mnoha živočišných druhů, nesoucí mutaci pro maligní hypertermii. Lze v nich dohledat i primery ohraničující tuto sekvenci, a restriční enzymy rozpoznávající mutovanou sekvenci. Výše zmíněné fakty vedly k detailnímu popsání metod detekování této mutace, které jsou shrnuty v literárním přehledu této práce.

Na základě poznatků ze zpracovaného literárního přehledu byl navržen vlastní postup pro detekování mutace u DNA izolované z bukálních stěrů více než 300 psů.

2 Cíle práce

Cíle bakalářské práce vycházejí z následujících vědeckých hypotéz:

- Maligní hypertermie je poměrně dobře geneticky prostudované onemocnění psů. Mutace genu *RYRI* je považována za kauzální pro vznik tohoto onemocnění.
- Lze předpokládat, že výskyt kauzální mutace genu *RYRI* může být ovlivněn plemennou příslušností.
- Techniky molekulární genetiky umožňují tyto mutace identifikovat na úrovni sekvenace PCR amplikonů nebo pomocí genetických markerů.

Maligní hypertermie je život ohrožující geneticky podmíněná choroba, vyskytující se napříč mnoha živočišnými druhy. Konkrétní cíle této práce byly následující:

- Zpracovat literární přehled o projevech maligní hypertermie a možnostech jejího detekování u *Canis lupus f. familiaris*.
- Na základě publikovaných primerů optimalizovat amplifikaci oblasti *RYRI* s výskytem kauzální mutace a detekovat tuto mutaci restričního štěpení PCR produktu.
- Ověřit výsledky optimalizovaného markeru pomocí sekvenační analýzy.

3 Literární rešerše

3.1 Maligní hypertermie

Syndrom maligní hypertermie je farmakogenetickou poruchou kosterního svalstva, přímo ohrožující život pacienta vystaveného celkové anestezii. Manifestace onemocnění je podmíněna genetickou dispozicí s autozomálně dominantní dědičností, takže vždy vyvolaná stykem organismu s volatilními anestetiky, nebo svalovým relaxantem sukcinylcholinem (Národní centrum pro diagnostiku maligní hypertermie, 2006); (Jurkat-Rott et al., 2000). Vzácně byly popsány případy výskytu maligní hypertermie po vystavení organismu stresu a zvýšené teplotě (Tobin et al., 2001).

Maligní hypertermie je zapříčiněna mutací v ryanodinovém receptoru RYR1, vápenatých kanálcích kosterní svaloviny (Jurkat-Rott et al., 2000).

Statisticky se jedná o poměrně vzácné onemocnění. Dle Národního centra pro diagnostiku maligní hypertermie, se dispozice vyskytuje u jedné z 10 000 – 15 000 osob. Epidemiologické studie Malignant Hyperthermia Association of the United States (2016) ukazují, že maligní hypertermie způsobuje komplikaci u jednoho z 100 000 operačních zákroků u dospělých osob, a jednoho z 30 000 zákroků u dětí. Jurkat-Rott (2000) však ve své práci uvádí častější výskyt, a to jeden případ z 50 000 u dospělých a jeden případ z 15 000 u dětí.

Kumulace anestetik v organismu vede k patologickým změnám, v důsledku nekontrolovaného navýšení vápenatých iontů v sarkoplazmě svalových vláken, což vyvolává řadu symptomů typických pro maligní hypertermii. Specifickým ukazatelem je navýšení objemu vydechovaného CO₂, za vyloučení závady na měřicím přístroji. Mezi další významné symptomy patří tachykardie, tachypnoe, acidóza, svalová ztuhlost a vzácně rhabdomyolýza (Barash, 2009).

Symptomy připomínající maligní hypertermii byly pozorovány i u pacientů s diagnózou myotonie fluctuans, Duchennovy a Beckerovy dystrofie, myotonie congenita a myotonicou dystrofií. Avšak pravá maligní hypertermie byla potvrzena pouze u Evansovy myopatie, syndromu King Denborough a central core myopatie (Jurkat-Rott et al., 2000).

Standartní test pro diagnostiku dispozice k maligní hypertermii v Evropě, u člověka, je in vitro kontrakční test (IVKT), prováděný na vzorku svalové tkáně, odebrané z vastus lateralis m. quadriceps femoris (zevní hlava čtyřhlavého svalu stehenního) (Národní centrum pro diagnostiku maligní hypertermie, 2006).

Jedná se o druhově nespecifickou mutaci. U člověka byly symptomy maligní hypertermie poprvé pozorovány kolem roku 1890. Postihuje i čeledě *Suidae*, *Canidae* a *Felidae*, *Equidae* a *Cervidae* (O'Brian et al., 1984).

Jak již bylo zmíněno výše, maligní hypertermie je autozomálně dědičná, proto je většinou genetický test prováděn u psů určených k chovným účelům, na žádost majitele nebo u psů pocházejících z linie, u které byla mutace prokázána. Tyto testy provádí akreditované genetické laboratoře, jejichž seznam je uveden v kapitole 3. 4.

3.1.1 Historie

Předpoklady výskytu maligní hypertermie se začaly objevovat až při vzestupu moderní anestezie. Jelikož se však jedná o chorobu dědičnou, její manifestace byly nepochybně pozorovány dávno před jejím oficiálním objevením (Britt., 1987).

Na počátku éry anestezie za pomoci éteru a chloroformu, bylo jakékoli monitorování pacientova stavu minimální. Úmrtí při operacích zůstávala často bez vysvětlení. Až počátkem 20. století se začaly objevovat vědecké články a práce ohledně výskytu náhlé horečky a tachykardie u pacientů v průběhu anestezie nebo ihned po podání anestetik. Jelikož se mnoho z hlášených případů událo v letních měsících, nebyl jim přikládán velký význam kvůli předpokladu, že se jednalo o úžeh (Britt., 1987).

V průběhu let 1935 – 1960 bylo publikováno mnoho studií zaměřujících se na zvýšenou teplotu při podání anestetik. Mezi stěžejní práce patřily publikace Artura Ernesta Guedela, který pozoroval přes 20 případů horečky u pacientů v průběhu anestezie končící smrtí, jejichž následná pitva odhalila mozkový edém. J. Alfred Lee podotkl v edici „A synopsis of anesthesia“ z roku 1953, na zvýšený výskyt tzv. éterových křečí a horečky u mladých pacientů. Až Stuart C. Cullen, ve třetí edici „Anaesthesia in General Practice“ sepsal seznam společných symptomů, do kterých zahrnul vysokou vnější nebo vnitřní teplotu, retenci oxidu uhličitého a hypoxii (Britt., 1987).

Oficiálně byla maligní hypertermie popsána v roce 1960 Dr. Michaelem A. Denboroughem a Dr. Richardem R. H. Lovellem v „The Lancet“, podrobněji pak v roce 1962 v „British Journal of Anaesthesia“. Průlomové bylo zejména zohlednění genetického faktoru, k čemuž pomohla rodinná anamnéza jednadvacetiletého pacienta s otevřenou zlomeninou pravé nohy. Pacient uvedl, že asi deset jeho příbuzných zemřelo po vystavení éterové anestezii (Ohnishi et Ohnishi, 1994). Při editaci článků v „Canadian Anaesthetists Society Journal“, vycházejících ze symposia v Torontu v roce 1966 zaměřeném na nové poznatky o prudké hypertermii, pojmenoval tento jev jako maligní hypertermie (Britt., 1987).

V roce 1970 byla zjištěna spojitost mezi stresovým syndromem prasat a maligní hypertermií. To poskytlo zvířecí model pro další výzkum maligní hypertermie, zejména rasy Landrace, Poland-China a Pietrain vykazovaly typické příznaky maligní hypertermie po vystavení volatilním anestetikům a sukcylnylcholinu. Za návrhem zdokonalení in vitro diagnostického biotestu stál výzkumný tým Dr. Karlowa. V roce 1975 pak Gaisford G. Harrison potvrdil účinnost dantrolenu při léčbě příznaků maligní hypertermie u prasat, u lidí bylo intravenózní podávání povoleno Americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v roce 1979. V 80. letech 20. století bylo ve Spojených státech, Kanadě a Velké Británii založeno mnoho organizací, šířících povědomí o nemoci jak u pacientů diagnostikovaných se syndromem maligní hypertermie, tak u lékařů (Barash, 2009).

Halotan – kofeinová zkouška (v angličtině Caffeine Halothane Contracture Test - CHCT) byla standardizována na základě výzkumu North America Malignant Hyperthermia Registry, založeného ve Spojených státech koncem 80. let (Barash, 2009); (Jurkat-Rott et al., 2000).

V roce 1985 byl demonstrováno, doktorem J. R. Lopezem a jeho kolegy, dramatické zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů, během maligní hypertermické krize, ve svalu odebraném z prasete i člověka se senzitivitou vůči maligní hypertermii. Po vystavení svalu dantrolenu byla vysoká koncentrace vápenatých iontů zvrácena. Pokus doktora Lopeze a kolektivu byl velkým pokrokem v pochopení patologické fyziologie maligní hypertermie (Barash, 2009).

V průběhu 90. let 20. století byly identifikovány geny spojené s citlivostí na maligní hypertermii za pomoci molekulárně biologických metod. Díky tomuto byl v roce 2003 vyvinut klinický genetický test na maligní hypertermii (Barash, 2009).

3.1.2 Klinické projevy

Při syndromu maligní hypertermie dochází k nekontrolovatelnému navýšení metabolické aktivity svalů při vystavení organismu volatilním anestetikům nebo depolarizujícím svalovým relaxantům. Zvýšená metabolická aktivita buněk kosterních svalů je následkem uvolnění velkého množství zásobních myoplazmatických vápenatých iontů ze sarkoplazmatického retikula skrz ryanodinový receptor. Vysoká koncentrace vápenatých iontů způsobí svalovou ztuhlost, která je často jako první postřehnutelná na m. masseter (zevní sval žvýkací), a později i na dalších kosterních svalech (Jurkat-Rott et al., 2000). Ztuhnutí m. masseter stěžuje intubaci při dýchacích potížích (Britt et Kalow, 1970). Následně dochází k aktivaci glykogenolýzy a buněčného metabolismu, což vede ke zvýšení teploty, dle měření Britta a Kalowa (1970) až na 42 °C, a nadbytečné produkci laktátu. Zahájením oxidačního cyklu dochází ke zvýšené spotřebě kyslíku a zároveň k vysoké produkci oxidu uhličitého následované rychlým spotřebováváním ATP. Tyto metabolické pochody vedou k systematickým defektům jako je acidóza, hyperkapnie a hypoxémie. Častým, avšak nespecifickým, příznakem je tachykardie. Pokud se začnou u pacientů projevovat tyto příznaky, a není zahájena okamžitá léčba, dochází až v 70 % případů k úmrtí v důsledku komorové fibrilace, plicního edému, poruch srážlivosti krve, poškození mozku z nedostatku kyslíku nebo selhání ledvin (Jurkat-Rott et al., 2000).

3.1.3 Diagnostika

Nejčastější diagnostické postupy se rozdělují do dvou základních kategorií: invazivní a neinvazivní.

Invazivní metodou je In Vitro Kontraktilní Test (IVKT) prováděný na vzorku svalové tkáně odebraném biopsií. Tato metoda je rozšířená a používaná zejména v Evropě. Za jejím vývojem stála The European Malignant Hyperthermia Group (EMHG) (Loke et MacLennan, 1998) . EMHG také sestavila následující protokol (1984) a standardizovala postup při provádění IVKT. Po biopsii je nutné provést test nejdéle do 5 hodin při teplotě 37 °C. Doporučená velikost vzorku je 15 – 25 mm délky a 2 – 3 mm tloušťky. Hlavním principem je stimulace odebraného vzorku svalu, v Krebs – Ringerově roztoku (118,1 mM NaCl, 3,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄ · 7H₂O, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM CaCl₂ · 6H₂O, 11,1 mM glukózy) s pH 7,4, elektrickým supramaximálním stimulem o frekvenci 0,2 herců (Hz) a délce 1 milisekundy (ms), za

současného okysličování směsí Carbogen. Následují testy reakcí po vystavení kofeinu a halotanu. Pro statický kofeinový test se napětí postupně zvyšuje, pro dosažení přijatelných svalových záškubů, současně se zvyšuje i koncentrace kofeinu a jsou snímány reakce při maximální síle záškubu. Výsledek statického kofeinového testu je vykazován jako nejnižší koncentrace kofeinu potřebná k dosažení záškubu o síle 0,2 g. Statický halotanový test je obdobný jako kofeinový, místo kofeinu je však použit plynný halotan o vzrůstající koncentraci (0,5, 1,0, 2,0 až 3,0 %), a to včetně interpretace výsledků. Dynamický halotanový test spočívá ve vystavení svalového vlákna halotanu po dobu 3 minut. Vlákno je dále konstantě natahováno o 4 mm za minutu po dobu 1,5 minuty, následně udržováno v nataženém stavu po dobu 1 minuty. Tento proces je opakován jednotlivě pro každou výše uvedenou koncentraci halotanu. Hranice koncentrace halotanu je určena na hodnotu, při kterém došlo k nárůstu napětí ve svalu o více než 0,2 g. Každý z výše uvedených testů by měl být opakován třikrát, pokaždé na čerstvých vzorcích od stejného jedince. Na základě měření reakcí svalových vláken lze pacienty rozdělit do tří skupin. Malignant Hyperthermia Susceptibility (dále jen MHS) skupina zahrnuje pacienty s prokázanou dispozicí k maligní hypertermii. Kritérii pro tuto skupinu je reakce na kofeinový test při koncentraci kofeinu rovné nebo nižší než 1,5 mmol, a zároveň reakci na halotanový test při koncentraci halotanu rovné nebo nižší než 2%. Malignant Hyperthermia Normal (dále jen MHN) skupina nevykazuje známky maligní hypertermie. Kritérii této skupiny jsou reakce na kofein při koncentraci kofeinu 3 mmol a vyšší, zároveň reakce na halotan při koncentraci 3%. Malignant Hyperthermia Equivocal (dále jen MHE) skupina zahrnuje jedince, u kterých byly výsledky nejasné, bez ohledu na rodinou anamnézu. Pacienti zařazení do skupiny MHE by měli být při anestezii sledováni a považováni za MHS (Jurkat-Rott et al., 2000).

Druhou invazivní metodou je Halotan - kofeinový kontraktilní test (CHCT). Jedná se diagnostickou metodu vyvinutou the North American Malignant Hyperthermia Registry (Loke et MacLennan, 1998). Biopsie je prováděna z vastus lateralis m. quadriceps femoris při lokální anestezii. Potřebná velikost vzorku je 3,5 x 2 x 1,5 centimetru. Vzorek se vkládá do Ringer – Krebsova (složení uvedeno výše) roztoku, o pH 7,4, okysličovaného směsí Carbogen (95% O₂ a 5% CO₂). Odebraný vzorek je rozdělen na 3 – 4 menší vzorky, které se vkládají do vertikálních komor o objemu 50 mL. Jeden konec každého vzorku je zafixován svorkou a druhý konec každého vzorku je připevněn k siloměru (FT – 03 force transducer) pro snímání izometrického napětí. Komory se

naplní Ringer – Krebsovým roztokem o teplotě 0,1 °C. Svalové záškuby jsou vyvolány elektrickou stimulací (50 V, 2 ms, 0,2 Hz). Za účasti kvantifikátoru signálu CyberAmp je signál digitalizován a analyzován. Po 30 minutové adaptaci se přidává do komor kofein ve zvyšujících se koncentracích (0,5, 1, 2, 4, 8 a 32 mM) po 4 minutách. Po ukončení kofeinového kontraktálního testu jsou komory pečlivě vymyty, pro eliminaci rizika kontaminace. Procedura měření izometrického napětí je opakována, a po 30 minutách adaptace se přidává plynná směs 3% halotanu za současného probublávání Ringer – Krebsova roztoku Carbogenem po dobu 10 minut. Vzorok, které nejevily žádné známky svalových záškubů, se z testu vyřazují. Hranice napětí pro pozitivní diagnózu maligní hypertermie je 0,2 g při reakci na kofein a 0,7 g na halotan. Na základě těchto kritérií jsou pacienti rozdělení do skupin MHS a MHN (Abreu et al., 2010).

Při srovnání obou diagnostických testů je patrné, že odchylky při postupu jsou minimální. CHCT je využívána zejména ve Spojených státech. IVKT je preferovaný způsob diagnostiky v Evropě. Za jediný větší rozdíl lze považovat skupinu MHE u diagnostiky pomocí IVKT. Tato skupina však není uznána jako oficiální diagnóza.

Neinvasivní metodou je průzkum genetické informace, zacílen na gen *RYR1*, kódující ryanodinové receptory. Jako vzorek postačuje menší množství krve. Předpokládaný lokus nesoucí mutaci podmiňující maligní hypertermii je podroben genetické segregční analýze. Vybrané sekvence u člověka, ve kterých se přítomnost mutace projeví náchylností k maligní hypertermii, jsou uvedeny v tabulce (viz přílohy obrázek 5). Metoda genetické analýzy byla v Evropě schválena EMHG (Urwyler et al., 2001). Tato metoda byla schválena ve Spojených státech institucí Malignant Hyperthermia Association of the United States (MHAUS) v roce 2006. Její výhody jsou zejména nižší nákladovost a absence biopsie. Rozvoj metody genetického testování byl umožněn díky projektu lidského genomu (HGP), který pomohl k osekvenování takřka 25 000 lidských genů (Anderson - Pompa et al., 2008).

U pacienta se syndromem maligní hypertermie by mělo být provedeno testování invazivní i neinvasivní metodou (Abreu et al., 2010). Ve výjimečných případech dochází k protichůdným výsledkům při použití invazivní i neinvasivní metody u téhož pacienta. Pokud má takovýto pacient v rodinné anamnéze náchylnost k syndromu maligní hypertermie, musí být brán, i přes protichůdné výsledky, jako HMS (Urwyler et al., 2001).

3.1.4 Maligní hypertermie u psů

U psů byla maligní hypertermie poprvé popsána v roce 1973. Většina symptomů doprovázející maligní hypertermii je u psů stejná jako u lidí (viz kapitola 3. 1. 2.). Tedy zvýšení vydechovaného CO₂, rektální teploty a tepové frekvence. Mezi další symptomy patří tachykardie, acidóza, a pokud není podán dantrolen dochází v terminálním stadiu i ke svalové rigiditě (Nelson, 1991).

Projevy maligní hypertermie u psů, zjištěné na základě rozboru krve, zahrnují zvýšené hodnoty kreatinkinázy, hemoglobinu, retikuloidů a abnormální křehkost erytrocytů. Zvýšené jsou i hodnoty koncentrace NaCl (téměř o 10 mM než u zdravých psů). Funkce membránové Ca²⁺ aktivované ATPázy vzrostla o celých 100%, což je pravděpodobně následek kompenzační adaptace na zvýšenou koncentraci vápenatých iontů v intracelulárních prostorech. Abnormální křehkost erytrocytů je pravděpodobně důsledkem deficitu glukózo-6-fosfát dehydrogenázy (G6PD). Zvýšení koncentrace vápenatých iontů má za následek hypermetabolickou odezvu v myoplazmě, čímž vzniká velké množství volných radikálů. Hromaděním volných radikálů dochází k defektu v antioxidačním systému, a tím i kumulativnímu poškození svalové tkáně. Druhotným následkem hypermetabolické odezvy je zvyšování teploty nad 40 °C (O'Brian et al., 1984).

3.2 Mutace v genu RYR1

3.2.1 Exon 17

Bodová mutace v genu *RYR1* způsobující maligní hypertermii má několik kandidátních tripletů (tzv. hot spots), přičemž substituce nukleotidu jen v jednom z nich vede ke vzniku maligní hypertermie. U člověka bylo prozatím nalezeno 14 tripletů (viz přílohy obrázek 5), často zastoupených u pacientů MHS, kteří podstoupili IVKT (Brandom, 2006); (Urwyler et al., 2001).

U rodu *Canidae* byl zájem Gronka (2000) zaměřen na 1843. nukleotid na exonu 17 genu *RYR1*, který byl označen jako hot spot pro mutaci způsobující maligní hypertermii u člověka a prasete. Izolovaná DNA z krve byla podrobena 30 cyklům PCR s forwardovým primerem (dále jen RYR1 F) 5' ... GTTCCCTGTGTGTGTGCAATGGTG...3', který odpovídá nukleotidům 1811 –

1834 v prasečí cDNA. Reversní primer (dále jen RYR1 R) o sekvenci 5' ... GCCAGGGAGCAAGTTCTCAGTAAT...3', který je komplementární s nukleotidy 1961 – 1884 cDNA. Separace produktu byla uskutečněna prostřednictvím 10 % polyacrylamidového gelu. Pro neradioaktivní PCR – SSCP analýzu bylo třeba produkt denaturovat na jedno vláknovou DNA. Amplifikovaný exon 17 byl naklonován v bakteriálním plazmidu (pGem5 Zf-). Po vyčištění plazmidové DNA byly dvou vláknové templáty osekvenovány za použití primerů Cy5'. Univerzální primer 5'... Cy5 – d[CGACGTTGTAACGACGGCCAGT]...3', reversní primer 5' ... Cy5 – d [CAGGAAACAGCTATGAC]...3'. Po sekvenaci produktů proběhla analýza a byly vyvozeny závěry.

Z analýzy vyplynulo, že délka amplifikovaných fragmentů dříve testovaných druhů (*Zebrine, Ovine, Anserine*), byla stejná i u testované čeledi *Canidae*, a zároveň byla homologní s prasečím exonem 17. Osekvenovaný fragment DNA vybraných jedinců v čeledi *Canidae* byl porovnán s fragmenty lidské a prasečí DNA. C → T transverze v oblasti 1836. nukleotidu u vlčí DNA, ani T → C tranzice na pozici nukleotidu 1857 u liščí DNA nezměnila sekvenci aminokyselin, tudíž byly vyloučeny jako potenciální hot spoty pro maligní hypertermii. Avšak T → C tranzice v oblasti 1846. nukleotidu u liščí DNA změnila translatovanou aminokyselinu ze serinu na prolin, a byla tedy označena za potenciální hot spot (Gronek et al., 2000).

3.2.2 Exon 15

Více rozsáhlá práce M. C. Roberts et al. (2001) používala speciálně vyšlechtěnou linii, přičemž v parentální linii byl křížen MHS otec (kříženec dobrman – německý ovčák – kolie – labradorský retrívr) se třemi nepříbuznými MHN matkami kříženeckého původu. V F2 generaci bylo dostupných 52 psů pro genetické testování. Vzorky DNA byly izolovány z krve a svalových vláken.

Gen *RYR1* byl lokalizován na chromozomu 1 (CFA01) prostřednictvím radiačního hybridního mapování. Polymorfní mikrosatelitní markery z CFA01 byly vyselektovány pro značený lokus (REN143K19-RYR1-FH2294-FH2326-CO1.164-FH2309-CO1.251-CO1.246-FH2313-FH2016), v rozpětí 90,7 centiMorganů. Výsledný haplotyp je shrnut v obrázku 6 (viz přílohy). Z haplotypu je patrné, že mutace je vložena mezi markery REN143K19 a FH2294. Při porovnání radiační hybridní mapy a vazebné mapy ve stejné

proximálně telemetrické pozici, lze odhadnout vzdálenost mezi markery (viz přílohy obrázek 7) (Roberts et al., 2001).

Fragmenty genu *RYR1* pro PCR byly vybrány na základě identifikovaných sekvencí (viz přílohy obrázek 8) nesoucí mutaci u lidí a prasat. K těmto fragmentům byly přiřazeny příslušné F a R primery, převzaté od člověka, prasete a králíka. Produkty PCR byly vloženy in vitro vektorem do *E. coli*. Naklonované templáty byly podrobeny přímé sekvenaci. U jedince s potvrzenou MHS byl odhalen T → C polymorfismus na pozici 1640. nukleotidu v exonu 15. Alela T1640C byla odhalena v 6 klonech z 22 (dalších 16 reprezentovalo MHN wild type), což dokázalo, že polymorfismus na této pozici je genetickou substitucí, nikoliv chybou v amplifikaci či sekvenování. Tranzice v nukleotidu 1640 má za následek výměnu valinu za alanin na pozici 547. aminokyseliny. Z předchozího porovnání osekvenovaných částí genu *RYR1* člověka, prasete, krysy, králíka a psa bylo zjištěno, že na pozici 547. aminokyseliny je fylogeneticky zafixovaný valin (Roberts et al., 2001).

Z výše uvedených zjištění vyplynula sekvence mutace 5'...TGGCCA...3', která je rozpoznávací sekvencí restričního enzymu *MslI* (*MscI*). Fragmenty DNA byly amplifikovány za přítomnosti RYR1 F a RYR1 R primerů. Produkty PCR byly následně vystaveny restričnímu enzymu *MslI*, který, v případě přítomnosti T → C tranzice na dané pozici, fragmenty rozštěpil. Po elektroforetické separaci byly z elektroforeogramu odečteny výsledky. Možné genotypy byly tři. Dominantní homozygot TT (thymin na pozici 1640. nukleotidu) MHN wild type s nerozštěpeným fragmentem. Dominantní homozygot CC (cytosin na pozici 1640. nukleotidu) MHS s oběma fragmenty rozštěpenými. Heterozygot TC (na jedné alele thymin, na druhé cytosin) MHS s jedním fragmentem rozštěpeným a druhým ne. Heterozygot TC MHS byl důkazem, že maligní hypertermie je dědičná dominantně (Roberts et al., 2001).

Uvedené výsledky M. C. Roberts et al. (2001) dokazují, že pro neinvazivní diagnostiku maligní hypertermie u psů lze využít analýzu polymorfismu délky restričních fragmentů.

3.2.3 Vliv mutace na uspořádání RYR1

Zvyšování intracelulárního Ca^{2+} je kontrolováno obousměrnou signalizační interakcí mezi L-type Ca^{2+} kanály v sarkolemě (DHPRs) a Ca^{2+} vypouštěcími kanály (RYR1) sarkoplazmatického retikula. Při svalové kontrakci je akční potenciál indukován konformačními změnami v dyhydropyridinových receptorech (DHPRs). Tím se otevřou přilehlé RYR1. Hlavní role DHPR a RYR1 proteinů je udržování homeostázy vápenatých iontů ve svalové buňce, a jejich činnost je na sobě závislá. Bodová mutace, podmiňující vznik náchylnosti k maligní hypertermii, v konkrétním tripletu zapříčiní na této pozici translaci jiné aminokyseliny. Změna v pořadí aminokyselin vede k odlišné stavbě myotubulů, tvořících Ca^{2+} propustné kanály. V důsledku toho neefektivně vypouští vápenaté ionty ze sarkoplazmatické retikula, jako odpověď na depolarizaci sarkolemy. Velké množství vápenatých iontů vede k poškození jader buněk, a neschopnosti zpětně kontrolovat a snižovat množství Ca^{2+} v buňce (Avila et Dirksen, 2001).

3.3 Molekulární detekce mutace genu RYR1

3.3.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (dále jen PCR) umožňuje amplifikaci vybraných DNA sekvencí. Využívá původní DNA jako templát pro syntetizaci stejných fragmentů. Každý takto syntetizovaný fragment se stává templátem pro další syntetězu, což je hlavním principem řetězové reakce. Reakce se účastní několik komponentů: templát s primery označenou cílovou sekvencí, F a R primery komplementární se začátkem a koncem sekvence určené k amplifikaci, DNA polymeráza (Taq polymeráza separovaná z *Thermus aquaticus*), deoxynukleosid trifosfatáza (dNTP), pufrý KCl a MgCl_2 , hovězí sérový albumin (BSA), ENHANCER a voda. PCR probíhá v termocykleru (Clark et Pazdernik, 2012).

Primery, komplementární s cílovou sekvencí, jsou dohledatelné ve volně přístupné databázi BOLDSystem (2014). Databáze je mezinárodní a neustále doplňovaná o nové primery, za současné kontroly stávajícího obsahu. Na obsahu se podílí více než 120 organizací (Ratnasingham et Hebert, 2007).

PCR má šest základních kroků. Prvním krokem je iniciace probíhající při teplotě 94 – 98 °C po dobu 1 – 9 minut, to je potřebné pro aktivaci DNA polymerázy. Druhým krokem je denaturace probíhající při teplotě 94 – 98 °C po dobu 20 – 30 vteřin. Fáze denaturace slouží k rozpuštění vodíkových můstků, rozvolnění DNA a vzniku jednovláknových molekul DNA. Třetím krokem je annealing probíhající za teploty 50 – 60 °C po dobu 20 – 40 vteřin. Při annealingu dochází k nasedání primerů na konkrétní vazebná místa. Čtvrtým krokem je elongace, teplota je závislá na použité polymeráze (v případě Taq je optimální 70 – 80 °C) a elongace probíhá 1 – 2 minuty. Dochází k syntetizování nových vláken komplementární s původními. Fáze denaturace, annealingu a elongace se 30 – 40 cyklicky opakují. Pátým krokem je závěrečná elongace, která probíhá za teploty 70 – 74 °C po dobu 5 – 15 minut, po posledním cyklu PCR, aby bylo jisté, že všechny fragmenty jsou kompletně syntetizovány. Posledním krokem je závěrečné pozdržení, není omezeno časově, a může sloužit ke krátkodobému uchování produktů PCR. Teplota v této fázi je 4 – 15 °C (Saiki et al., 1985); (Saiki et al., 1988).

Výsledky PCR lze zpracovávat, měřit a vizualizovat několika způsoby. Nejčastějším způsobem je elektroforetická separace nukleových kyselin (viz kapitola 3. 4.).

3.3.2 Polymerázová řetězová reakce- polymorfismus délky restrikčních fragmentů

Po interpretaci výsledků sekvenace produktu PCR a stanovení kandidátního tripletu hledané mutace, je nutno vybrat příslušný restrikční enzym, komplementární s mutovanou sekvencí.

Vyhledání příslušného enzymu je možné v databázi REBASE (2009). Restrikční a modifikační systémy jsou označeny dle mezinárodně uznávané nomenklatury. Webové stránky shrnují veškeré známé informace o restrikčních enzymech, včetně rozpoznávacích sekvencí jednotlivých enzymů a jejich komerční dostupnosti. V současné době databáze obsahuje 4 000 biochemicky nebo geneticky charakterizovaných restrikčních enzymů. Součástí databáze jsou i odkazy a propojení na další mezinárodní genové databáze, jako je National Center for Biotechnology Information (NCBI), GenBank a PubMed (Roberts et al., 2009).

Přítomnost mutace je prokázána v případě, že se v daném amplikonu vyskytuje sekvence rozpoznávána příslušným restriktivním enzymem. Díky tomu dojde k rozštěpení amplikonu. Štěpené produkty lze separovat pomocí elektroforetické separace a následně detekovat prostřednictvím UV transiluminátoru (Roberts et al., 2001).

3.3.3 Značení pomocí genetických markerů

Díky Human Genom Project byla osekvenována velká část lidského genomu, což umožnilo mapování genomu a vznik mnoha databází (Beyer et al., 2007).

Jednotná radiačně hybridizovaná (RH) mapa genomu *Canidae* zahrnuje 720 markerů. V průběhu vývoje této mapy byly nalezeny spojitosti mezi geny podmiňující konkrétní choroby a neznámými polymorfními markery. Zároveň byly vyvinuty mikrosatelity a chromozom-specifické genetické markery. Pro kompletní RH mapování musí být screenováno stovky meióz, pro rozlišení vzdálenosti mezi velmi blízkými markery. Avšak díky této mapě genomu *Canidae* je možno nalézt konkrétní markery pro konkrétní genové sekvence, lokusy i chromozomy při srovnání s vlastní RH mapou daných jedinců (Mellersh et al., 2000).

Markery nejbližší mutaci způsobující MHS jsou FH2294 s LOD skórem (vůči MHS) 8,9, REN143K19 s LOD skórem (vůči MHS) 8,24 a FH2294 vůči REN143K19 LOD skóre 7,65. Pro vyloučení vazby je požadováno LOD skóre menší než 2, což ani jeden z markerů nesplňuje. Dá se tedy s jistotou říci, že vazba mezi těmito markery a MHS je přítomna (Roberts et al., 2001).

3.3.4 Elektroforetická separace nukleových kyselin na agarózovém gelu

Elektroforetická separace je technika pro separaci nukleových kyselin dle velikosti. Je používána při analytických technikách jako mapování pomocí restriktivních enzymů, potvrzení původu plazmidů, posuzování velikosti produktů PCR, sekvenační analýzy, porovnání polymorfismu v populaci, preparativní techniky jako separace fragmentů pro obnovení a klonování (Brody et Kern, 2004) .

Základním principem elektroforetické separace, je pohyb záporně nabitých nukleových kyselin skrz agarózový gel, v elektrickém poli směrem k anodě. Narušení vodíkových můstků elektrickým polem umožní orientaci vláken gelu v elektrickém poli.

Kratší molekuly migrují rychleji a dále, jelikož lépe prostupují póry agarózového gelu. Velikost jednotlivých vzorků je možno odečíst porovnáním pozice fragmentu s GeneRuler (Lewis, 2015).

Hustota gelu je závislá na velikosti produktu. Obecně platí, že čím je produkt menší, tím musí být gel hustší (Stellwagen, 2009). Pro fragmenty DNA o velikosti 5 – 10 kbp je nejvhodnější gel o koncentraci 0,7%. Gel 2% je vhodný pro fragmenty o velikosti 0,2 – 1 kbp. Pro fragmenty menší než 200 bp jsou vhodnější polyakrylamidové gely (Lewis, 2015). Samotná výroba gelu je popsána v kapitole 4. 8.

Napětí a doba elektroforézy je závislá na velikosti elektroforetické vany (Lewis, 2015).

Vizualizace je možná díky přidání ethydium bromidu (dále jen EtBr) do agarózového gelu. EtBr je vysoce mutagenní, avšak umožňuje vizualizaci fragmentů při vystavení UV světlu v UV transiluminátoru, kterým je možno zaznamenat výsledky separace v podobě elektroforeogramů. Druhou možností je značení DNA radioizotopy a umístění fotografického papíru do blízkosti gelu. Další alternativou je skenování gelu detektorem, měřícím přímo β emise. Pro vizualizaci DNA molekul v celých buňkách je DNA značena digoxigeninem (Alberts et al., 2015).

3.3.5 Sekvenace

Sekvenace je proces určování pořadí nukleotidů na základě komplementarity s vloženým fragmentem DNA. Mezi nejvýznamnější metody patří Maxam – Gilbertova Metoda, Sangerova metoda, pyrosekvenování a nejnovější metody (Carlson, 2010).

Pro úspěšné sekvenování je nutno dodržovat několik pravidel. DNA by měla být čistá, bez přítomnosti proteinů, RNA a polysacharidů. Templát by měl být před přidáním sekvenační směsi a primerů vysušený a pročištěný etanolem (Nucleics, 2016).

Maxam – Gilbertova metoda je založena na principu rozštěpení fragmentu chemikáliemi v místě konkrétního nukleotidu. Nevýhodou této metody je zejména využití velkého množství nebezpečných chemikálií, jako je radioaktivní fosfor, dimetylsulfát, piperidin a hydrazin (Carlson, 2010).

Sangerova metoda využívá DNA polymerázu, společně se speciálními dideoxynukleotidy (ddNTP's), pro vytvoření částečných kopií DNA fragmentu pro sekvenaci. Do reakční směsi jsou přidány čtyři rozdílně obarvené ddNTP's. Produkt je umístěn do gelu v kapiláře a separován elektroforézou. Kamera zaznamenává barvu každého frekvenčního pásma, při jejich pohybu skrz gel. Data jsou převáděna do počítače, který sekvenace shromažďuje (Alberts et al., 2015).

Pyrosekvenace vychází ze Sangerovy metody využívání DNA polymerázy. Liší se však v reverzibilitě terminace. Je postavena na monitorování DNA pomocí bioluminiscence přítomných enzymů. Klenow DNA polymeráza, ATP sulfuryláza, luciferáza a apyráza. Detekční systém je založen na uvolnění pyrofosfátu z přítomných enzymů při nasednutí nukleotidu na vlákno DNA. Pyrosekvenace je limitována velikostí fragmentu DNA, proto zatím není vhodná k detekci polymorfismů velkých genů (Ahmadian et al., 2006).

Nová generace sekvenování (NGS) vykazuje velkou rychlost, dokáže sekvenovat i samotné DNA amplifikované fragmenty bez nutnosti předchozího klonování. Také byl redukován počet chyb při sekvenaci. Jediným limitním faktorem zůstávají náklady spojené se sekvenováním (Glenn, 2011).

454 GenomeSequencer FLX instrument vychází z pyrosekvenace. Fragmenty DNA jsou spojeny se specifickými adaptéry, které způsobí navázání fragmentu na substrát. Fragmenty jsou amplifikovány emulzní PCR. Po denuraci PCR produktu jsou substráty s navázanými fragmenty položeny na optická vlákna, která výborně vedou světlo. Optických vláken je na platformě několik stovek tisíců, takže může probíhat mnoho sekvenací najednou. Výsledky jsou snímány kamerou. Touto metodou je možno číst sekvenace o velikosti 400 – 500 bp (Ansorge, 2009).

Illumina (Solexa) genome analyzer pracuje na bázi sekvenování syntézou. Reverzibilní terminátorové nukleotidy, pro každou bázi, označené jinou fluorescenční barvou, jsou začleňovány prostřednictvím speciální DNA polymerázy. Na fragmenty jsou navázány adaptéry, které slouží jako pojící místo při hybridizaci fragmentu a jeho spájení se s komplementárním adaptérem. Adaptéry v následující PCR zastupují při amplifikaci funkci primerů. Při začleňování nukleotidů na vlákno jsou fluorescenční barvy snímány kamerou (Alberts et al., 2015).

Applied Biosystems ABI SOLiD systém využívá emulzní PCR. Na fragmenty jsou napojeny adaptéry, a následně jsou připevněny k substrátu. Po denuraci DNA jsou substráty přeneseny na skleněnou plochu. V prvním kroku je primer hybridizován na adaptér. Následně je hybridizovaná směs oligonukleotidových oktamerů a je přidána vazebná směs. V oktamerách jsou vyznačeny dvojice čtvrtých a pátých bází jednou ze čtyř fluorescenčních barev. Po detekování fluorescenčního barviva je barvivo vyvázáno a cyklus se opakuje, tentokrát za vyznačení deváté a desáté báze, v dalším cyklu je vyznačena čtrnáctá a patnáctá báze atd. Jelikož je každá báze značená jinou barvou, je možnost chyby značně redukována (Ansorge, 2009).

Další z používaných metod je Ion Torrent Sequencing. Fragmenty jsou umístěny na mikroskopické substráty. Prostřednictvím PCR je každý fragment amplifikován, takže obklopí substrát, ke kterému byly přichyceny. Tento proces produkuje miliardy substrátů, přičemž každý je pokrytý identickými kopiemi patřičného fragmentu. Substráty jsou poté přemístěny do cely, společně s primerem. Po zahájení DNA syntézy se uvolní vodíkový iont pokaždé, když dojde k navázání nukleotidu na prodlužující se řetězec. Uvolňování vodíkových iontů vede ke změně pH, což je registrováno elektrografickým čipem. Sekvence jsou tedy čteny na základě uvolňování vodíkových iontů (Alberts et al., 2015).

Helicos single – molecule sequencing device, HeliScope funguje na principu hybridizace fragmentů nukleových kyselin na primery, upevněné na náhodných pozicích skleněné plochy. Další báze začleněná do syntetizovaného vlákna, je určena na základě vyzařovaného signálu při sekvenaci syntézou. Tento systém analyzuje několik milionů fragmentů současně (Ansorge, 2009).

NGS technologie umožnily nahrazení DNA čipů, při mapování, vysoce výkonou sekvenací DNA a přímé odkazování do genomových databází (Ansorge, 2009).

Mnoho dalších sekvenačních technik je stále ještě ve vývoji. Jedna z velmi slibných technik je real – time jednomolekulová DNA sekvenace vyvíjená VisiGen Biotechnologies (Ansorge, 2009).

3.4 Akreditované genetické laboratoře testující maligní hypertermii u psů

Laboratoř Genomia, sídlící v Plzni, vyšetřuje psy metodou SOP172 – MH, přímou sekvenací DNA, z odebraného vzorku krve i bukálních stěrů. Test je proveden během 7 pracovních dnů, a jeho cena je 1 400 Kč včetně DPH (Genomia, 2016).

Laboratoř GenoCan, se sídlem v Brně, vyšetřuje psy sekvenací DNA z odebraných vzorků krve. Obvyklá doba vyšetření je 14 dní a cena 1 350 Kč včetně DPH (GenoCan, 2016).

Laboratoř LABOGEN je Českou pobočkou mezinárodní veterinární laboratoře Laboklin s hlavním sídlem v Německu, kam se všechny vzorky na testování sváží. Test je prováděn genetickým sekvenováním z 1 ml krve s EDTA. Délka trvání testu je 7 dní a cena je 1 553 Kč včetně DPH (Labogen, 2008).

Mnohé veterinární ordinace nabízí testování na maligní hypertermii z odebraných vzorků krve, které následně odesílají do některé z výše uvedených genetických laboratoří.

4 Materiál a metody

Molekulární detekce mutace genu *RYRI* byla provedena jednokapilárovým obousměrným sekvenováním a enzymatickým štěpením daného genu. Před samotnou detekcí byla zjišťována konkrétní poloha tripletu pomocí počítačového programu BioEdit. Sekvence genu *RYRI* byla zjištěna z mezinárodních databází dostupných na webových stránkách National Center for Biotechnology Information (NCBI) a databáze Ensembl, která je projektem European Bioinformatics Institute a Wellcome Trust Sanger Institute. K translaci DNA sekvence byl použit program ExPASy.

Na základě výzkumu Roberts et al. (2001) byla mutace lokalizována v exonu 15 v genu *RYRI*. Konkrétně se jedná o tranzici cytosinu na místo thyminu na pozici 1640. nukleotidu, což má za následek změnu kódu 201. tripletu, který je následně translatován na pozici 67. aminokyseliny jako alanin na místo valinu.

4.1 Gen RYR1 F a R primery

V databázích NCBI a Ensembl byl nalezen již osekvenovaný úsek genu *RYRI*, konkrétně od exonu 14 po exon 16. Sekvence, na které nasedá Forward (F) primer na exonu 14 a Reverse (R) primer na exonu 16 byly zjištěny z 1. tabulky (viz přílohy obrázek 8) práce M. C. Roberts et al. (2001, str. 718). V programu BioEdit byly následně nalezeny úseky pro nasedání výše uvedených primerů.

Nemutovaný úsek genu *RYRI* před sestřihem:

```
5'...TTCCCCAGGGGATGCTCTCCCTGGTCCTGAACTGTATTGACCGCCTAAAT
GTCTACACAACTGCTGCCACTTTGCGGAATTTGCAGGGGAGGAGGCAGCC
GAGTCCTGGAAAAGAGATTGTGAACCTGCTCTATGAACTCCTGGGTAAGGCGC
CCCATCCTGACTTCCCCTAGGGCCCCCAGAATCTCAGTCCCATTGGGTCTAACCCC
CTCTTTCCACCCTCAGCCTCCCTGATCCGTGGCAATCGTAGCAATTGTGCCCT
CTTCTCCACCAACTGGACTGGCTGGTCAGCAAGCTGGATAGGCTAGAGGC
CTCTTCTGGTAGGAGAACCCAAGGGGAGGGGATGGGGACTGGGGCGGGGGGGG
GCCACATTCCCCTCACCTGTCACTCTGCCATCTGCACAGGGATCCTGGAGGTGC
TGTACTGTGTCCTGATTGAGAGTCCTGAGGTGCTGAACATCATCCAAGAGAA
CCACATCAAGTCCATCATCTCCCTCCTGGACAAGCACGGGAGGAACCACAAG
GTTGGCCCCCCCACCC...3'
```

Šedě vyznačené úseky jsou exony (14,15,16) a nevyznačené úseky jsou introny. Úsek pro nasedání F primeru na exonu 14 je označen zeleně (5'...TGGTCCTGAACTGTATTGAC...3'), úsek pro nasedání R primeru na exonu 16 je vyznačen žlutě (3'...CCCTCCTGGACAAGCACG...5'). 201. triplet je místem C/T polymorfismu a je vyznačen červeně (5'...GTC...3').

Mutovaný úsek genu *RYRI* před sestřihem:

```
5'...TTCCCCAGGGGATGCTCTCCCTGGTCCTGAACTGTATTGACCGCCTAAAT
GTCTACACAACTGCTGCCCACTTTGCGGAATTTGCAGGGGAGGAGGCAGCC
GAGTCCTGGAAAGAGATTGTGAACCTGCTCTATGAACTCCTGGGTAAGGCGC
CCCATCCTGACTTCCCCTAGGGCCCCCAGAATCTCAGTCCCATTGGGTCTAACCCC
CTCTTTCCACCCTCAGCCTCCCTGATCCGTGGCAATCGTAGCAATTGTGCCCT
CTTCTCCACCAACCTGGACTGGCTGGCCAGCAAGCTGGATAGGCTAGAGGC
CTTTCTGGTAGGAGAACCCAAGGGGAGGGGATGGGGACTGGGGCGGGGGGGG
GCCACATCCCCTCACCTGTCACTCTGCCATCTGCACAGGGATCCTGGAGGTGC
TGTACTGTGTCCTGATTGAGAGTCCTGAGGTGCTGAACATCATCCAAGAGAA
CCACATCAAGTCCATCATCTCCCTCCTGGACAAGCACGGGAGGAACCACAAG
GTTGGCCCCCCCACCC...3'
```

Šedě vyznačené úseky jsou exony (14,15,16) a nevyznačené úseky jsou introny. Úsek pro nasedání F primeru na exonu 14 je označen zeleně (5'...TGGTCCTGAACTGTATTGAC...3'), úsek pro nasedání R primeru na exonu 16 je vyznačen žlutě (3'...CCCTCCTGGACAAGCACG...5'). 201. triplet je místem C/T polymorfismu a je vyznačen červeně (5'...GCC...3').

4.2 Izolace DNA

Vzorky pro izolaci DNA byly získány neinvazivní metodou za použití sterilních cytologických kartáčků. Byly provedeny stěry epiteliálních buněk bukálních sliznic psů.

DNA z bukálních stěrů byla izolována za použití kitu NucleoSpin Tissue XS (Machery – Nagel), dle výrobcem stanoveného návodu. Cytologický kartáček byl vložen do čisté zkumavky, a buňky bukálních sliznic byly rozloženy T1 pufrem a proteinázou. Po promíchání vzorku byla zkumavka vložena do termoboxu předeřhátého na 56 °C po dobu 15, za občasného promíchávání vibrační míchačkou. Následovalo přidání B3 pufru, promíchání vzorku a

opětovné vložení zkumavky do termoboxu při teplotě 70 °C na dobu 10 minut. Po vyndání kartáčku byl přidán 100 % etanol a vzorek vložen do centrifugy. Vzorek byl dále přenesen do zkumavky s křemíkovým filtrem, centrifugován a promýván BW a B5 pufrem. Po finální centrifugaci byl filtr přenesen do čisté zkumavky a promyt BE pufrem. Z filtru byl vzorek separován centrifugací, po které byl filtr vyjmut, výsledný vzorek byl uzavřen ve zkumavce a uložen k zamrazení.

4.3 Restrikční enzym *MscI* (*MslI*)

Mutace v exonu 15 (T1640C) představuje rozpoznávací sekvenci (5' ... TGGCCA...3') pro nasedání restrikčního enzymu *MscI* (*MslI*), který v případě přítomnosti substituce cytosinu na místo thyminu produkt PCR rozštěpí v místě 267 nukleotidu (Roberts et al., 2001). Výsledky práce M. C. Roberts et al., byly ověřeny programem WebCutter.

4.4 Složení premixu pro PCR

Po konzultaci bylo stanoveno složení premixu pro PRC (dále jen premix) na jeden vzorek následovně:

Komponent	Koncentrace
DNA 10 ng/ 1µl	30 ng . 12,5 µl ⁻¹
Pufr KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	200 µM
Primer F VPS13B-CZU2	0,4 µM
Primer R VPS13B-CZU2	0,4 µM
enhancer	2 mM
BSA	5 ng . 12,5 µl ⁻¹
TAQ polymeráza (5U)	0,7U . 12,5 µl ⁻¹

Tabulka 1: Stanovené složení a koncentrace jednotlivých komponentů, pro PCR amplifikaci, s použitím primerů RYR1 F a RYR1R

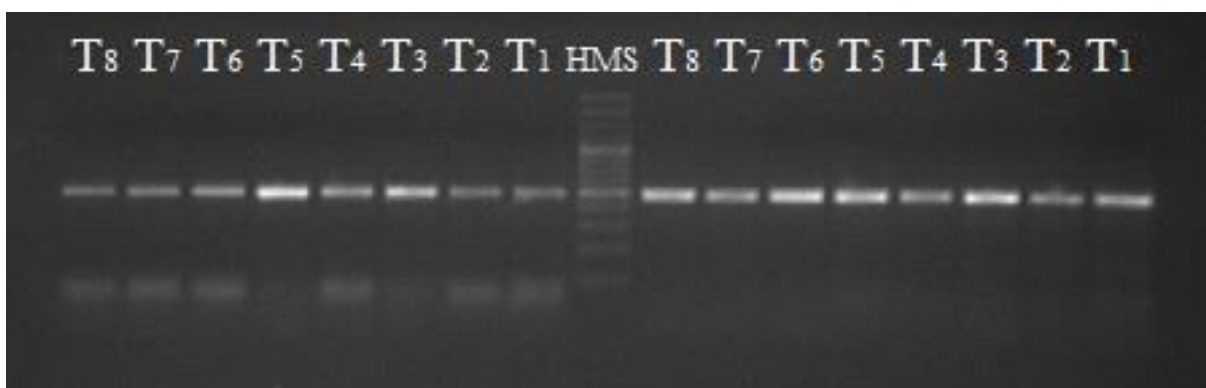
Objem jednoho vzorku DNA s premixem pro PCR byl 12,5 μ l. Po odečtení 3 μ l (objem jednoho vzorku DNA) byl zjištěn objem premixu potřebný na jeden vzorek DNA, tedy 9,5 μ l.

4.5 Program C 1000 RYR1

Pro zjištění ideální teploty pro nasedání primerů RYR1 F a RYR1 R bylo amplifikováno dvě sady po osmi vzorcích DNA dvou československých vlčáků.

Teplotní gradient byl navržen následovně:

T ₁	52,0 °C	T ₅	58,3 °C
T ₂	52,9 °C	T ₆	60,1 °C
T ₃	54,3 °C	T ₇	61,5 °C
T ₄	56,0 °C	T ₈	62,0 °C



Obrázek 1: Teplotní gradient T₁ - T₈ pro určení optimální teploty pro nasedání primerů RYR1 F a RYR1 R. Použity vzorky DNA dvou jedinců československého vlčáka (CSV). Vzorky odděleny GeneRuler 100 bp (HMS).

Výsledné produkty byly obarveny 2 μ l nanášecího pufru, a společně, s hmotnostním standardem (HMS), byly naneseny na 2% agarózový gel (3 g agarózy/ 150 ml 1 x TBE). Z výsledného elektroforeogramu (viz obrázek 1) byla vybrána teplota T₇ tedy 61,5 °C.

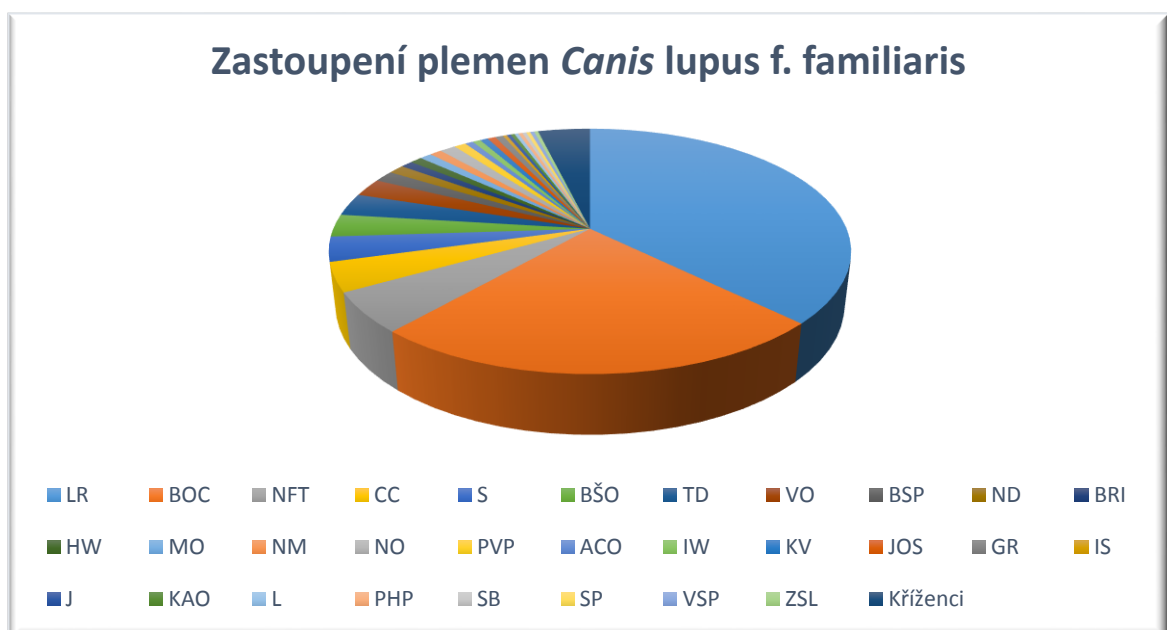
Po vybrání teploty byl v termocykleru nastaven program C 1000 RYR1 následovně:

Iniciace	95 °C	3 minuty	} 35 cyklů	1 cyklus
Denaturace	95 °C	30 sekund		
Annealing	61,5 °C	40 sekund		
Elongace	72 °C	1 minuta		
Finální elongace	72 °C	7 minut		1 cyklus
Fáze udržování	12 °C	∞		

4.6 Výběr plemen

Z dostupných vzorků DNA byla vybrána nejčastěji zastoupená plemena. Z celkového počtu 338 vzorků byla zastoupena plemena:

126 vzorků labradorský retrívr (LR)	2 vzorky australský honácký (ACO)
82 vzorků border kolie (BOC)	2 vzorky irský vlkodav (IW)
18 vzorků norfolk teriér (NFT)	2 vzorky knírač velký (KV)
13 vzorků cane corso (CC)	2 vzorky šarplaninský ovčák (JOS)
11 vzorků samojed (S)	2 vzorky zlatý retrívr (GR)
10 vzorků švýcarský bílý ovč.(BŠO)	1 vzorek irský setr (IS)
10 vzorků tibetská doga (TD)	1 vzorek jezevčík (J)
8 vzorků výmarský ohař (VO)	1 vzorek kavkazský pastevecký (KAO)
5 vzorků bernský salašnický pes (BSP)	1 vzorek leonberger (L)
4 vzorky německá doga (ND)	1 vzorek pyrenejský horský pes (PHP)
4 vzorky německý ovčák (NO)	1 vzorek svatobernardský pes (SB)
3 vzorky briard (BRI)	1 vzorek šarpej (SP)
3 vzorky hovaward (HW)	1 vzorek velký švýcarský salašnický pes (VSP)
3 vzorky maďarský ohař (MO)	1 vzorek západosibiřská lajka (ZSL)
3 vzorky neapolský mastin (NM)	13 vzorků Kříženci
3 vzorky portugalský vodní pes (PVP)	



Graf 1: Zastoupení vybraných plemen vzorků pro následné testování na mutaci v genu *RYR1*

4.7 Amplifikace vzorků DNA

Z výsledných produktů amplifikace bylo přeneseno 5,15 μl do nových PCR zkumavek, shodně označených, s původními, a uložených k zamrazení pro pozdější využití restriktivního enzymu *Msl*.

V každé původní zkumavce tedy zůstalo 7,35 μl výsledného produktu amplifikace. Ty byly následně obarveny 2 μl nanášecího pufru, a nanесeny na 2% agarózový gel společně s hmotnostním standardem.

Elektroforetická separace probíhala 60 minut při 100 V. Po 60 minutách byl gel vyjmut a vyfocen pomocí UV transiluminátoru.

4.8 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Hustota agarózového gelu je podmíněna velikostí fragmentů DNA. Velikost fragmentu genu *RYR1* ohraničeného RYR1 F až RYR1 R je 489 bp. Na základě této znalosti byl připraven 2% gel.

Do Erlenmeyerovy baňky byly naváženy 3 g agarózy na analytických vahách. V odměrném válci bylo odměřeno 150 ml 1x TBE (tris(hydroxymethyl)aminomethan, kyselina boritá, kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA). Tento objem byl přelit do Erlenmeyerovy baňky, a společně s magnetickým míchadlem byl roztok zahříván 3 - 5 minut v mikrovlnné troubě při 550 – 700 W, za občasného promíchání.

V průběhu zahřívání roztoku byla sestavena forma na gel. Bylo vloženo 5 hřebenů po 20 zubech.

Po rozpuštění veškeré agarózy byla baňka postavena na magnetickou míchačku pod digestoří, a bylo přidáno 12,5 μl EtBr. Po řádném promíchání a snížení teploty na přibližně 60 °C, bylo vyjmutο míchadlo pomocí magnetu, a gel nalit do formy. Tuhnutí gelu probíhalo 45 minut.

Vyjmutím hřebenů ze ztuhlého gelu bylo získáno 100 jamek pro nanášení obarvených produktů amplifikace. Forma s gelem byla přenesena do elektroforetické vany. Na poslední pozici každého řádku byl nanесen hmotnostní standard (HMS) složený z 8 μl H₂O, 1 μl GeneRuler100 bp DNA ladderu a 2 μl nanášecího pufru.

Elektroforetická separace probíhala při 120 V 40 minut, s průběžnou kontrolou po 20 minutách. Po 40 – 60 minutách byl gel přenesen na UV transiluminátor, kde bylo, za použití UV filtru, následně vyhodnoceno, zda amplifikace proběhla. Elektroforeogram byl pomocí UV transiluminátoru vyfocen a uchován pro následný výběr vhodných vzorků pro PCR - RFLP.

4.9 Restrikční štěpení

Všech 338 amplifikovaných vzorků bylo podrobena restrikčnímu štěpení za použití enzymu *MslI*.

Společně s restrikčním enzymem *MslI* byl dodán 10 x pufr R, a podrobný návod, dle kterého byl stanoven následující poměr premixu pro jeden vzorek:

Komponent	Objem (μl)
Produkt PCR	5,15 μl
H ₂ O	9 μl
10 x Pufr R	1 μl
<i>MslI</i>	0,5 μl

Tabulka 2: Složení komponentů premixu pro restrikční štěpení.

Objem premixu s restrikčním enzymem byl stanoven 10,5 μl na jeden vzorek. Premix byl přidáván ke vzorkům o objemu 5,15 μl, které byly dříve odebrány a zamraženy.

Označené zkumavky s restrikčním enzymem *MslI* a produktem PCR byly vloženy do termocykleru na 14 hodin při teplotě 37 °C. Na konci cyklu byl dle návodu enzym inaktivován teplotou 65 °C.

Výsledný produkt byl obarven 2 μl nanášecího pufru, a společně s hmotnostním standardem, nanesen na 4% agarózový gel (6g/200ml). Vyšší hustota gelu byla zvolena na základě velikosti produktu 268 bp, za předpokladu přítomnosti mutace, a tím i rozštěpení produktu enzymem *MslI*.

Po 60 minutách elektroforetické separace, při 100 V, byl gel vložen do UV transiluminátoru. Výsledné elektroforeogramy byly vyfoceny a porovnány s elektroforeogramy amplifikace.

4.10 Výběr vzorků pro jednokapilárovou obousměrnou sekvenaci

Z 338 vzorků, které, dle elektroforetické separace, prokazatelně amplifikovaly, bylo na sekvenaci vybráno šest vzorků. Primárním kritériem pro výběr vzorků pro sekvenaci byla zejména síla signálu pod UV transiluminátorem, tedy koncentrace DNA v daném vzorku. Druhotným kritériem byla různorodost zastoupených plemen. Po posouzení elektroforeogramů z předchozích amplifikací byly vybrány následující vzorky:

Číslo vzorku	Plemeno
24	Neapolský mastin
35	Labradorský retrívr
46	Tibetská doga
87	Border kolie
208	Knírač velký
216	Zlatý retrívr

Tabulka 3: Plemena vybraná na základě elektroforeogramů amplifikace pro sekvenaci.

4.11 Amplifikace vzorků na jednokapilárovou obousměrnou sekvenaci

Pro zvolený způsob obousměrné sekvenace (forward, reverse) bylo třeba připravit od každého vzorku dvě zkumavky, které byly označeny patričným číslem a zkratkou, F pro forwardovou sekvenaci ve směru $5' \rightarrow 3'$ a R pro reverzní sekvenaci ve směru $3' \rightarrow 5'$.

Do každé zkumavky byly přeneseny 2 μ l DNA příslušného vzorku. Ke každému vzorku DNA bylo přidáno 10,5 μ l premixu pro PCR dle výše uvedeného složení (kapitola 4. 4.). Na termocykleru byl nastaven program C 1000 RYR1.

Po proběhnutí amplifikace se ověřoval výsledek PCR pomocí elektroforetické separace na agarózovém gelu o koncentraci 1,5% (3 g/150 ml). Tato koncentrace byla zvolena v závislosti na velikosti fragmentu DNA (489 bp).

Z gelu byla následně vyříznuta část, ve které se nacházel aplikovaný vzorek produktu PCR. Jednotlivé vzorky se zbytkem gelu byly zváženy na analytických vahách. Od výsledné hmotnosti se odvíjelo množství chemikálií použitých pro následné rozpouštění agarózového gelu a čištění produktu PCR.

Číslo vzorku	Hmotnost (mg)
24	40 mg
35	100 mg
46	70 mg
87	110 mg
208	110 mg
216	50 mg

Tabulka 4: Hmotnost jednotlivých vzorků se zbytkem agarózového gelu.

4.12 Čištění vzorků pro jednokapilárovou obousměrnou sekvenaci

Při čištění vzorků DNA pomocí Gel/ PCR DNA Fragments Extraction kitu (dále jen kit), se postupovalo dle přiloženého návodu. Nejprve byly vzorky přeneseny do zkumavek (1,5 ml), které byly příslušně označeny. Ke každému vzorku bylo přidáno množství rozpouštěcího pufru v poměru 1:1 k hmotnosti příslušného vzorku. Zkumavky byly uzavřeny a přendány do termobloku předehřátého na 55 °C, kde probíhalo rozpouštění po dobu deseti minut, s protřepáním každé 2 minuty pomocí vibrační třepačky.

Po rozpuštění veškerého gelu, a vychladnutí roztoku na laboratorní teplotu, byl přidán izopropanol v poměru k váze příslušného vzorku 1:1.

Z rozpuštěného produktu jednotlivých vzorků bylo přeneseno 800 µl do označených GeneJET zkumavek s křemíkovým filtračním systémem. Zkumavky byly následně vloženy do centrifugy na 1 minutu při maximálních otáčkách. Po vyjmutí byl odfiltrovaný roztok odlit, přičemž požadovaný PCR produkt zůstal na křemíkovém filtru.

Následně bylo do zkumavek přidáno 160µl vazebného pufru a vše opět centrifugováno 1 minutu při maximálních otáčkách. Odfiltrovaný pufr byl odlit.

Do zkumavek bylo přidáno 700 µl promývacího pufru a vše centrifugováno po dobu jedné minuty při maximálních otáčkách. Po vylití odfiltrovaného pufru byla GeneJET zkumavka, přendána do 1,5 ml zkumavky, a vzorky byly naposledy centrifugovány 1 minutu při maximálních otáčkách.

Měření čistoty DNA bylo provedeno pomocí nakalibrovaného UV spektrofotometru.

Číslo vzorku	Hmotnost (mg)	Koncentrace ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
24	40 mg	9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
35	100 mg	7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
46	70 mg	15,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
87	110 mg	17 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
208	110mg	8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
216	50 mg	12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tabulka 5: Naměřené hodnoty hmotnosti a koncentrace jednotlivých vzorků.

4.13 Sekvenační reakce

Pro sekvenační reakci byl stanoven následující poměr reakční směsi

Komponent	Objem (μl)
DNA vyčištěná kitem	5 μl
sekvenační mix ABI	2 μl
1 μM primer	3,2 μl
sekvenační pufr ABI	4 μl
H ₂ O	5,78 μl

Tabulka 6: Koncentrace (μl) jednotlivých komponentů pro reakční směr.

Pro úspěšnou sekvenaci bylo nutno směs odsolit. Do každé zkumavky bylo přidáno 2 μl glykagenu a 52 μl premixu o následujícím složení:

Komponent	Objem (μl)
3 M octan sodný	2 μl
96 % etanol	50 μl

Tabulka 7: Objem (μl) komponentů směsi pro odsolení vzorků.

Po přidání premixu byly zkumavky zanechány k odstátí při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Po uplynulé době byly přendány do centrifugy na 30 minut při 13 200 otáčkách. Působením premixu došlo k vysrážení požadovaného PCR produktu, a centrifugací byl vysrážený produkt přichycen ke dnu zkumavky. Přebytný roztok byl odpipetován.

Do zkumavek s vysráženými produkty bylo přidáno 2 x 125 µl 70 % etanolu a zkumavky byly centrifugovány po dobu 15 minut při maximálních otáčkách.

Etanol byl odpipetován a předchozí krok byl ještě jednou opakován.

Pro odpaření zbytků etanolu, který působí jako inhibitor při kapilární sekvenaci, byly otevřené zkumavky umístěny do termobloku předehřátého na 50 °C po dobu 30 minut.

Následovala vizuální kontrola odpaření etanolu, a do zkumavek bylo přidáno 15 µl formamidu. Zkumavky byly umístěny do termocykleru, nastaveného na denaturaci, po dobu 7 minut.

Vzorky ošetřené výše zmíněnou procedurou byly podrobeny fragmentační analýze, prostřednictvím přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Parametry fragmentační analýzy	Hodnoty přístroje
Délka kapiláry	36 cm
Modul	GS STR POP4 (1 ml) G5
Polymer	POP4
Virtuální filtr	G5
Doba nástřiku	5 s
Napětí při nástřiku	15 kV
Teplota při separaci	60 °C
Napětí při separaci	15 kV
Doba separace	24 min

Tabulka 8: Parametry přístroje ABI 310 Genetic Analyzer, použitého na fragmentační analýzu.

4.14 Interpretace sekvenovaných fragmentů

Výsledky kapilární sekvenace byly interpretovány pomocí programu BioEdit.

Nejprve byly srovnány forwardové (F) sekvence ($5' \rightarrow 3'$) všech šesti vzorků. Následně byly přidány reversní (R) sekvence ($3' \rightarrow 5'$), které byly otočeny do směru $5' \rightarrow 3'$. Komplementaritou R a F sekvencí se ověřila úspěšnost sekvenace (viz obrázek 4).

Dále byl hledán úsek s C/T polymorfismem na pozici mezi 260 – 270 bp ($5' \dots$ TGGT/CCA... $3'$), pro potvrzení či vyloučení substituce v dané pozici.

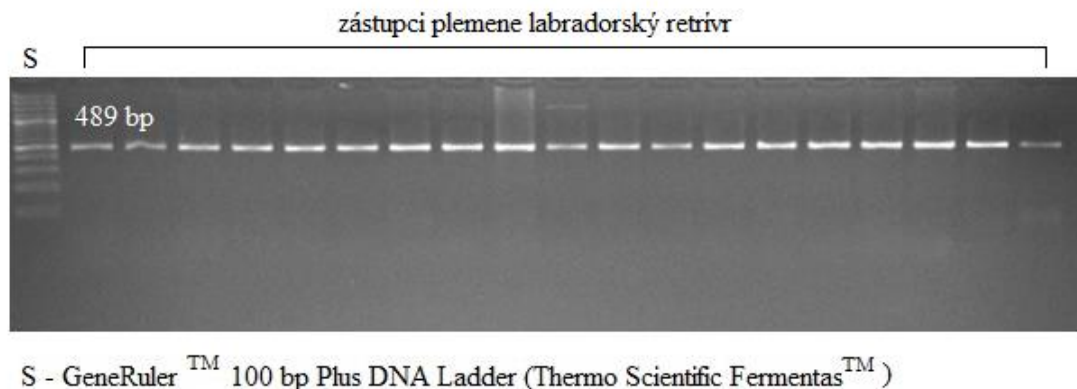
5 Výsledky

5.1 Detekce mutace za použití restrikčního enzymu *MslI*

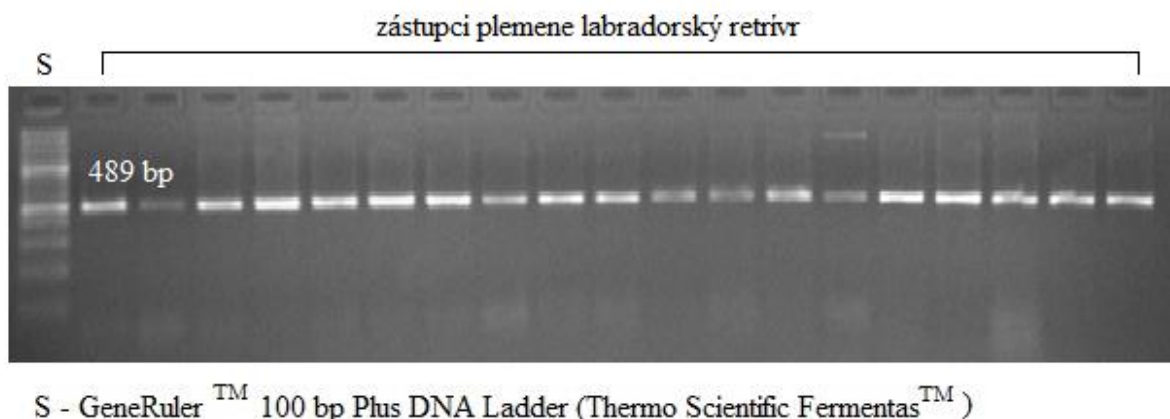
Amplifikované produkty PCR vybraných vzorků DNA byly vystaveny restrikčnímu enzymu *MslI*, rozpoznávajícímu sekvenci 5' ... TGGCCA...3' (viz kapitola 4. 9.). V případě přítomnosti mutace ve fragmentu genu *RYRI*, exon 14 až exon 16, by působením enzymu došlo k rozštěpení fragmentu na pozici 267 nukleotidu v exonu 15.

Výsledky elektroforetické separace ve formě elektroforeogramů skýtají možnost určení velikosti fragmentu s odchylkou +/- 50bp. Při porovnání pozic signálů jednotlivých vzorků, tedy velikostí fragmentů, s hmotnostním standardem (GeneRuler 100 bp) je patrné, že velikost fragmentu se blíží 500 bp (konkrétně 489 bp).

Porovnáním elektroforeogramů vzorků po PCR amplifikaci, a elektroforeogramů vzorků po štěpení restrikčním enzymem *MslI*, byla zjištěna velikost fragmentů před štěpením a po štěpení. Velikost všech fragmentů po štěpení se blížila 500 bp.



Obrázek 2: Elektroforeogram vzorků LBR po PCR amplifikaci. Po odečtení hodnot velikostí vzorků z GeneRuler, je patrné, že velikost fragmentů se blíží 500 bp. Tato hodnota odpovídá předchozímu určení velikosti fragmentu (489 bp) v programu BioEdit.



Obrázek 3: Elektroforeogram vzorků LBR po štěpení restriční enzymem *MisI*. Po odečtení velikosti fragmentů z GeneRuler, která se blíží velikosti 500 bp, je patrné, že v žádném ze vzorků nedošlo k rozštěpení fragmentu.

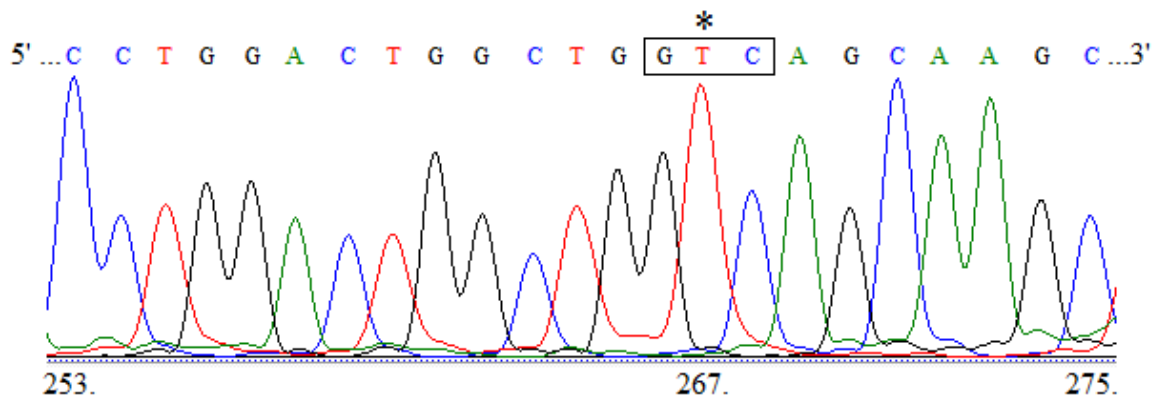
V žádném z testovaných vzorků fragmentů genu *RYRI* nedošlo k rozštěpení fragmentu na pozici 267. nukleotidu, což znamená, že se v 201. tripletu exonu 15 nachází thymin. Tento závěr byl doložen výsledky jednokapilárové obousměrné sekvenace vybraných vzorků, uvedenými v následující kapitole.

5.2 Detekce mutace jednokapilárovou obousměrnou sekvenací

Osekvenované fragmenty genu *RYRI* vybraných jedinců byly zpracovány v programu BioEdit (viz kapitola 4. 14.). Po potvrzení komplementarity vláken, u všech šesti fragmentů DNA, byly zjištěny genotypy testovaných jedinců (viz tabulka 9). Všichni jedinci byli homozygoti, tudíž mají pro daný znak obě alely stejné.

Číslo vzorku	Plemeno	Pohlaví	Genotyp
24	Neapolský mastín	Pes	Homozygot
35	Labradorský retrív	Neznámé	Homozygot
46	Tibetská doga	Fena	Homozygot
87	Border kolie	Fena	Homozygot
208	Knírač velký	Fena	Homozygot
216	Zlatý retrív	Fena	Homozygot

Tabulka 9: Genotypy vybraných jedinců, zjištěné prostřednictvím programu BioEdit, při interpretaci výsledků jedno kapilárové obousměrné sekvenace.



Obrázek 4: Chromatogram sekvenace exonu 15 genu RYR1. Vybraný úsek 253. - 275. nukleotidu, zahrnuje kandidátní úsek, 201. triplet (v černém rámečku), pro vznik T/C polymorfismu na pozici 267. nukleotidu (vyznačeno hvězdičkou). Žádný z testovaných jedinců nenesl mutaci v této oblasti.

Z výsledného chromatogramového záznamu sekvenace všech šesti testovaných jedinců, byl vybrán úsek 253. – 275. nukleotidu, ve kterém byl vyznačen 201. triplet 5' ...GTC...3'. U všech jedinců byl na pozici 267. nukleotidu přítomen thymín, z čehož vyplývá, že se v tomto tripletu nenachází mutace způsobující maligní hypertermii.

5.3 Shrnutí výsledků

Všech 338 vybraných jedinců bylo podrobena detekci mutace restrikčním štěpením za pomoci enzymu *MslI*. U žádného z nich nebyla přítomnost mutace prokázána.

Ze vzorků, které byly testovány enzymatickým štěpením, bylo podle stanovených kritérií (viz kapitola 4. 10.), vybráno 6 vhodných jedinců, pro sekvenaci. V žádném fragmentu DNA těchto šesti jedinců nebyla nalezena hledaná mutace.

Jelikož výsledky obou, na sobě nezávislých, detekcí přinesly stejné výsledky, lze s jistotou vyloučit chybný postup či nesprávnou aktivitu enzymu *MslI*.

Žádný z testovaných psů nenesl v genu *RYR1*, konkrétně v exonu 15 v 201. tripletu na pozici 267. nukleotidu nukleovou bázi cytosin.

U žádného z testovaných psů nebyla detekována mutace způsobující maligní hypertermii.

6 Diskuze

Postup této práce byl navržen na základě práce Roberts et al. (2001), a v mnoha bodech bylo postupováno obdobně. Zejména při výběru vhodných R a F primerů. Avšak při předběžném určení polohy dané mutace byl zjištěn rozdíl velikosti o 1 bp. Roberts et al. (2001) uvádí pozici mutace 268. nukleotid, v průběhu této práce však byla pozice mutace určena na 267. nukleotid. Stejně tak se lišila i celková velikost značeného fragmentu, a to o 2 bp. Výsledky získané při řešení bakalářské práce byly opakovaně potvrzeny sekvenční analýzou, kde byl získán amplicon o přesné velikosti 489 bp. Z práce Roberts et al. (2001) byla očekávána velikost ampliconu 487 bp.

Většina pokusů o detekci mutace způsobující maligní hypertermii byla prováděna na speciálně vyšlechtěných liniích, v jejichž parentální generaci byl alespoň jeden rodič nositelem dominantní alely s mutací podmiňující maligní hypertermii (Roberts et al., 2001). Naproti tomu v této práci byli testováni jedinci s neznámým genotypem vybíráni náhodně. U žádného z vybraných jedinců nebyla známá anamnéza. Lze však předpokládat, že mnoho z nich podstoupilo, alespoň jednou v životě, celkovou anestezii. Přibližně polovina testovaných jedinců bylo chovných psů nebo psů určených k asistenčním aktivitám, z čehož se dá usoudit, že podstoupili anestezii minimálně při rentgenovém vyšetření kyčlí. Vzhledem k tomu, že u těchto jedinců, kteří podstoupili celkovou anestezii, nebyl zjištěn žádné symptomy odpovídající maligní hypertermii, bylo možné usuzovat, že se kauzální mutace genu *RYRI* u těchto zvířat nevyskytovala.

O složení současně využívaných anestetik byla vedena konzultace s několika veterinárními lékaři. Nežádoucí účinky halotanu jsou známé, a proto je často nahrazován méně zatěžujícím isofluranem. Přesto je halotan stále hojně využíván jako volatilní anestetikum. Naproti tomu sukcinilcholin se využívá stále jako myorelaxant. Vzhledem k nedostatku informací o věku a anamnéze těchto jedinců není možné s jistotou říci, zda byli vystaveni volatilním anestetikům či myoralaxantům.

Z výsledku této práce, při které nebyla mutace detekována u více než 300 psů různých plemen, plyne fakt, že maligní hypertermie není tak častou hrozbou, jak informují některé genetické laboratoře či veterinární ordinace. Při porovnání s prevalencí v lidské populaci lze konstatovat, že se jedná o vzácnou mutaci. Tomu nasvědčuje i fakt, že v Americe při detekci této mutace nebyla testována jednotlivá plemena, ale byla vyšlechtěna speciální linie, v níž byl alespoň jeden zakladatel nositelem této mutace

(Roberts et al., 2001). V kynologických chovatelských klubech České republiky není test na maligní hypertermii vyžadován jako přijímací kritérium, což jednak ukazuje na vzácnost této mutace, ale také na nespecifičnost mutace pro konkrétní plemeno. Tato tvrzení byla potvrzena (duben 2016) při konzultaci s akreditovanou genetickou laboratoří Laboklin, v zastoupení Ing. A. Lacinové.

O vyšlechtění speciální linie, pro zkoumání maligní hypertermie, lze polemizovat a to zejména z etického hlediska. Pečlivou selekcí a křížením jedinců byla získána všechna současná plemena, s různými požadavky na vzhled a povahu. Avšak záměrné křížení jedinců prokazatelně nemocných, může být považováno za neetické. Obzvláště pokud přihlédneme k doloženému faktu možnosti mrtvě narozených jedinců, 70% úmrtnosti a celkovým komplikacím při projevech doprovázejících maligní hypertermii. K přehodnocení negativního názoru na toto křížení však může přispět fakt, že maligní hypertermie nijak neovlivňuje život jedince nesoucího příslušnou mutaci, do doby pokud není vystaven spouštěčům akutního stavu. Proti tomuto tvrzení lze použít argument, že ve vzácných případech může akutní syndrom maligní hypertermie vyvolat i extrémní fyzická či psychická zátěž zvýšená teplota. Bohužel pro tyto případy nejsou doloženy statistiky (Jurkat-Rott et al. 2000); (Gronek et al. 2000); (Roberts et al. 2001).

Zacházení s jedinci ze speciálně vyšlechtěných linií, je z etického hlediska také spekulativní. U psů docházelo k záměrnému vyvolávání symptomů, avšak za odborného dohledu specialistů, přísného měření srdečního tepu, tělesné teploty a dechové frekvence. Při manifestaci symptomů byl včasné podán dantrolen, který inhibuje účinky halotanu a sukcinylcholinu (Roberts et al. 2001); (Gronek et al. 2000). Všichni psi, včetně mrtvě narozených jedinců, byli podrobena biopsii, kvůli získání vzorků pro In vitro kontraktilní test a halotan-kofeinovou zkoušku. Biopsie byla prováděna za celkové intravenózní anestezie se současnou intubací a mechanickou plicní ventilací. Pro všechna testování bylo třeba schválení od příslušného státu a univerzity, kde výzkum probíhal. Podmínky zacházení se psy mimo testovací čas, a jejich následný osud nebyl uveden (Roberts et al. 2001).

Doporučení komerčních genetických laboratoří, je provádět test na maligní hypertermii u jedinců všech plemen, kteří se chystají k veterinárnímu zákroku za podání anestezie, nebo k zařazení do chovu. Toto vyšetření se pohybuje v rozmezí od 900 – 1600 Kč. Po zhodnocení informací vedoucích k závěru, že se jedná o vzácnou mutaci,

podloženou vyjádřením jedné z genetických laboratoří, a faktu, že test není vyžadován pro přijetí do chovatelských klubů, je patrné, že doporučené testování jedinců bez maligní hypertermie v rodinné anamnéze, je komerčním tahem genetických laboratoří. Po přihlídnutí k dostupnosti a stále klesající ceně genetického sekvenování, jenž je využíváno k detekci mutace výše zmíněnými laboratořemi, se požadovaná cena zdá neadekvátní.

7 Závěr

Byl vypracován ucelený souhrn poznatků o maligní hypertermii z pohledu historického, klinického, genetického i diagnostického. Z literárního přehledu lze vyvodit následující výsledky.

Jedinci s diagnózou maligní hypertermie žijí naprosto normální život. Pokud o své diagnóze ví, a ví o ní i ošetřující veterinární lékař, je riziko vzniku akutního syndromu maligní hypertermie velmi nízké. Jedinci, kteří nesou mutaci, způsobující maligní hypertermii, a neví o ní, jsou vystaveni velmi vážnému riziku při podstoupení anestezie. Avšak ze statistik uvedených v bakalářské práci vyplývá, že pokud pacient nepochází z rodiny, ve které se maligní hypertermie vyskytuje, je pravděpodobnost náchylnosti k maligní hypertermii velice malá.

Mutace způsobující maligní hypertermii je velice vzácná. Což je potvrzené výsledky této práce, kdy bylo testováno přes 300 zástupců více než 30 plemen. Zároveň to potvrzují i statistické průzkumy specializovaných institucí a akreditované genetické laboratoře.

Variabilita možností molekulární detekce mutace je velká, vzhledem k neustálému pokroku v metodách genetického sekvenování.

Navržený postup byl na základě genetické sekvenace, což je způsob, kterým provádějí testování i akreditované genetické laboratoře.

8 Bibliografie

A Protocol For The Investigation Of Malignant Hyperpyrexia (Mh) Susceptibility 1984.
. BJA: British Journal of Anaesthesia. 56 (11). 1267-1271. ISSN: 0007-0912.

Abreu, A. et al.. 2010. Use of the caffeine-halothane contracture test for the diagnosis of malignant hyperthermia in Brazil. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 43 (6). 549-556. ISSN: 1414-431x.

Ahmadian, A., Ehn, M., Hober, S.. 2006. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. Clinica Chimica Acta. 363 (1-2). 83-94. ISSN: 00098981.

Alberts , B. et al.. 2015. Analyzing an Manipulating DNA. Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff a Peter Walter. Molecular biology of the cell. Sixth edition. Garland Science. New York, NY. s. 463 - 484. ISBN: 978-0-8153-4432-2.

Anderson - Pompa, K. et al.. 2008. Genetics and Susceptibility to Malignant Hyperthermia. Critical Care Nurse. 28 (6). 32-36. ISSN: 0279-5442.

Ansorge, W. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. New Biotechnology. 25 (4). 195-203. ISSN: 18716784.

Avila, G., Dirksen, R.. 2001. Functional Effects of Central Core Disease Mutations in the Cytoplasmic Region of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. The Journal of General Physiology. 118 (3). 277-290. ISSN: 0022-1295.

Barash, P. 2009. Clinical Anesthesia. Barash, Paul. Clinical anesthesia. 6th ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams. Philadelphia. s. 598-613. ISBN: 0781787637.

Beyer, A., Bandyopadhyay, S., Ideker, T.. 2007. Integrating physical and genetic maps: from genomes to interaction networks. Nature Reviews Genetics. 8 (9). 699-710. ISSN: 1471-0056.

Brandom, B. 2006. Genetics of Malignant Hyperthermia. The Scientific World JOURNAL. 6. 1722-1730. ISSN: 1537-744x.

Britt., . (ed.) 1987. Malignant Hyperthermia. Springer US. Boston, MA. ISBN: 978-146-1320-791.

- Britt, B., Kalow, W.. 1970. Malignant hyperthermia: A statistical review. Canadian Anaesthetists' Society Journal. Springer - Verlag. Winnipeg. 17 (4). 293-315. ISSN: 0008-2856.
- Brody, J., Kern, S.. 2004. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Analytical Biochemistry. 333 (1). 1-13. ISSN: 00032697.
- Carlson, R. 2010. A Short History of Sequencing Technologies. Carlson, Robert H. Biology is technology the promise, peril, and new business of engineering life 1. Harvard University Press. Cambridge, Mass. s. 73-76. ISBN: 9780674053625.
- Clark, D., Pazdernik, N.. 2012. Polymerase Chain Reaction. Clark, David P. a Nanette J. Pazdernik. Molecular Biology. 2. Elsevier. Amsterdam. s. 164 - 190. ISBN: 9780123785954.
- FAQs: General MH Question 2016. . Malignant Hyperthermia Association of the United States[online]. North American Registry of MHAUS. Pittsburg. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z <<http://www.mhaus.org/faqs/about-mh>>
- GenoCan, . 2016. Genetický test na maligní hypertermii. GenoCan: Canis genetics [online]. GenoCan. Brno. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <<http://genocan.eu/m/geneticke-testy-17/geneticky-test-na-maligni-hypertermii-23/>>
- Genomia, . 2016. Maligní hypertermie. Genomia [online]. Genomia. Plzeň. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <<http://www.genomia.cz/cz/test/mh>>
- GenRex, . 2015. Maligní hypertermie. GenRex [online]. GenRex. Rožtoky. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <<http://www.genrex.cz/sluzby/maligni-hypertermie>>
- Glenn, T. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. Molecular Ecology Resources. 11 (5). 759-769. ISSN: 1755098x.
- Gronek, P. et al.. 2000. Sequence polymorphism of exon 17 of the ryanodine receptor gene (ryr1) in the Canidae. Journal of Animal and Feed Sciences. Kielanowski Inst Animal Psychology Nutrition. Ul Instytutcka3,05-110 Jablonna, Poland. 9 (4). 721-726. ISSN: 1230-1388.
- Jurkat-Rott, K., Lehmann - Horn, F., McCarthy, T.. 2000. Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. Muscle & Nerve. Wiley. New York. 23 (1). 4-17. ISSN: 0148-639X.

- Labogen, . 2008. Maligní hypertermie. LABOGEN [online]. webDa Medien GmbH. Česká republika. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <http://www.labogen.cz/index.php?page=pages/html/cz/geneticdiseases/dog/pes_maligni_hypertermie.html>
- Lewis, M. 2015. Agarose gel electrophoresis: Basic metod. Methodbook [online]. Department of Pathology. Liverpool. [cit. 2016-04-07]. Dostupné z: <<http://www.methodbook.net/dna/agarogel.html>>
- Loke, J., MacLennan, D.. 1998. Bayesian Modeling of Muscle Biopsy Contracture Testing for Malignant Hyperthermia Susceptibility. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. Lippincott - Raven. 88 (3). 589-600.
- Mellersh, C. et al.. 2000. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammalian Genome*. 11 (2). 120-130. ISSN: 0938-8990.
- Národní centrum pro diagnostiku maligní hypertermie, . 2006. Maligní hypertermie: Informace o nemoci. In: Národní centrum pro diagnostiku maligní hypertermie: Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně: anesteziologicko-resuscitační klinika [online]. Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně. Brno. [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <<http://www.mhinfo.cz/info.htm>>
- Nelson, T. 1991. Malignant hyperthermia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 198 (6). 989-994.
- Nucleics, . 2016. DNA Sequencing Protocol Tips. Nucleics [online]. Nucleics. Sydney. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <https://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/dna-sequencing-protocol-tips.html>
- O'Brian, P. et al.. 1984. Canine Malignant Hyperthermia Susceptibility: Erythrocytic Defects - Osmotic Fragility, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Abnormal Ca²⁺ Homeostasis. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 1984 (484). 381-389. ISSN: 0008-4050.
- Ohnishi, S., Ohnishi, T.. 1994. History. Ohnishi, S. Tsuyoshi a Tomoko Ohnishi. *Malignant hyperthermia: a genetic membrane disease*. 1. CRC Press. Boca Raton. s. 70-71. ISBN: 0849380936.

- Primer Search 2014. . BOLDSystem [online]. S. Herbert. Canada. [cit. 2016-04-07].
Dostupné z: <http://www.boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch>
- Ratnasingham, S., Hebert, P.. 2007. Barcoding: bold. *Molecular Ecology Notes*. 7 (3).
355-364. ISSN: 14718278.
- REBASE: The Restriction Enzyme Database [online] 2009. [online]. New England
Biolabs. Ipswich. [cit. 2016-04-07]. Dostupné z:
<<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>>
- Roberts, M. et al.. 2001. Autosomal Dominant Canine Malignant Hyperthermia Is
Caused by a Mutation in the Gene Encoding the Skeletal Muscle Calcium Release
Channel (RYR1). *American Journal of Human Genetics*. Univ Chicago Press. Chicago.
69 (4). 716-725. ISSN: 0002-9297.
- Roberts, R. et al.. 2009. REBASE--a database for DNA restriction and modification:
enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*. 38 (). 234-236. DOI:
10.1093/nar/gkp874. ISSN: 0305-1048. Dostupné také z:
<<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkp874>>
- Saiki, R. et al.. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a
thermostable DNA polymerase. *Science*. 239 (4839). 487-491.
- Saiki, R. et al.. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and
restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230 (4732). 1350-
1354. ISSN: 0036-8075.
- Stellwagen, N. 2009. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and
in free solution. *ELECTROPHORESIS*. 30 (1). 188-195. ISSN: 01730835.
- Tobin, J. et al.. 2001. Malignant Hyperthermia and Apparent Heat Stroke. *JAMA*. 286
(2). 168-169. ISSN: 0098-7484.
- Urwyler, A. et al.. 2001. Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to
malignant hyperthermiadagger. *British Journal of Anaesthesia*. 86 (2). 283-287.ISSN:
14716771.

9 Seznam příloh

Obrázek 5: Seznam vybraných *RYR1* mutací, potencionálně způsobující náchylnost k maligní hypertermii a myopatii. Konkrétní pozice exonů a tripletů, rozdílné translace aminokyselin v důsledku změny v tripletu. Zahrnuty výsledky IVKT, fenotyp zjištěný IVKT a sekvenací. Převzato z Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to Malignant hyperthermia (Urwyler et al., 2001) str 284.

Obrázek 6: Výsledky testovaných genotypů vyšlechtěné linie. MHS jedinci jsou vyznačeni černě, MHN jedinci jsou vyznačeni bíle, jedinci neznámého fenotypu (v důsledku prenatalního úmrtí) jsou vyznačeny otazníkem. Haplotyp zakladatele linie (A - 10) je uveden v boxu B. MHS a MHN diagnóza byla stanovena IVKT a CHCT. Jedinec č. 4-5405 je tzv. wild type. Jedinec č. 5-5439 je důkazem o dominantní dědičnosti. U jedinců 3-5350 a 7-5483 jsou znázorněny proximálně telemetrické pozice, a jsou důkazem toho že MHS mutace je vložena mezi dvěma markery, konkrétně REN143K19 a FH2294. Tento závěr potvrzuje i obrázek č. 7. Převzato z práce Autosomal Dominant Canine Malignant Hyperthermia Is Caused by a Mutation in the Gene Encoding the Skeletal Muscle Calcium Release Chanel (RYR1) str. 719 (Roberts et al., 2001).

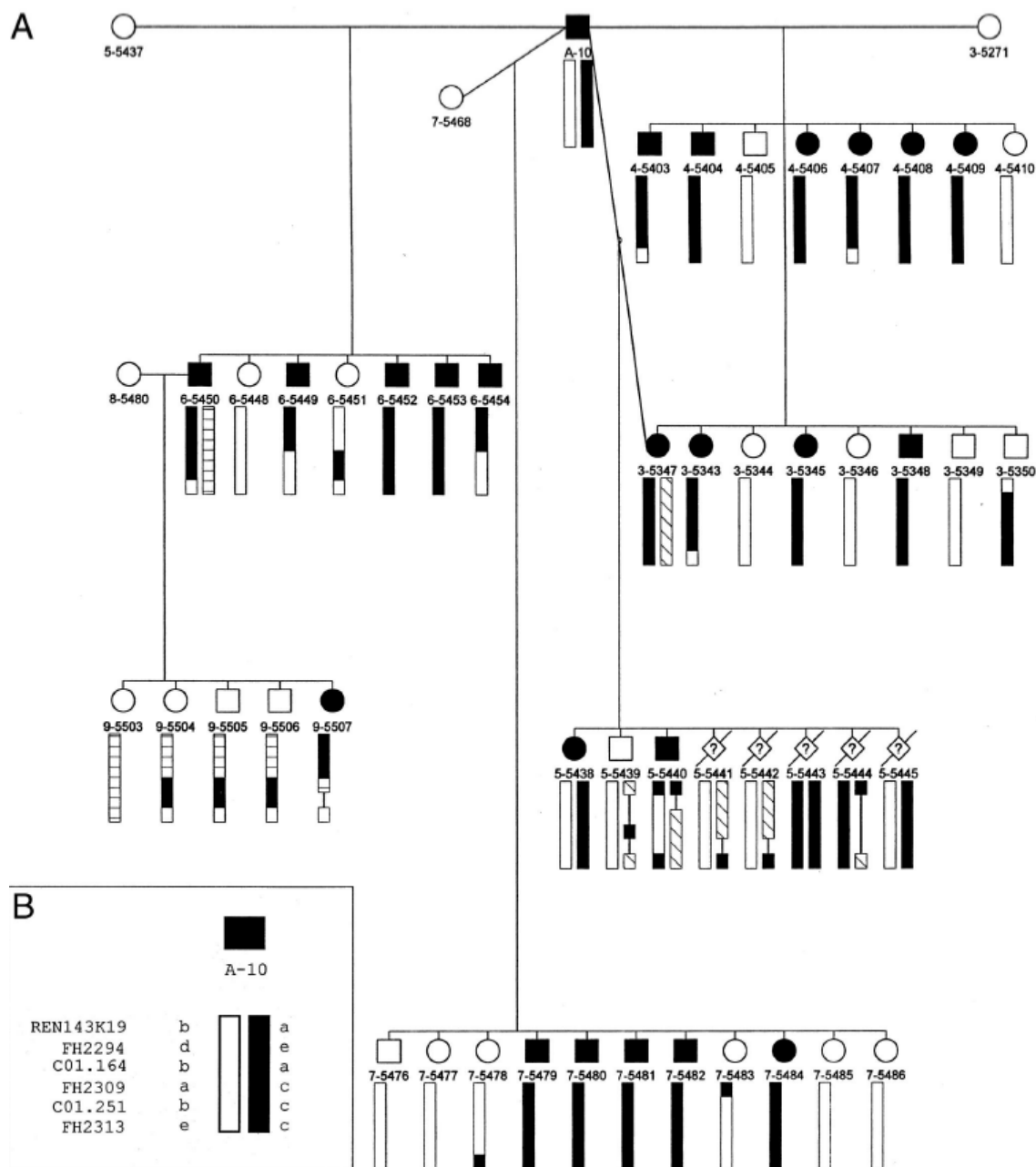
Obrázek 7: Porovnání CFA01 mapy MH šlechtěné linie (vzdálenost v centiMorganech) a celým genomem (vzdálenost v centyRayích). MHS značí lokus nesoucí mutaci pro MHS. Převzato z práce Autosomal Dominant Canine Malignant Hyperthermia Is Caused by a Mutation in the Gene Encoding the Skeletal Muscle Calcium Release Chanel (RYR1) str. 719 (Roberts et al., 2001).

Obrázek 8: Sekvence pro nasedání primerů R a F. Byl vybrán PCR produkt RYR1 – 1416. Převzato z práce Autosomal Dominant Canine Malignant Hyperthermia Is Caused by a Mutation in the Gene Encoding the Skeletal Muscle Calcium Release Chanel (RYR1) str. 716 (Roberts et al., 2001).

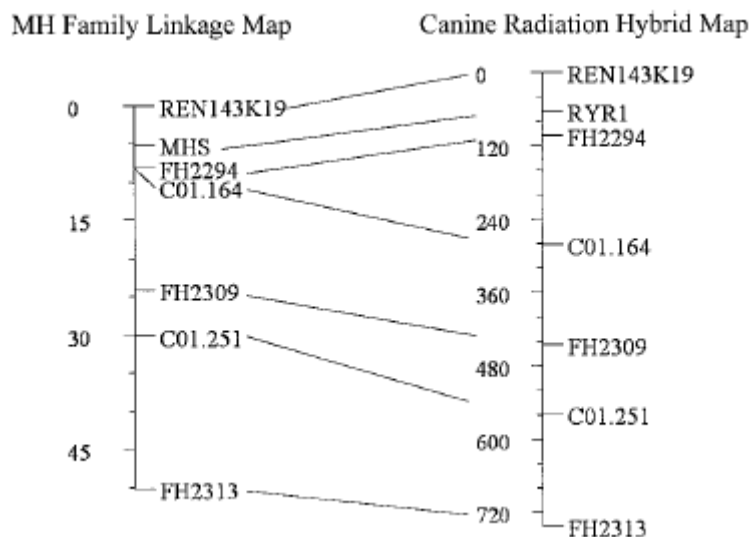
10 Přílohy

Exon	Mutation position codon change	RYR1 amino acid change	Functional comparison with wild-type RYR1		Phenotype	Estimated incidence	Reference
			Caffeine sensitivity	Halothane sensitivity			
2	103TGC→CGC	Cys35→Arg	no difference	increased	MHS	one family	4
6	487CGC→TGC	Arg163→Cys	increased	increased	MHS and/or CCD	2%	5
9	742GGG→AGG	Gly248→Arg	increased	increased	MHS	one family	6
11	1021GGG→AGG	Gly341→Arg	increased	increased	MHS	6 – 10%	7
12	1209ATC→ATG	Ile403→Met	increased	increased	CCD; MHS unknown	one family	5
14	1565TAT→TCT	Tyr522→Ser	increased	increased	MHS and/or CCD	one family	8
15	1654CGG→TGG	Arg552→Trp	increased	increased	MHS	one family	9
17	1840CGC→TGC	Arg614→Cys	increased	increased	MHS	4 – 9%	10
17	1841CGC→CTC	Arg614→Leu	increased	increased	MHS	2%	11
39	6487CGC→TGC	Arg2163→Cys	increased	increased	MHS	4%	12
39	6488CGC→CAC	Arg2163→His	increased	increased	MHS and/or CCD	one family	12
45	7300GGA→AGA	Gly2434→Arg	increased	increased	MHS	4–10%	13–15
45	7304CGC→CAC	Arg2435→His	increased	increased	MHS and/or CCD	one family	16
46	7372CGC→TGC	Arg2458→Cys	increased	increased	MHS	4%	17
46	7373CGC→CAC	Arg2458→His	increased	increased	MHS	4%	17

Obrázek 5: Seznam vybraných RYR1 mutací, potencionálně způsobující náchylnost k maligní hypertermii a myopatii. Konkrétní pozice exonů a tripletů, rozdílné translace aminokyselin v důsledku změny v tripletu. Zahrnuty výsledky IVKT, fenotyp zjištěný IVKT a sekvenací. Převzato z Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to Malignant hyperthermia (Urwyler et al., 2001) str 284



Obrázek 6: Výsledky testovaných genotypů vyšlechtěné linie. MHS jedinci jsou vyznačeni černě, MHN jedinci jsou vyznačeni bíle, jedinci neznámého fenotypu (v důsledku prenatalního úmrtí) jsou vyznačeny otazníkem. Haplotyp zakladatele linie (A - 10) je uveden v boxu B. MHS a MHN diagnóza byla stanovena IVKT a CHCT. Jedinec č. 4-5405 je tzv. wild type. Jedinec č. 5-5439 je důkazem o dominantní dědičnosti. U jedinců 3-5350 a 7-5483 jsou znázorněny proximálně telemetrické pozice, a jsou důkazem toho že MHS mutace je vložena mezi dvěma markery, konkrétně REN143K19 a FH2294. Tento závěr potvrzuje i obrázek č. 7., převzatý z práce Autosomal Dominant Canine Malignant Hyperthermia Is Caused by a Mutation in the Gene Encoding the Skeletal Muscle Calcium Release Chanel (RYR1) str. 719 (Roberts et al., 2001).



Obrázek 7: Porovnání CFA01 mapy MH šlechtěné linie (vzdálenost v centiMorganech) s celým genomem (vzdálenost v centyRayích). MHS značí lokus nesoucí mutaci pro MHS. Převzato z práce Autosomal Dominant Canine Malignant Hyperthermia Is Caused by a Mutation in the Gene Encoding the Skeletal Muscle Calcium Release Chanel (RYR1) str. 719 (Roberts et al., 2001).

PCR Product	Primer Sequence		Product Size (bp)
	Forward	Reverse	
RYR1-1	GCT CGA CAT CAT GGG TGA CG human bases 96–115	TAG TAG ACA ACT CTG GGC TG human bases 842–823	746
RYR1-2	TGT GGA ACA TGA ACC CCA TCT human bases 698–718	TTG CTC TGC TTC TCC TCG TG human bases 1502–1483	804
RYR1-3	TTC ATC AAG GGC CTG GAC AG human bases 1342–1361	TCC ACC ATC ACC TCA AAG TAC human bases 2108–2088	759
RYR1-4	GGA GTA TTT CTG TCA CCA AG human bases 5931–5950	GGG TGT TGG TAG AAG ACT TT human bases 6686–6667	755
RYR1-5	CTG CTG ATC CTG CAG ATC GG human bases 6595–6614	GCT CGA TCA AGG CAG CAT AC human bases 7396–7377	801
RYR1-6	TAC CTG GAC TTC CTG CGC TT human bases 7093–7112	AAC TCG TTA AGG ATC CCG AC human bases 8009–7990	916
RYR1-1416	TGG TCC TGA ACT GTA TTG AC	CGT GCT TGT CCA GGA GGG	487

Obrázek 8: Sekvence pro nasedání primerů R a F. Byl vybrán PCR produkt RYR1 – 1416. Převzato z práce Autosomal Dominant Canine Malignant Hyperthermia Is Caused by a Mutation in the Gene Encoding the Skeletal Muscle Calcium Release Chanel (RYR1) str. 716 (Roberts et al., 2001).