

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Mutace genu FGF5 a jejich vztah k délce srsti u vybraných plemen psů využívaných pro asistenční aktivity

Bakalářská práce

Autor práce: Michaela Špačková

Obor studia: Zoorehabilitace a asistenční aktivity se zvířaty

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Mutace genu FGF5 a jejich vztah k délce srsti u vybraných plemen psů využívaných pro asistenční aktivity" 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 18. 4. 2018 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za pomoc při vypracování této práce a za jeho odborné znalosti a ochotu, dále bych chtěla velmi poděkovat Ing. Daniele Čílové, za pomoc s vypracováním celé práce, ochotu, trpělivost a velmi dobré rady.

Mutace genu *FGF5* a jejich vztah k délce srsti u vybraných plemen psů využívaných pro asistenční aktivity

Souhrn

V této bakalářské práci byla řešena mutace genu *FGF5* a její vliv na délku srsti u vybraných plemen.

První část práce, literární rešerše, je zaměřena na typy, délku a strukturu psí srsti a na geny, které tyto vlastnosti ovlivňují. Zejména na gen *FGF5*, jehož mutace je zodpovědná za dlouhosrstý fenotyp u mnoha druhů zvířat.

V druhé, experimentální části práce byl tento gen zkoumán. Byly vybrány 2 mutace, které by mohly být zodpovědné za dlouhosrstý fenotyp. Substituční mutace *FGF5:c.284G>T*, která na 284 místě v nukleotidové sekvenci provádí výměnu guaninu za tymin a duplikace *FGF5:c.145_150dupACCAGC*, která duplikuje 6 nukleotidový úsek DNA. Obě tyto mutace se nacházejí v exonu 1 genu *FGF5*.

Vybraná plemena pro experimentální část byla německý ovčák, labradorský retriever, zlatý retriever, border kolie, bearded kolie jakožto zástupci plemen využívaných pro asistenční aktivity a československý vlčák, vybraný jako kontrastní plemeno, nevhodné pro asistenční aktivity, u kterého se ale v poslední době ve větší míře objevují dlouhosrstí jedinci.

Experiment byl proveden na DNA, získané z bukalních stěrů, získané od 30 zástupců plemene německý ovčák, 30 zástupců labradorských retrieverů, 30 zástupců zlatých retrieverů, 79 zástupců border kolií, 81 zástupců bearded kolií a 96 zástupců československých vlčáků.

Využité metody pro detekci mutací byly restriční štěpení a detekce mutací na gelové a kapilární elektroforéza.

Zjištěné výsledky ukazují, že mutace zodpovědná za dlouhosrstý fenotyp u psů je substituční mutace *FGF5:c.284G>T*. Druhá otestovaná teorie je, že žádný z jedinců s dlouhosrstým fenotypem nebyl nositelem duplikace *FGF5:c.145_150dupACCAGC*.

Klíčová slova: *Canis lupus familiaris*, asistenční plemena, délka srsti, *FGF5*, fibroblastový růstový faktor 5, genotypizace

Mutations of *FGF5* gene and their relation to hair length in selected breeds of assistance dogs

Summary

The issue in this bachelor thesis is mutation in gene *FGF5* and its affect on the length of coat in model population of the breeds used in the assistance activities.

First part of this work, theoretical part, focus on types, texture and length of dogs coat and on the genes, that affects these characteristic. Mostly on gene *FGF5*, whose mutation is responsible for the long coat phenotype in many animal species.

Second, experimental, part of this work examine this gene. There are two possible mutations responsible for longhaired phenotype. Substitution mutation *FGF5:c.284G>T*, which changes guanine to thymine on 284. place in nucleotide sequences and duplication mutation *FGF5:c.145_150dupACCAGC*, that causes duplication of 6 bases. Both mutations ale located in the exon 1 of gene *FGF5*.

Breeds chosen for experimental part of this work was German shepherd, Labrador retriever, Golden retriever, Border collie and Bearded collie as representatives for breeds, that are used in assistance activities. Czechoslovakian wolfdog was used as contrasting breed, not suitable for assistance activities and because there is increasing number of longhaired dogs.

Molecular analysis, obtained from buccal mucous membrane cells, was applied on 30 deputies of German shepherd, 30 deputies of Labrador retriever, 30 deputies of Golden retriever, 79 deputies of Border collie, 81 deputies of Bearded collie and 96 deputies of Czechoslovakian wolfdog.

Used methods of analysis were restriction fragment length polymorphism and gel and capillary electrophoresis.

Result of genotyping was, that mutation responsible for longhaired phenotype is substitution mutation *FGF5:c.284G>T*. Second result was, that no one of longhaired specimen carries the duplication mutation *FGF5:c.145_150dupACCAGC*.

Keywords: *Canis lupus familiaris*, assistance breeds, hair length, *FGF5*, fibroblast growth factor 5, genotyping

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
2.1 Vědecké hypotézy	2
2.2 Cíle práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Plemena psů využívaná pro asistenční účely a charakteristika jejich srsti	3
3.1.1 Skupina retrieverů	3
3.1.1.1 Labradorský retriever	3
3.1.1.2 Zlatý retriever	4
3.1.2 Ovčácká plemena	5
3.1.2.1 Border collie	5
3.1.2.2 Bearded kolie	5
3.1.2.3 Německý ovčák	6
3.1.2.4 Československý vlčák	7
3.2 Exteriér jako kritérium vhodnosti použití psa pro asistenční aktivity	8
3.3 Srst a její typy	9
3.3.1 Funkce srsti	9
3.3.2 Typy srsti	9
3.3.2.1 Krátká srst	10
3.3.2.2 Dlouhá srst	10
3.3.2.3 Hrubá srst	10
3.3.2.4 Kadeřavá srst	11
3.3.2.5 Bezsrstost	11
3.3.3 Stavba chlupu	11
3.4 Cyklus růstu chlupů	12
3.5 <i>FGF5</i> – gen řídící délku srsti	14
3.6 <i>RSPO2</i> – gen řídící tvorbu vousů a obočí	15
3.7 <i>KRT71</i> – gen řídící kadeřavost srsti	16
3.8 Metody genetické analýzy	16
3.8.1 PCR	16
3.8.2 Gelová elektroforéza nukleových kyselin	18
3.8.2.1 Průběh elektroforézy	18
3.8.3 Kapilární elektroforéza	19
3.8.3.1 Principy fungování	19

4	Materiál a metody	20
4.1	Plemena psů použítá pro genetické analýzy	20
4.2	Izolace genomické DNA	20
4.3	Detekce substituční mutace (G>T) na pozici 284 nukleotidu genu <i>FGF5</i> .21	
4.3.1	Amplifikace místa výskytu mutace.....	21
4.3.2	Detekce mutace metodou PCR – RFLP, restriční štěpení.....	22
4.4	Detekce duplikace v pozici 145- 156 nukleotidu genu <i>FGF5</i>	22
4.4.1	Amplifikace místa výskytu duplikace	22
4.4.2	Detekce duplikace pomocí kapilární elektroforézy	23
5	Výsledky	25
5.1	Substituční mutace <i>FGF5</i>	25
5.2	Duplikace v genu <i>FGF5</i>	28
6	Diskuze	31
6.1	Plemena a standard jejich srsti.....	31
7	Závěr	33
8	Zdroje	34

1 Úvod

Asistenční psi neboli psi cvičení na pomoc či asistenci osob se zdravotním či jiným postižením, jsou stále více využívanými a oblíbenými pomocníky k překonávání a kompenzaci postižení. Jsou schopni lidem se zrakovým postižením pomoci v orientaci v prostoru, lidem se sluchovým postižením signalizovat důležité zvuky z jejich okolí, tělesně postiženým podávat věci, otevírat dveře a pomáhat se sebeobslouhou a někteří dokonce vycítit blížící se epileptický záchvat. Dokážou být motivací například pro dlouhodobě nemocně, dementní nebo autistické lidi k učení, pohybu, komunikaci a chuti do života.

Všichni tito psi krom vynikajících povahových vlastností musí splňovat i exteriérové požadavky. Měli by působit přátelským dojmem, být přijatelné velikosti, být příjemní na dotek a zároveň nenároční na péči o srst. Z tohoto hlediska se více hodí krátká srst než dlouhá a hladká více než drsná.

Srst je také jednou z charakteristik plemenného standardu. Každé plemeno bylo vyšlechtěno pro nějakou službu člověku a typ srsti odpovídá tomuto účelu. Jiný typ srsti se hodí pro vodního psa, jiný pro bojového, jiný pro společenského, jiný pro nosiče zvěře.

Genem, který ovlivňuje délku srsti je *FGF5*, genem který ovlivňuje kadeřavost srsti je *KRT71* a genem který ovlivňuje drsnost srsti a osrstění obličejových částí těla je *RSPO2*. Kombinací těchto tří genů lze dosáhnout většiny známých typů srsti u psů.

Tato práce je zaměřená především na gen *FGF5*, zodpovědný za dlouhou nebo krátkou srst. Vyskytuje se v několika mutacích, z nichž v je v této práci věnována pozornost dvěma z nich – substituční mutací *FGF5:c.284G>T*, která způsobuje záměnu guaninu za tymin na 284. místě v nukleotidové sekvenci a druhé duplikaci 6 párů bází na 145 místo sekvence bází (*FGF5:c.145_150dupACCAGC*). Tyto dvě mutace byly testovány, která je zodpovědná za dlouhosrstý fenotyp u psů.

Pro experimentální část práce byly vybráni zástupci plemen německý ovčák, labradorský retriever, zlatý retriever, border kolie, bearded kolie jako zástupci plemen používaných pro asistenční účely a plemeno československý vlčák jako srovnávací, kontrastní plemeno, zcela nevhodné pro asistenční účely.

2 Cíl práce

2.1 Vědecké hypotézy

- Doposud byly popsány dvě mutace genu *FGF5* pro fibroblastový růstový faktor 5 (*FGF5:c.284G>T* a *FGF5:c.145_150dupACCAGC*, které teoreticky mohou asociovat s dlouhou srstí u psů. Za kauzální mutaci lze považovat substituční mutaci *FGF5:c.284G>*, která se nachází u všech jedinců dlouhosrsté varianty studovaného plemene.
- 2. Z bukálních stěrů je možné vyizolovat dostatečně kvalitní DNA, která umožní amplifikovat fragment genu *FGF5* a následně detekovat mutace PCR-RFLP a délkového polymorfismu ampliconů.

2.2 Cíle práce

- Zpracovat literární rešerši zaměřenou na genetickou kontrolu dlouhosrstosti u psů.
- U modelových plemen s variabilní délkou srsti vyizolovat genomickou DNA.
- Pomocí optimalizovaných DNA markerů identifikovat alelické varianty studovaných lokusů.
- Porovnat výsledky genotypování s fenotypovým projevem.

3 Literární rešerše

3.1 Plemena psů využívaná pro asistenční účely a charakteristika jejich srsti

Pro asistenční účely se využívá mnoho plemen psů. Pro různé asistenční aktivity jsou vhodná různá plemena s rozdílnou povahou, velikostí i typem osrstění. V literární rešerši se zaměříme na plemena, která byla použita pro genetické analýzy – německý ovčák, labradorský retriever, zlatý retriever, border kolie, bearded kolie, všechna tato plemena lze pro asistenční účely použít pro jejich vyrovnanou a přátelskou povahu, všestranné využití, ochotu pracovat a schopnost se na práci dobře koncentrovat.

Tato plemena byla srovnána s plemenem československý vlčák, který je pro asistenční účely zcela nevhodný z hlediska povahy. Vzhledem ke svému původu bývají plaší, teritoriální a ochotni spolupracovat pouze se svým majitelem. Byl zařazen do této práce proto, že je dle standardu krátkosrstý a byl použit jako povahově kontrastní plemeno.

3.1.1 Skupina retrieverů

3.1.1.1 Labradorský retriever

Má krátkou srst, hustou, hrubou na dotek, která má velmi dobré voděodolné vlastnosti. Péče o srst je nenáročná (Larkin et Stockman, 1998). Dle standardu FCI (2011) jsou uznané barvy srsti úplně černá, žlutá nebo játrová/čokoládová. Žluté rozmezí od světle krémové až po liščí. Malá bílá skvrna na hrudi je přípustná.

Původně byl vyšlechtěn jako pomocník při lovu vodního ptactva. V současné době se často používá jako slepecký pes. Má velmi přátelskou, aktivní povahu, má sklony k obezitě. Kohoutková výška do 57 cm (Larkin et Stockman, 1998).

Obrázek 1: Labradorský retriever



Dostupné z: https://www.pesweb.cz/img/_/i.000082/labrador1.jpg

3.1.1.2 Zlatý retriever

Srst má hustou podsadu, vrchní srst je zvlněná a hladká (Larkin et Stockman, 1998). Dle standardu FCI (2009a) jsou uznané barvy srsti: každý odstín zlaté nebo krémové, bez červené nebo mahagonové. Několik bílých chlupů na hrudi je přípustných.

Všestranný pes, vyšlechtěn pro nošení ulovené zvěře, nyní používán jako rodinný pes a pro různorodé asistenční služby. Dorůstá do kohoutkové výšky 61 cm. Aktivní se sklony k obezitě. (Larkin et Stockman, 1998)

Obrázek 2: Zlatý retriever



Dostupné z:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/93/Golden_Retriever_Carlos_%2810581910556%29.jpg/1200px-Golden_Retriever_Carlos_%2810581910556%29.jpg

3.1.2 Ovčácká plemena

3.1.2.1 Border collie

Vyšlechtěna jako pastevecký pes. Plemeno velmi bystré, hbité, inteligentní, aktivní. Kohoutková výška 53 cm. (Larkin et Stockman, 1998)

Dle FCI standardu (2009b) dvě varianty – středně dlouhá nebo krátká. U obou je vrchní vrstva hustá a podsada měkká a hustá, dobře odolná proti vnějším vlivům. Barevně jsou povolené všechny varianty, ale nikdy by neměla být převládající barva bílá.

Obrázek 3: Border kolie



Dostupné z: http://puppyfinder.org.uk/wp/wp-content/uploads/2013/01/border_collie.jpg

3.1.2.2 Bearded kolie

Kohoutková míra až 56 cm. Vyšlechtěna jako ovčácký pes, v současné době často používané na agility a jako asistenční pes. Původem ze Skotska. Inteligentní, aktivní, tvrdohlavější než border kolie (Larkin et Stockman, 1998).

Dle standardu FCI (2015) je srst dvojitá s měkkou a hustou podsadou. Vnější vrstva je tvořena silnými, rovnými, drsnými chlupy, bez vlnitosti. Chlupy na čenichu jsou dlouhé až pod linii čelisti a kaudálním směrem se prodlužují. Přípustné barvy jsou červenohnědá, černá, modrá, všechny odstíny šedé, hnědé nebo pískové s bílými znaky nebo bez nich. Bíle se objevuje na přední polovině těla.

Obrázek 4: Bearded kolie



Dostupné z:

<https://www.pets4homes.co.uk/images/breeds/79/large/444a8450e26446281a5c4ed5f0012534.jpg>

3.1.2.3 Německý ovčák

Nejpoužívanější a nejvšestrannější pracovní pes. Je to velmi inteligentní, pracovitý a ostražitý pes, zpravidla je tolerantní vůči dětem i ostatním domácím zvířatům (Larkin et Stockman, 1998).

FCI (2010) standard pro srst povoluje dvě varianty délky srsti, krátkosrstou a dlouhosrstou, obě s podsadou. Přípustné barvy jsou černá, černá s červenohnědými, hnědými, žlutými a šedými znaky, šedý s černým stínováním.

Obrázek 5 a 6: Německý ovčák – dlouhá i krátká varianta srsti



Dostupné z: <http://prilohy.forpes.cz/2011-04-27-q1.jpg> a
http://www.santtulip.cz/files/pancho/Max_5ms1.jpg

3.1.2.4 Československý vlčák

Kohoutková výška do 75 cm. Velmi aktivní pes, nedůvěřivý k cizím lidem. Vytrvalý, nadprůměrně inteligentní, má větší nároky na správné vedení a výchovu a bývá ochoten spolupracovat jen se svým majitelem. Srst má krátkou, rovnou, hustou, charakteristickou bílou vlčí masku okolo tlamy, barvy vlkošedé ve všech odstínech od stříbrošedé po tmavošedou. (Hartl a Jedlička, 1996)

Obrázek 7: Československý vlčák



Dostupné z: <https://www.101dogbreeds.com/wp-content/uploads/2015/04/Czechoslovakian-Wolfdog-Images.jpg>

Obrázek 8: Československý vlčák s dlouhou srstí, která neodpovídá standardu



Dostupné z:

http://www.tobrok.sk/vyklad%20stand,%20bonit/14956396_10205948626235000_5139583398684496006_n.jpg

3.2 Exteriér jako kritérium vhodnosti použití psa pro asistenční aktivity

Pro asistenční účely se používají plemena, která se liší různými exteriérovými znaky, jako jsou například kohoutková výška, tělesný rámec, hmotnost, konstituce. Dalším ze znaků je typ osrstění.

Důkazem exteriérové variability psů využívaných pro asistenční účely jsou práce následujících autorů Kwong a Bartholomew (2011), Yamamoto a kol. (2011), Weiss a Greenberg (1997), Crowley-Robinson a Blackshaw (2015). Tito autoři zvolili exteriérově variabilní plemena zejména z důvodu experimentů zaměřených na etologii, schopnost učit se, reakci psů a klientů. Žádný z výše uvedených autorů specializujících se na asistenční aktivity psů se nevěnoval genetickým mechanismům řídících délku srsti.

Ve své BP jsem se zaměřila právě na genetické aspekty zodpovědné za fenotypové rozdíly mezi krátkosrstými a dlouhosrstými plemeny psů, respektive jejich varietami využívanými pro asistenční aktivity.

Vzhled psa hraje velkou roli, protože fyzický kontakt člověka a psa je základním principem fungování asistenčního psa. Pro některé aktivity je zásadní, aby měl klient ze psa

dobrý pocit, působil na něj příjemně, nebyl nijak odpudivý a aby hlazení psa byla oboustranně příjemná činnost. Také je důležité, aby péče o srst byla co nejjednodušší (Svobodová, 2010).

Crowley-Robinson a Blackshaw (2015) ve své publikaci uvádějí, že 78.7 % dotázaných preferuje u psů využívaných pro asistenční aktivity psy s krátkou srstí.

3.3 Srst a její typy

3.3.1 Funkce srsti

Funkce srsti je termoizolace, smyslová percepce, funguje jako bariéra proti chemickému, fyzikálnímu, a mikrobiálnímu poškození. Srst také funguje jako prostředek ke kamufláži nebo k sociální komunikaci. Schopnost srsti regulovat teplotu těla úzce souvisí s její délkou, hustotou, tloušťkou chlupů a typem srsti (Miller et al., 2012).

3.3.2 Typy srsti

Genem, který ovlivňuje délku srsti je *FGF5*, genem který ovlivňuje kadeřavost srsti je *KRT71* a genem který ovlivňuje drsnost srsti a osrstění obličejových částí těla je *RSPO2*. Kombinací těchto tří genů lze dosáhnout většiny známých typů srsti u psů (Cadieu et al., 2009).

Obrázek 9: Zobrazuje, jakých variant srsti lze dosáhnout různými kombinacemi genů *FGF5*, *RSPO2* a *KRT71* v jejich přirozené nebo mutované formě (Cadieu et al., 2009).

	PHENOTYPE	<i>FGF5</i>	<i>RSPO2</i>	<i>KRT71</i>	
A	Short	-	-	-	A Basset Hound
B	Wire	-	+	-	B Australian Terrier
C	Wire and Curly	-	+	+	C Airedale Terrier
D	Long	+	-	-	D Golden Retriever
E	Long with Furnishings	+	+	-	E Bearded Collie
F	Curly	+	-	+	F Irish Water Spaniel
G	Curly with Furnishings	+	+	+	G Bichon Frisé

3.3.2.1 Krátká srst

Základním typem srsti. Rovná, krátká, snadná na údržbu. Typ srsti, který je k vidění u vlků nebo primitivních plemen (Ostrander et Ruvinsky, 2012).

3.3.2.2 Dlouhá srst

Popisována alelou *l*, která je recesivní vůči alele *L* pro krátkou srst. (Whitney, 1979). Dle Ostrandera a Ruvinskyho (2012) neexistuje pouze krátká nebo dlouhá srst, ale je mnoho variant mezi tím, což ukazuje k tomu, že délka srsti bude ovlivněna ještě jinými geny nebo faktory vnějšího prostředí. Alela *l/L*, je alelou genu *FGF5*, který, pokud je mutován, způsobuje dlouhosrstost u psů (Housley a Venta, 2006).

3.3.2.3 Hrubá srst

Těž nazývána drsná nebo drátovitá. Fenotypový projev je velmi ovlivněn délkou srsti a kudrnatostí. Bývá asociována s prodloužením srsti kolem očí, čenichu (Ostrander et Ruvinsky, 2012), za což je zodpovědná mutace v genu *RSPO2* (Cadieu et al., 2009).

3.3.2.4 Kadeřavá srst

Fenotypový projev se liší podle délky srsti, nejlépe se kučeravost projeví na dlouhých chlupech. Označována alelou $Cu - Cu^C$ pro kudrnatou srst a Cu^+ pro rovnou (Ostrander et Ruvinsky, 2012). Za kučeravost je zodpovědná mutace v genu KRT71 (Cadieu et al., 2009).

3.3.2.5 Bezsrstost

Bezsrstost je charakterizována absencí chlupů na povrchu těla, se zachovanými zbytky srsti na hlavě, uších, nohou a ocase. Bezsrstost je dominantní nad normální srstí (Ostrander et Ruvinsky, 2012).

3.3.3 Stavba chlupu

Růst vlasů a srsti je ovlivněn pohlavními, nadledvinkovými a thyroideálními hormony a faktory genetickými (Jelínek a kol., 2001). Chlupový folikul se skládá z epitelální a dermální části. Mezi epitelální části patří matrix, medulla, kortex, kutikula, vnitřní epitelální (kořenová) pochva a zevní epitelální pochva. Dermální části jsou dermální papila a vazivová pochva (Kučerová a Bienová, 2012).

Chlup má dvě části – nadpokožkovou, označovanou jako scapus pili, a vnořenou do kůže, označovanou jako kořen chlupu (radix pili). Kořen se v pokožce kyjovitě rozšiřuje, tím vzniká vlasová cibulka (bulbus pili). Kořen chlupu obalují epitelové pochvy (vnitřní a zevní) a vazivová pochva (Jelínek a kol., 2001).

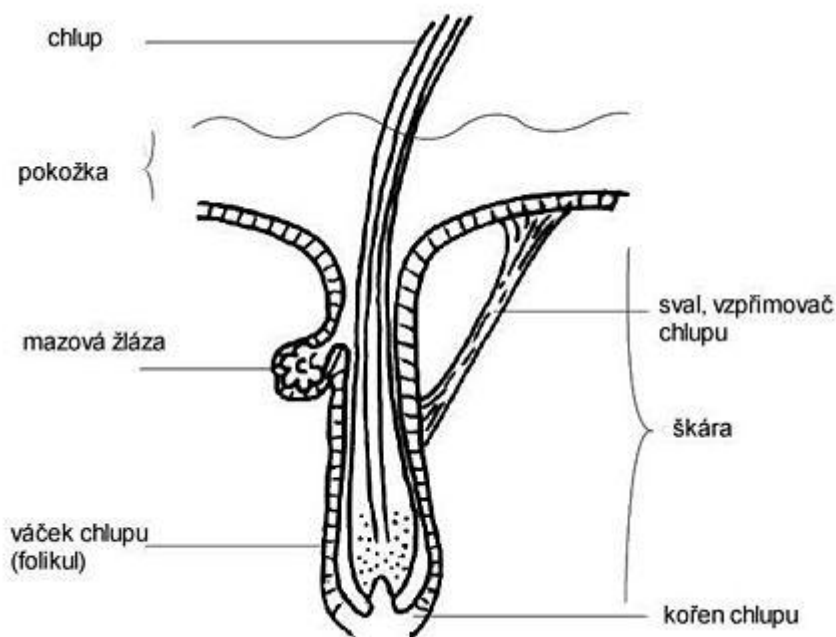
Vazivo z okolí chlupové cibulky se do ní zanořuje a vytváří tak dermální papilu s cévami. K chlupovému folikulu jsou připojeny apokrinní žlázy, na polštářcích tlap i ekrinní. Chlup vyrůstá z kůže pod úhlem. Tento úhel může být ovlivněn svalovým snopcem (musculus arrector pili), který při kontrakci napřimuje chlup (Jelínek a kol., 2001).

Chlupová cibulka s pochvami tvoří vlasový folikul. Vlasové folikuly obsahují 2 hlavní typy buněk: buňky dermální papily (DPCs), které vznikly jako deriváty mezenchymu a epitelální buňky kořenové pochvy a vlasové jámy, které vznikly z povrchového epitelu (Hardy, 1992).

Chlupový folikul ve své růstové fázi zasahuje až do podkožní tukové tkáně. Nejhlouběji uložená báze se rozšiřuje v bulbus a dermální papila se do něj zanořuje a vyplňuje centrální

dutinu bulbu. Pomyslná linie vedoucí nejširším místem dermální papily se nazývá kritická hladina. V ní je shromážděna matrix s vysokou mitotickou aktivitou. Nad touto hladinou buňky rostou a rovnají se do sloupce vertikálně směrem k pokožce. Dále se prodlužují a v spodní třetině folikulu, kde začínají keratinizovat, se nachází keratinizační zóna. Nad touto zónou se poloměr chlupu mírně zužuje (Kučerová a Bienová, 2012).

Obrázek 10: Schematické znázornění stavby chlupu



Dostupné z:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/39/Anatomy_and_physiology_of_animals_A_hair-cs.jpg/450px-Anatomy_and_physiology_of_animals_A_hair-cs.jpg

3.4 Cyklus růstu chlupů

U savců zahrnuje vlasový cyklus 3 fáze, anagenní, katagenní a telogenní. V anagení fázi vlasové folikuly rostou a srst se prodlužuje, v katagenní vlasové folikuly degradují a v telogenní fázi jsou v nečinnosti (Suzuki et al., 1998).

Růstové období chlupu se nazývá anagenní fáze. Je charakterizováno proliferací a diferenciací buněk. Buňky se mitoticky dělí v dolní části telogenního folikulu. Formují se do sloupce a dávají znovu vzniknout chlupové papile. Vytváří se bulbus, a začíná vznikat nový chlup. Anagenní chlup naroste za den asi o 0,35 mm (Kučerová a Bienová, 2012).

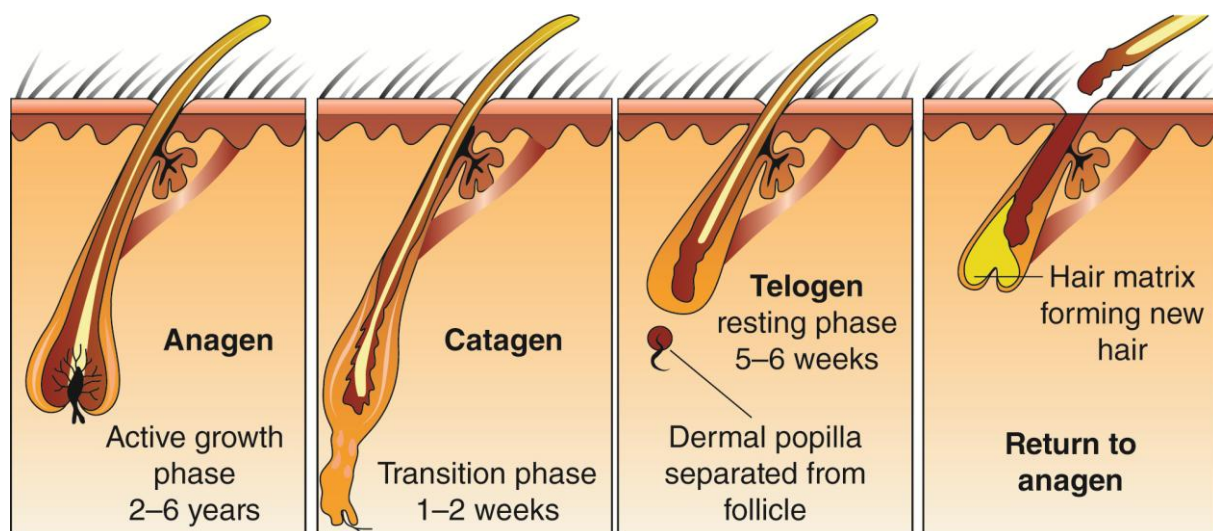
Chlup roste, dokud nedosáhne své délky, přičemž tato délka se různí v závislosti na plemeni, konkrétním jedinci, vnějších podmínkách a oblasti těla (Miller et al., 2012).

Druhá fáze je přechodná – katagenní. Dochází k poklesu mitotické aktivity buněk v bulbu a k jejich apoptóze (Kučerová a Bienová, 2012).

Třetí fáze vývoje chlupu je klidová - telogenní. Vlasová folikul se zkrátí. Buňky v dolní části chlupu jsou mitoticky neaktivní. Chlup se uvolňuje z papily a posunuje se nahoru k povrchu pokožky, odkud později vypadne (Kučerová a Bienová, 2012).

Tyto cykly se střídají stále dokola. Horní část folikulu zůstává po celou dobu prakticky stejná, dolní dvě třetiny prochází cyklickými změnami. U psů jsou tyto cykly synchronizované, u štěňat na celém povrchu těla, u starších psů ve vlnách, dochází tak k línání a výměně srsti za hustší nebo řidší v závislosti na podmínkách okolí (Kučerová a Bienová, 2012).

Obrázek 10: Schematické znázornění cyklu růstu chlupu



Dostupné z: http://www.hair2013.org/wp-content/uploads/2016/01/IU_M2_11.jpg

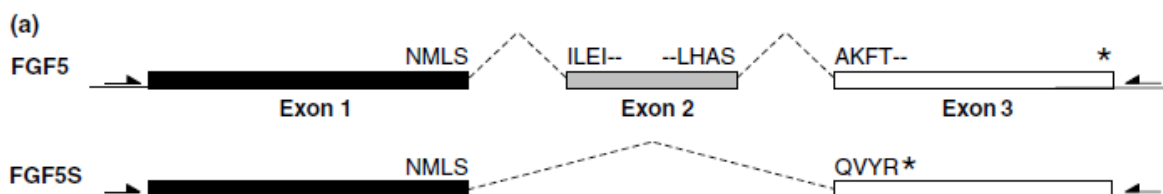
3.5 *FGF5* – gen řídící délku srsti

Fibroblast growth factor 5 (FGF-5) je protein, kódovaný genem *FGF5*. Je to v současné době jediný známý gen, jehož mutace vede k dlouhosrstému fenotypu u savců (Dierks et al., 2013).

Tato skutečnost byla dokázána mnoha studiemi na kočkách (Drögemüller et al., 2007) psech (Housley et Venta, 2006), myších (Hébert et al., 1994), oslech (Legrand et al., 2014), ovčích a kozách (LIU et al., 2009).

Dlouhá srst je autozomálně recesivně dědičná. U psů se vyskytuje na 32 chromozomu. *FGF5* je 268 aminokyselinový protein 29,1 kDa, který se také přirozeně vyskytuje ve formě spletené varianty izofomy 123 aminokyselin *FGF5S* (Suzuki et al., 2000).

Obrázek 11: Možné varianty sestřihu transkriptu *FGF5* a *FGF5S*.



Převzato z Housley a Venta (2006)

He'bert et al. (1994) uvádí, že protein *FGF5* hraje klíčovou roli v růstovém cyklu vlasů a chlupů, kde působí jako klíčová signální molekula při zahájení přechodu od anagenní (růstové) fáze k katagenové (regresní) fázi. I malé změny v genu *FGF5* mohou narušit jeho expresi, což má za následek prodloužení anagenní fáze vlasového cyklu, což vede k fenotypům s dlouhými chlupy.

FGF5 mRNA je exprimována ve vnějším kořenovém plášti chlupových folikulů. U mutantního genu chybí exon 1 genu *FGF5*, což způsobuje, že anagenní fáze VI a anagenní fáze VI je abnormálně prodloužena (He'bert et al., 1994).

Dle Dierkse et al., (2013) je nejčastější mutace *FGF5*: p.Cys95Phe, která vede k náhradě cysteinu fenylalaninem (Cys95→Phe). Na úrovni DNA je tato aminokyselinová záměna způsobena substitucí guaninu thyminem (G>T) na pozici na pozici 284 nukleotidu.

Mutace *FGF5*: p.Cys95Phe byla zcela shodná s fenotypem dlouhé srsti u mnoha plemen psů, vyjma plemen jako afghánský chrt, japan-chin, samojed, silky teriér a jorkšírský teriér (Housley & Venta 2006, Cadieu et al. 2009).

Pro plemeno akita a sibiřský husky byla zjištěna mutace *FGF5*:p.Ala193Val. U plemene samojed se vyskytuje tato mutace *FGF5*:p.Ala193Val spolu s dříve zmíněnou *FGF5*:p.Cys95Phe. U plemene afgánský chrt se vyskytují mutace: *FGF5*:c.559_560dupGG, *FGF5*:g.8193T>A a *FGF5*:p.Cys95Phe (Dierks et al., 2013).

Housley a Venta, (2006), zjistili, že v exonu 1 *FGF5* existují 2 typy mutací, které byly vytipovány, že by mohly souviset s délkou srsti - *FGF5*:p.Cys95Phe a u některých jedinců byla zjištěna druhá mutace - duplikace 6 nukleotidů ACCAGC (na pozici 145- 156 bp).

Housley a Venta ve svých experimentech hodnotil výskyt těchto mutací u plemen s různou délkou srsti a použil plemena u kterých je fixovaná pouze krátká srst, potom plemena s dlouhou srstí a plemena u kterých existují variety dlouhosrstá, krátkosrstá.

Zjistil, že všichni jedinci, kteří jsou dlouhosrstí, byli homozygotní z hlediska výskytu T v pozici 284 nukleotidu – měli genotyp T/T. A současně všichni tito jedinci neměli duplikovaný úsek ACCAGC v pozici 145- 156 nukleotidu. Naopak všichni krátkosrstí jedinci byli z hlediska 284 nukleotidu rovněž homozygotní, takže měli genotyp G/G. Z hlediska výskytu 6 nukleotidové mutace nebyla skupina krátkosrstých jedinců homogenní. U těchto psů se vyskytovali jak homozygoti bez duplikace, tak homozygoti s duplikací, tak i heterozygoti. Z tohoto zjištění vyplývá, že kauzální mutací pro délku srsti je substituční mutace *FGF5*: p.Cys95Phe a ne duplikace *FGF5*:c.145_150dupACCAGC.

3.6 RSPO2 – gen řídící tvorbu vousů a obočí

Gen, jehož mutace je zodpovědná za „furnishing“ u psů. Vzhled psů, kdy je prodloužena srst na čenichu, obočí a spodní části nohou (Cadieu et al., 2009).

U psů je lokalizován na 13 chromozomu. Tato mutace se projevuje dominantně (Cadieu et al., 2009).

Mutace je způsobena inzercí 167 párů bází na 3'UTR konec na pozici 11,634,766 páru bází třináctého chromozomu (Cadieu et al., 2009).

RSPO2 společně s Wnt aktivuje β -catenin (Kazanskaya et al., 2004). Wnt signalizace je potřebná pro vznik vlasového folikulu z ectodermu (Andl et al., 2002; Clevers, 2006). β -catenin je efektor pro mezibuněčnou adhezi. Funguje jako intracelulárně jako převodník signálu na dráze Wnt (Cadieu et al., 2009).

Tato mutace neovlivňuje protein-kódující část genu, ale protože 3'UTR často kóduje elementy, které ovlivňují stabilitu mRNA, psi s „furnishingem“ mají v kůži čenichu a obočí výrazně vyšší zastoupení RSPO2 transkriptu (Cadieu et al., 2009).

RSPO2 je normálně exprimován v mezenchymálních buňkách. Mutace v RSPO2 genu také způsobuje zvýšenou apoptózu buněk (Cadieu et al., 2009).

Navíc Wnt/ β -catenin cesta se podílí na vzniku nádorů vlasových folikulů a pilomatricomu (benigní kožní nádory), (Fuchs et al., 1999), které se mnohem častěji objevují u plemen psů s „furnishingem“ (Meuten, 2002).

3.7 KRT71 – gen řídící kadeřavost srsti

KRT71 je gen, jehož mutace vede ke kudrnaté srsti u psů (Cadieu, 2009).

U psů je na 27. chromozomu a je to autozomálně dominantní mutace. Je způsobena jednonukleotidovou změnou v 5,542,806 bázi. Jde o záměnu cysteinu na thymin (C \rightarrow T). Nekudrnatí psi tak nesou CC genotyp, kudrnatí TT. V proteinu tato záměna znamená výměnu Argininu za Tryptofan (Arg151 \rightarrow Trp). Tato mutace je v druhém exonu proteinu KRT71. U psů je na 27 chromozomu a je to autozomálně dominantní mutace (Cadieu, 2009).

Mezi dvěma extrémními typy chlupů, rovné a kudrnaté, je řada mezilehlých typů: volné kudrlinky, spirálovité kudrlinky, vlny apod. Vlnitost srsti je mnohem nápadnější na dlouhé srsti, ale závisí také na tloušťce chlupu, hustotě a vzoru růstu srsti (Cadieu, 2009).

3.8 Metody genetické analýzy

3.8.1 PCR

PCR je „in vitro“ metoda pro enzymatickou syntézu specifické DNA sekvence. Používají se při ní 2 oligonukleotidové primery, které hybridizují s opačnými vlákny a vymezují oblast, kterou chceme nasyntetizovat. Dochází k rozvolnění templátové DNA na dvě jednovlákná na tato vlákna nasedají primery na 3' OH konec a od toho míst je DNA polymerázou syntetizované nové DNA vlákno. Toto nově vytvořené vlákno se v dalším cyklu stává templátem pro další syntézu. Tímto se s každým cyklem zdvojnásobuje množství nasyntetizovaných úseků DNA (Snustad a Simmons, 2009).

Celý cyklus probíhá ve třech krocích zahrnuje templátovou denaturaci dvojevláknové DNA, nasednutí primeru, elongaci od primeru DNA polymerázou (Erlich, 1989).

3.8.2 Gelová elektroforéza nukleových kyselin

Agarózová gelová elektroforéza je nejjednodušší a nejvyužívanější způsob, který se používá pro separaci a analýzu DNA (Lewis, 2015). Dá se použít pro molekuly v rozmezí od 100 bp do 25 kb. Principem metody je migrace záporně nabitých molekul DNA skrze agarózový gel směrem k anodě. Kratší fragmenty migrují rychleji než větší. Jako vizualizační médium, pro zvýraznění DNA, se nečastěji používá ethidium bromid (Lee et al., 2012).

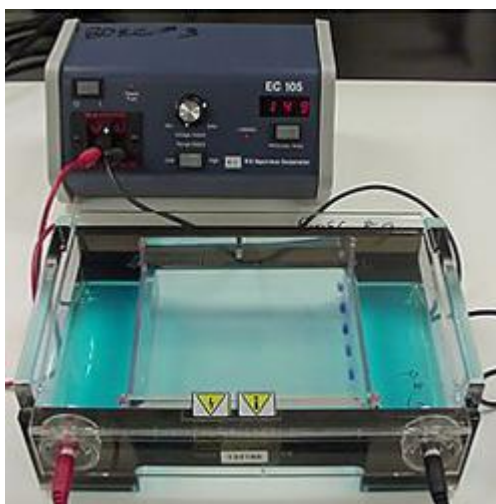
3.8.2.1 Průběh elektroforézy

Agarózový gel vytváří síť, skrze kterou prostupují záporně nabitě nukleové kyseliny. Koncentrace gelu závisí na velikosti DNA fragmentů, obecně platí, že čím menší fragmenty, tím hustší by měl gel být. Používá se koncentrace 0,5 – 4 % (Lee et al., 2012).

Do gelu je nutno přidat buffer, nejčastěji používané jsou TAE (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA) a TBE (45mM Tris-borate, 1mM EDTA). Do zahřáté a homogenizované směsi se přidává ethidium bromid, většinou o koncentraci 0,5 µg/ml (Lee et al., 2012). Ethidium bromid je prokazatelně mutagenní, ale používá se pro jeho dobré vizualizační vlastnosti a cenu. Umožňuje frakce elektroforézy pod UV světlem. Bezpečnější varianty jsou například GelRed, GelGreen, a SYBR Safe (Lewis, 2015).

Gel s napipetovanými vzorky musí mít nejméně jeden standard molekulových hmotností v každé řadě. Segregace probíhá v elektroforetické aparatuře za napětí většinou okolo 100V. (Lewis, 2015).

Obrázek 13: Gelová elektroforéza.



Obrázek převzatý z <http://www.iaszoology.com/gel-electrophoresis/>

3.8.3 Kapilární elektroforéza

Metoda založená na separaci molekul na základě jejich náboje, velikosti a struktury. U kapilární elektroforézy separace probíhá ve vodném roztoku elektrolytu (zpravidla roztok pufru) nebo v gelu (Kašička, 1997).

3.8.3.1 Principy fungování

Zásadním principem, je princip elektroforetické pohyblivosti, definovaný jako rychlost pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Rychlost je přímo úměrná náboji a nepřímo jeho velikosti a viskozitě roztoku (Kašička, 1997).

Dalším principem je elektroosmotický tok. Jde o působení stejnosměrného proudu na rozhraní pevné a kapalně fáze uvnitř stěny kapiláry. Vzniká tak elektrická dvojvrstva. Uvádí se tím do pohybu veškerý roztok. Unáší všechny částice stejně, nefunguje jako segregáčnické činidlo, ale urychluje průběh celého procesu (Kašička, 1997).

Elektroforéza probíhá ve velmi tenkých v křemíkových kapilárách. Vnitřní průměr je obvykle menší než 100 μm , délka 30 – 80 cm. Detektor na konci kapiláry vysílá určitou vlnovou délku a měří absorpci. Takto je získána kvalitativní a kvantitativní informace o složení vzorku. Kapilární elektromigrační metody se v poslední době vyvinuly ve velice funkční a velmi přesné separační techniky. Stávají se tak cennější a rozšířenější metodou (Kašička, 1997).

4 Materiál a metody

4.1 Plemena psů použita pro genetické analýzy

Vzorky biologického materiálu byly získány od chovatelů a majitelů psů. Ve všech případech se jednalo o jedince s průkazem původu a z důvodů chovatelské etiky jsou jedinci analyzováni v BP uváděni pod anonymními čísly. U každého jedince je uváděno pouze pohlaví, zbarvení a typ osrstění. Počet jedinců testovaných v rámci bakalářské práce je uveden níže. Úplný seznam pro každého jedince zvlášť, včetně zbarvení je uveden v tabulkách 1-6 v přílohách

Plemeno	Celkový počet jedinců	Psů	Fen
Německý ovčák	30	17	13
Zlatý retriever	30	16	14
Labradorský retriever	30	18	12
Border kolie	79	32	47
Bearded kolie	81	36	45
Československý vlčák	96	52	44

Tabulka 1: seznam psů použitých v bakalářské práci

Konkrétní přehled psů, včetně jejich pohlaví a charakteru osrstění je uveden v příloze.

4.2 Izolace genomické DNA

Genomická DNA byla izolována z bukálních stěrů. Bukální stěry byly získány pomocí sterilních odběrových cytologických kartáčků (Cytobrush). Bukální stěry prováděli chovatelé a po důkladném zaschnutí odebraných buněk, byly takto připravené vzorky zaslány do laboratoře katedry genetiky a šlechtění.

Pro izolaci DNA byl použit kit NucleSpin Tissue (Machery-Nagel).

Vlastní izolace DNA byla provedena přesně podle dodaného protokolu výrobcem kitu. Extrakce byla založena na deproteinizaci vzorků (proteináza K), jejich lyzaci a zachycení na silikátové kolonce.

Degradace RNA byla provedena enzymaticky (RNáza H). Zachycené molekuly DNA byly opakovaně propláchnuty promývacím pufrům a eluovány. Kvantita a kvalita izolované DNA

byla hodnocena UV fotometricky – NanoPhotometr (Implen). Extrahovaná DNA byla u všech vzorků naředěna na jednotnou koncentraci 10ng/1 μ l.

4.3 Detekce substituční mutace (G>T) na pozici 284 nukleotidu genu *FGF5*

4.3.1 Amplifikace místa výskytu mutace

Oblast s výskytem této mutace byla amplifikována pomocí dvojice primerů, které byly navrženy na pracovišti Katedry genetiky a šlechtění ČZU v Praze. Byly použity primery FGF5-284-F, jehož pořadí nukleotidů je:

5'...GTCTTCCTCTTCTTCCTCCGTCT...3'

a FGF5-284-R, jehož složení je:

3'... GAGCCATTGACTTTGCCATC...5'

Složení amplifikační reakce je uvedeno v tabulce 1.

Komponenta	Koncentrace
DNA 10 ng/ 1 μ l	30 ng . 12,5 μ l ⁻¹
Pufr KCl	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	200 μ M
Primer F	0,4 μ M
Primer R	0,4 μ M
Enhancer – oxalacetát (Top-Bio)	2 mM
BSA	5 ng . 12,5 μ l ⁻¹
Taq polymeráza (Thermo SCIENTIFIC)	0,7U . 12,5 μ l ⁻¹

Tabulka 2: Složení a koncentrace komponent pro PCR pro amplifikaci genu *FGF5*

Pro amplifikaci byl použit thermocykler C1000TM Thermal Cycler (BIO RAD). Amplifikace probíhala podle následujícího programu FGF5284:

Iniciace	95 °C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	95 °C	30 sekund	} 34 cyklů
Annelace	63 °C	20 sekund	
Elongace	72 °C	30 sekund	
Finální elongace	72 °C	420 sekund	1 cyklus
Fáze udržování	12 °C	∞	

4.3.2 Detekce mutace metodou PCR – RFLP, restriční štěpení

Restriční enzym *PstI* (Thermo SCIENTIFIC) rozpoznává sekvenci 5' ... CTGCAG ... 3' v ampliconu který byl získán pomocí výše uvedených primerů a který má velikost 180 bp.

Tento enzym rozpoznává 2 štěpící místa a to v pozici 125. a 150. nukleotidu. Pozice 125. nukleotidu v získaném ampliconu je pozice kauzální mutace G>T. To znamená, že pokud se jedná o alelu s T v pozici 125 nukleotidu, dojde k rozštěpení ampliconu na 2 fragmenty o velikostí 150 a 30bp pokud se jedná o alelu s G v pozici 125bp, vzniknou fragmenty o velikosti 125, 30 a 25 bp. Pokud daný jedinec je z hlediska této mutace heterozygotní produkty restričního štěpení jsou fragmenty o velikost 150, 125, 30 a 25 bp.

Vlastní restriční štěpení probíhalo podle návodu uvedeného výrobcem enzymu při teplotě 37°C po dobu 16 hodin. Složení štěpící směsi je uvedeno v tabulce 2.

Vzniklé restriční fragmenty byly separovány v 4% agarozovém gelu po dobu 45 minut při konstantním napětí 120V. Fragmenty DNA byly vizualizovány pomocí ethidiumbromidu. Elektroforeogramy byly vyfoceny pomocí dokumentačního systému UV Transiluminátor (BIO RAD ChemiDoc XRS). Vlastní genotypizace probíhala na základě odečtení velikosti získaných restričních fragmentů.

Komponent	Objem μ l
Produkt PCR	5 μ l
H ₂ O	9 μ l
10 x Pufr O	1 μ l
<i>PstI</i>	1 μ l

Tabulka 3: Složení směsi pro restriční štěpení

4.4 Detekce duplikace v pozici 145- 156 nukleotidu genu *FGF5*

4.4.1 Amplifikace místa výskytu duplikace

Oblast s výskytem této duplikace byla amplifikována pomocí dvojice primerů, které byly navrženy na pracovišti Katedry genetiky a šlechtění ČZU v Praze. Byly použity primery FGF5-INDEL-F s následující sekvencí nukleotidů:

5'...GCTCACGGGGAGAAGCAC...3'

a FGF5-INDEL-R, se sekvencí nukleotidů:

3'...CGGAGGAAGAAGAGGAAGAC...5'

Primer FGFE-INDEL-F byl označený fluorescenční barvou VIC. Složení amplifikační reakce je uvedeno v následující tabulce:

Komponent	Koncentrace
DNA 10 ng/ 1µl	30 ng . 12,5 µl ⁻¹
Pufr KCl	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	200 µM
Primer F	0,4 µM
Primer R	0,4 µM
Enhancer – oxalacetát (Top-Bio)	2 mM
BSA	5 ng . 12,5 µl ⁻¹
<i>Taq</i> polymeráza (Thermo SCIENTIFIC)	0,7U . 12,5 µl ⁻¹

Tabulka 4: Složení a koncentrace komponent pro PCR pro amplifikaci genu *FGF5*

Pro amplifikaci byl použit thermocykler C1000TM Thermal Cycler (BIO RAD).

Amplifikace probíhala podle následujícího programu FGF5IND:

Iniciace	95 °C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	95 °C	30 sekund	} 34 cyklů
Annelace	62 °C	20 sekund	
Elongace	72 °C	30 sekund	
Finální elongace	72 °C	420 sekund	1 cyklus
Fáze udržování	12 °C	∞	

4.4.2 Detekce duplikace pomocí kapilární elektroforézy

Výše uvedený primerový pár poskytoval v případě 6 nukleotidové duplikace aplikon o velikosti 130 bp v případě absence této duplikace byl aplikon velký 124 bp.

Aplikované produkty byly naředěny ddH₂O v poměru 1:9. K 1 µl takto ředěného PCR produktu bylo přidáno 0,2 µl velikostního standardu LIZ 600 (Thermo SCIENTIFIC) a 12 µl Hi-Di Formamidu. Takto připravené vzorky byly denaturovány v termocykleru (95°C, 5minut) a následně prudce ochlazený na 4°C. Denaturované vzorky byly použity pro fragmentační analýzu s využitím přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Thermo SCIENTIFIC)



Obrázek 14: ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Thermo SCIENTIFIC)

Pro vlastní fragmentaci byl použit modul uvedený v následující tabulce:

Parametry fragmentační analýzy	Hodnoty přístroje
Délka kapiláry	36 cm
Modul	GS STR POP4 (1ml) 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 5: Parametry přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyser použitého při genetické analýze.

5 Výsledky

V tabulkách 1–6 v příloze jsou detailní výsledky pro každého jedince pro 6 plemen psů (německý ovčák, labradorský retriever, zlatý retriever, border kolie, bearded kolie, československý vlčák), kteří byli testováni v této bakalářské práci.

Testovali jsme, zda mutace genu *FGF5* zodpovědná za dlouhou srst je substituce cysteinu na fenylalanin (*FGF5*: p.Cys95Phe) nebo duplikace 6 nukleotidů ACCAGC (na pozici 145–156 bp). Jelikož se dlouhosrstost dědí recesivně, homozygot s mutantní alelou by měl být dlouhosrstý.

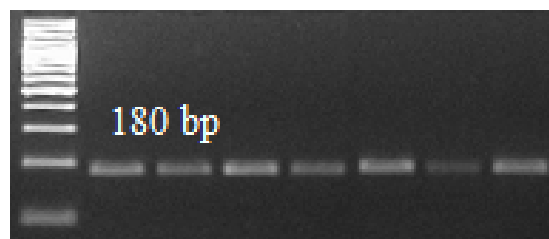
V tabulkách v příloze jsou uvedena čísla, plemeno, pohlaví, zbarvení srsti a zjištěné výsledky zda má jedinec mutovanou nebo nemutovanou alelu genu *FGF5*.

5.1 Substituční mutace *FGF5*

Dle postupu popsaném v kapitole 4. Materiál a metody. Bylo provedeno restriční štěpení enzymem *Pst1* (Thermo SCIENTIFIC), štěpícím v místě 150. a 125. bp. Pokud má amplicon na 125 místě nukleotid G, dojde k rozštěpení na 3 fragmenty (125, 30 a 25 bp). Pokud T, tak ke štěpení v tomto místě nedochází a amplicon se štěpí jen na dva fragmenty (150 a 30 bp). Heterozygot má fragmenty o velikosti 150, 125, 30 a 25 bp.

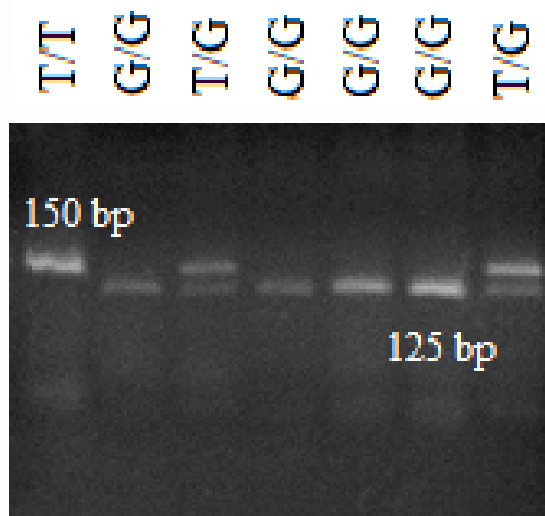
Gelovou elektroforézou byla detekována velikost fragmentů o velikosti 125 a 150 nukleotidů v poměru k hmotnostnímu standardu (GeneRuler 100 bp). V tabulkách 1-6 v přílohách jsou uvedeny zjištěné mutace pro každého jedince.

S PCR produkty před štěpením



S- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo SCIENTIFIC)

Obrázek 15: Elektroforeogram ampliconů před restričním štěpením. Velikost ampliconů porovnána s hmotnostním standardem



Obrázek 16: Elektroforeogram výsledků štěpení amplikonů restrikním enzymem Pst1

Z elektroforeogramů byly odečteny velikost rozštěpených fragmentů. Zjištěné výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách:

Tabulka 6 pro plemeno německý ovčák, bylo testováno 30 jedinců:

Velikost fragmentů	Genotyp	Počet vzorků	Délka srsti
125, 30 a 25 bp	G/G	22	Dlouhá
150, 125, 30 a 25 bp	G/T	2	Krátká
150 a 30 bp	T/T	6	Krátká

Tabulka 7 pro plemeno zlatý retriever, bylo testováno 30 jedinců:

Velikost fragmentů	Genotyp	Počet vzorků	Délka srsti
125, 30 a 25 bp	G/G	0	Dlouhá
150, 125, 30 a 25 bp	G/T	0	Krátká
150 a 30 bp	T/T	30	Krátká

Tabulka 8 pro plemeno labradorský retriever, bylo testováno 30 jedinců:

Velikost fragmentů	Genotyp	Počet vzorků	Délka srsti
125, 30 a 25 bp	G/G	30	Dlouhá
150, 125, 30 a 25 bp	G/T	0	Krátká
150 a 30 bp	T/T	0	Krátká

Tabulka 9 pro plemeno border kolie, bylo testováno 79 jedinců:

Velikost fragmentů	Genotyp	Počet vzorků	Délka srsti
125, 30 a 25 bp	G/G	0	Dlouhá
150, 125, 30 a 25 bp	G/T	0	Krátká
150 a 30 bp	T/T	79	Krátká

Tabulka 10 pro plemeno bearded kolie, bylo testováno 81 jedinců:

Velikost fragmentů	Genotyp	Počet vzorků	Délka srsti
125, 30 a 25 bp	G/G	0	Dlouhá
150, 125, 30 a 25 bp	G/T	0	Krátká
150 a 30 bp	T/T	81	Krátká

Tabulka 11 pro plemeno československý vlčák, bylo testováno 96 jedinců:

Velikost fragmentů	Genotyp	Počet vzorků	Délka srsti
125, 30 a 25 bp	G/G	86	Dlouhá
150, 125, 30 a 25 bp	G/T	8	Krátká
150 a 30 bp	T/T	2	Krátká

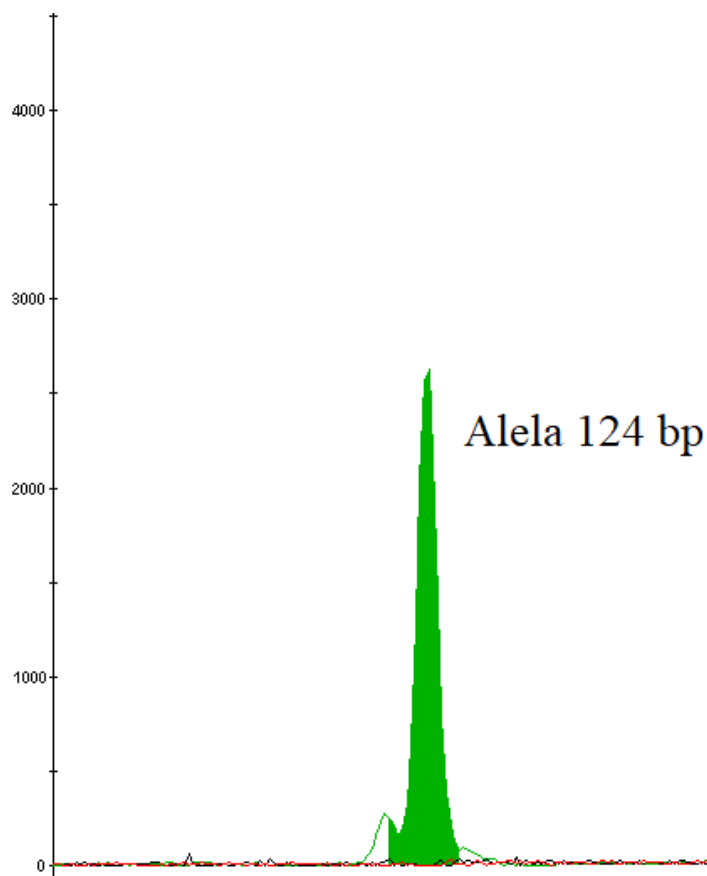
Mutace T/T ve všech případech korespondovala s dlouhosrstým fenotypem u daného psa. U všichni krátkosrstí psi vyšli ve výzkumu jako buď homozygoti pro G/G nebo heterozygoti G/T.

5.2 Duplikace v genu *FGF5*

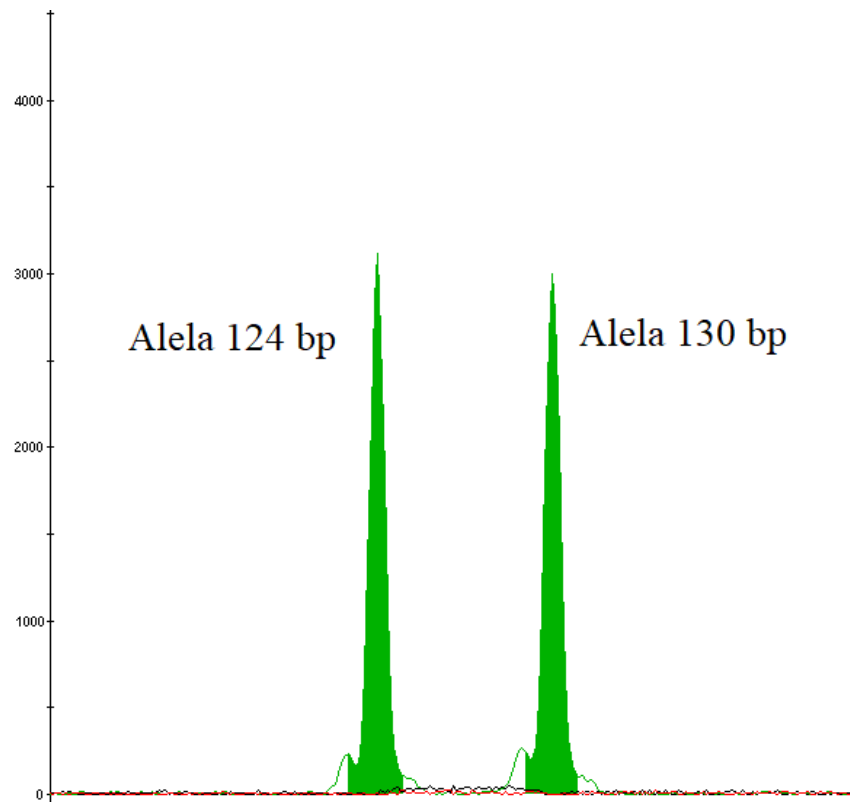
Dle postupu popsaném v kapitole 4. Materiál a metody byly amplifikovány vzorky DNA. DNA vzorků byla amplifikována pomocí primeru FGF5-INDEL-F, který byl označen barvou VIC. V případě duplikace byl tento amplikon 130 bp velký, bez mutace 124 bp.

Tato mutace byla zjišťována pomocí kapilární elektroforézy u 90 jedinců plemen německý ovčák, zlatý retriever a labradorský retriever.

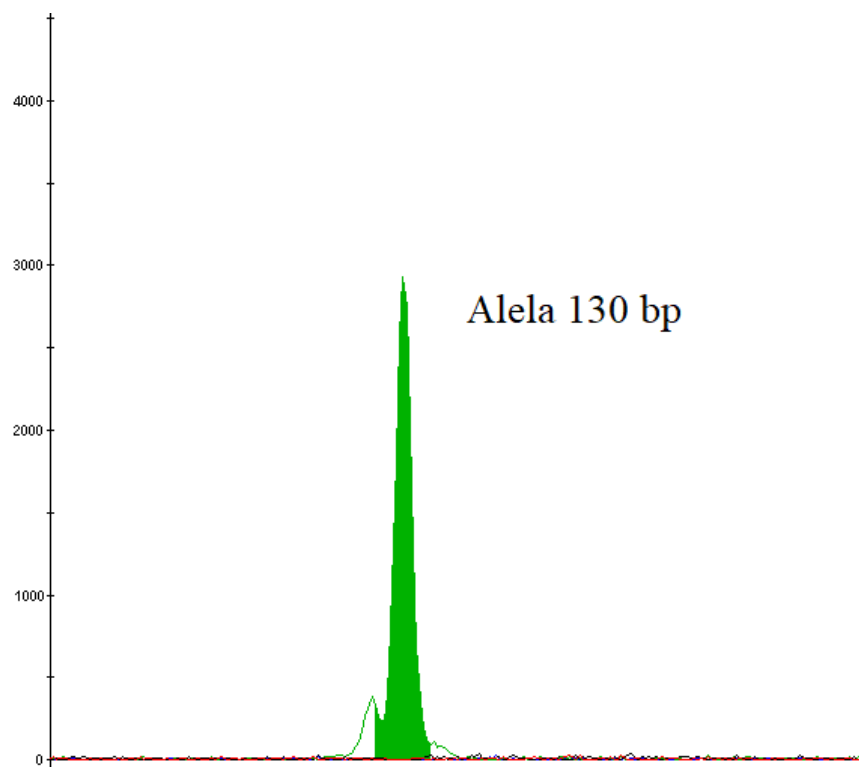
Následující obrázky ukazují výsledky fragmentační analýzy:



Obrázek 17: Výsledek fragmentační analýzy u homozygota s alelami 124/124



Obrázek 18: Výsledek fragmentační analýzy u heterozygota s alelami 124/130



Obrázek 19: Výsledek fragmentační analýzy u homozygota s alelami 130/130

V následujících tabulkách jsou data zjištěných genotypů:

Tabulka 12 pro plemeno německý ovčák, bylo testováno 30 jedinců:

Velikost fragmentů	Celkový počet vzorků	Z toho krátkosrstých	Z toho dlouhosrstých
124/124	9	3	6
124/130	7	7	0
130/130	14	14	0

Tabulka 13 pro plemeno zlatý retriever, bylo testováno 30 jedinců:

Velikost fragmentů	Celkový počet vzorků	Z toho krátkosrstých	Z toho dlouhosrstých
124/124	30	0	30
124/130	0	0	0
130/130	0	0	0

Tabulka 14 pro plemeno labradorský retriever, bylo testováno 30 jedinců:

Velikost fragmentů	Celkový počet vzorků	Z toho krátkosrstých	Z toho dlouhosrstých
124/124	1	1	0
124/130	6	6	0
130/130	23	23	0

U žádného jedince z dlouhosrstých plemen nebyla zjištěna alela o velikosti 130 bp, všichni dlouhosrstí jedinci byli homozygotní s alelou bez duplikace (124 bp/124 bp).

U krátkosrstých plemen se naproti tomu objevily všechny tři genotypové varianty 124/124, 124/130 i 130/130.

6 Diskuze

Tato bakalářská práce byla postavena na základě výzkumů autorů Housley a Venta (2006), Dierks a spol. (2013), Cadieu a spol. (2009), Suzuki a spol. (2000), kteří zkoumali geny ovlivňující strukturu srsti. Jako kandidátní mutace byly vybrány *FGF5:c.284G>T* a *FGF5:c.145_150dupACCAGC*, dle vzoru práce Housley a Venta (2006). Cílem této práce bylo ověřit, která z těchto mutací genu *FGF5* je zodpovědná za dlouhosrstý fenotyp u psů.

Dlouhá srst se u psů dědí recesivně a navíc je to mutace vzniklá v pozdější fázi šlechtění psích plemen, protože u vlků se nevyskytuje (Cadieu et al., 2009). Jedinec s dlouhou srstí musí tedy být homozygotní v mutantní alele.

Data získaná v této práci ukazují, že všichni psi s dlouhou srstí byli z hlediska substituční mutace genotypově T/T, jedinci s krátkou G/G nebo G/T (viz tabulky 15 – 11). U duplikační mutace byli sice všichni dlouhosrstí psi homozygoti (pro alelu 124/124), ale u krátkosrstých psů se vyskytovaly všechny 3 možné genotypové varianty - 124/124, 124/130 i 130/130 (viz tabulky 12 – 14)

Výsledky této bakalářské práce tedy potvrdili výsledky výzkumu Housley a Venta (2006). Mutace genu zodpovědná za dlouhou srst je substituce *FGF5:c.284G>T* (v proteinu se projevující jako *FGF5:p.Cys95Phe*). Nenašel se žádný důkaz, že by duplikační mutace měla u kteréhokoliv z testovaných plemen vliv na délku srsti.

Potvrdili se i jejich výsledky, že duplikace 6 bp (na pozici 145- 156 bp) se nevyskytuje u psů s mutací na dlouhou srst.

6.1 Plemena a standard jejich srsti

Bylo vybráno 5 plemen používaných při asistenčních aktivitách a navíc plemeno československý vlčák, vybrané jako kontrastní plemeno nevhodné pro asistenční účely.

Tato plemena mají různé standardy, co se týče typu a délky srsti.

Plemeno	Povolený standard srsti
Německý ovčák – FCI standard (2010)	Krátká, dlouhá
Zlatý retriever – FCI standard (2009)	Krátká, dlouhá
Labradorský retriever – FCI standard (2011)	Krátká
Border kolie – FCI standard (2009)	Krátká, dlouhá
Bearded kolie – FCI standard (2015)	Dlouhá
Československý vlčák – standard FCI (1999)	Krátká

Tabulka 16: Standardy srstí pro vybraná plemena

Z testovaných psů, byli všichni psi plemen zlatý retriever, border a bearded kolie homozygotní pro mutantní alelu pro dlouhou srst.

. U plemene německý ovčák a československý vlčák byli jedinci jak dlouhosrstého, tak krátkosrstého fenotypu.

U labradorských retrieverů byli všichni psi heterozygotní pro gen pro krátkou srst.

Plemeno	Všechny zjištěné varianty genotypu	Typ srsti
Německý ovčák	G/G, G/T, T/T	Krátká, dlouhá
Zlatý retriever	T/T	Dlouhá
Labradorský retriever	G/G	Krátká
Border kolie	T/T	Dlouhá
Bearded kolie	T/T	Dlouhá
Československý vlčák	G/G, G/T, T/T	Krátká, Dlouhá

Tabulka 17: Zjištěný genotyp a délka srsti pro testované jedince v této bakalářské práci

Žádný z testovaných psů, z plemen používaná pro asistenční účely, nebyl mimo svůj plemenný standard.

Tato situace ale nastala u plemene československý vlčák. Plemenný standard tohoto plemene povoluje pouze krátkou srst. Ale mezi testovanými jedinci se objevili jedinci, kteří byli nositeli alely pro dlouhou srst a dokonce 2 jedinci s dlouhou srstí.

7 Závěr

Literární přehled je zaměřen zejména na gen *FGF5* a jeho mutace. Tento gen je zodpovědný za délku srsti u mnohých zvířat. Dále je přehled zaměřen na obecné informace o struktuře, délce a typu psí srsti.

V experimentální části bylo testováno 6 plemen na přítomnost dvou mutací v genu *FGF5*, které byly vytipovány jako zodpovědné za dlouhou srst. 5 z použitých plemen byla plemena běžně využívaná pro asistenční účely (německý ovčák, labradorský retriever, zlatý retriever, border kolie, bearded kolie). Plemeno československý vlčák bylo vybráno jako kontrastní plemeno.

Výsledky této práce jsou shrnuty v následujících odrážkách:

- Kauzální mutace pro vznik dlouhosrstého fenotypu je substituční mutace *FGF5:c.284G>T*
- Tato mutace způsobuje substituci guaninu na tymin na 284. nukleotidu, v aminokyselinové sekvenci pak záměnu cysteinu na fenylalanin na 95. místě
- U všech testovaných dlouhosrstých jedinců se vyskytovala tato mutace. Krátkosrstí jedinci nesli buď původní alelu G/G nebo byli heterozygotní.
- U duplikační mutace 6 bp na pozici 145 *FGF5:c.145_150dupACCAGC* bylo dokázáno, že není zodpovědná za dlouhou srst u psů.
- U žádného jedince s dlouhou srstí se nevyskytuje současně i duplikační mutace *FGF5:c.145_150dupACCAGC*

Mezi některými plemeny (jako například československý vlčák) se začínají objevovat jedinci s dlouhou srstí, která je ale mimo plemenný standard. Pro chovatele tohoto plemene tak může být výhodné nechat si udělat testy na tuto mutaci, aby zabránili množení štěňat, která nesplňují plemenný standard. I u jiných plemen toho může být výhodné, ať už z jakéhokoliv důvodu chovatel nechce dlouhosrstá štěňata, například pro náročnost při údržbě dlouhé srsti.

8 Zdroje

Andl, T., Reddy, S. T., Gaddapara, T., Millar, S. E. 2002. WNT Signals Are Required for the Initiation of Hair Follicle Development. *Developmental Cell* [online]. 2 (5). 643-653. [cit. 2018-01-01]. DOI: 10.1016/S1534-5807(02)00167-3. ISSN: 15345807. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580702001673>

Bearded colie. 2015. FCI [online]. Thuin. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.fci.be/Nomenclature/Standards/271g01-en.pdf>

Border colie. 2009b. FCI [online]. Thuin. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.fci.be/Nomenclature/Standards/297g01-en.pdf>

Cadiou, E., Neff, M. W., Quignon, P., Walsh, K., Chase, K., Parker, H. G., VonHoldt, B. M., Rhue, A., Boyko, A., Byers, A., Wong, A., Mosher, D. S., Elkahlon, A. G., Spady, T. C., Andre, C., Lark, K. G., Cargill, M., Bustamante, C. D., Wayne, R. K., Ostrander, E. A. 2009. Coat Variation in the Domestic Dog Is Governed by Variants in Three Genes. *Science* [online]. 326 (5949). 150-153. [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1126/science.1177808. ISSN: 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1177808>

Clevers, H. 2006. Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* [online]. 127 (3). 469-480. [cit. 2018-01-01]. DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.018. ISSN: 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406013444>

Crowley-Robinson, P., Blackshaw, J. K. 2015. Nursing Home Staffs' Empathy for a Missing Therapy Dog, their Attitudes to Animal-Assisted Therapy Programs and Suitable Dog Breeds. *Anthrozoös* [online]. 11 (2). 101-104. [cit. 2018-04-13]. DOI: 10.2752/089279398787000779. ISSN: 0892-7936. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2752/089279398787000779>

Czechoclovakian wolfdog. 1999. FCI [online]. Thuin. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.fci.be/Nomenclature/Standards/332g01-en.pdf>

Dierks, C., Mömke, S., Philipp, U., Distl, O. 2013. Allelic heterogeneity of FGF5 mutations causes the long-hair phenotype in dogs. *Animal Genetics* [online]. 44 (4). 425-431. [cit. 2018-02-15]. DOI: 10.1111/age.12010. ISSN: 02689146. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/age.12010>

Drögemüller, C., Rüfenacht, S., Wichert, B., Leeb, T. 2007. Mutations within the FGF5 gene are associated with hair length in cats. *Animal Genetics* [online]. 38 (3). 218-221. [cit. 2018-02-26]. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2007.01590.x. ISSN: 0268-9146. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2052.2007.01590.x>

Erlich, H. A. 1989. Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology* [online]. 9 (6). 437-447. [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1007/BF00918012. ISSN: 0271-9142. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00918012>

Flat coated Retriever. 2009. FCI [online]. Thuin. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.fci.be/Nomenclature/Standards/121g08-en.pdf>

Fuchs, E., Chan, E., Gat, U., McNiff, J. M. 1999. A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nature Genetics* [online]. 21 (4). 410-413. [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1038/7747. ISSN: 10614036. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/7747>

Golden retriever. 2009a. FCI [online]. Thuin. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.fci.be/Nomenclature/Standards/111g08-en.pdf>

Hartl, K., Jedlička, J. 1996. Československý vlčák. Loba ve spolupráci s Klubem chovatelů československého vlčáka. Praha. ISBN: 80-239-1107-4.

Hébert, J. M., Rosenquist, T., Götz, J., Martin, G. R. 1994. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: Evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* [online]. 78 (6). 1017-1025. [cit. 2018-02-15]. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90276-3. ISSN: 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867494902763>

Housley, D. J. E., Venta, P. J. 2006. The long and the short of it: evidence that FGF5 is a major determinant of canine 'hair'-itability. *Animal Genetics* [online]. 37 (4). 309-315. [cit. 2018-02-26]. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2006.01448.x. ISSN: 0268-9146. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2052.2006.01448.x>

Jelínek, R., Jelínek, M., Likovský, Z., Halašková, M., Maňáková, E., Peterka, M., Titlbach, M., Velický, J., Zemanová, Z., Peterková, R. 2001. *Histologie a embryologie* [online]. . 193. [cit. 2018-02-26]. Dostupné z: <http://histologie.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>

Kašička, V. 1997. Teoretické základy kapilárních a elektromigračních metod. In: *Chemické listy*. 320 - 329.

Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., Wu, W. 2004. R-Spondin2 Is a Secreted Activator of Wnt/ β -Catenin Signaling and Is Required for *Xenopus* Myogenesis. *Developmental Cell* [online]. 7 (4). 525-534. [cit. 2018-01-02]. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.07.019. ISSN: 15345807. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580704002813>

Kučerová, R., Bienová, M. 2012. Úvod do klinické trichologie [online]. . 120 - 121. [cit. 2018-02-26]. Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2012/03/02.pdf>

Kwong, M. J., Bartholomew, K. 2011. „Not just a dog”: an attachment perspective on relationships with assistance dogs. *Attachment & Human Development* [online]. 13 (5). 421-436. [cit. 2018-04-14]. DOI: 10.1080/14616734.2011.584410. ISSN: 1461-6734. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14616734.2011.584410>

Labrador retriever. 2011. FCI [online]. Thuin. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.fci.be/Nomenclature/Standards/122g08-en.pdf>

Legrand, R., Tiret, L., Abitbol, M. 2014. Two recessive mutations in FGF5 are associated with the long-hair phenotype in donkeys. *Genetics Selection Evolution* [online]. 46 (1). -. [cit. 2018-02-26]. DOI: 10.1186/s12711-014-0065-5. ISSN: 1297-9686. Dostupné z: <http://gsejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12711-014-0065-5>

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. [online]. . -. [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.3791/3923. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546956>

Lewis, M. 2015. Agarose gel electrophoresis (basic method) [online]. Department of Pathology. Liverpool. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <http://www.methodbook.net/dna/agarogel.html>

LIU, H. -Y., YANG, G. -Q., ZHANG, W., ZHU, X. -P., JIA, Z. -H. 2009. Effects of IFGF5/I gene on fibre traits on Inner Mongolian cashmere goats. *Hereditas (Beijing)* [online]. 31 (2). 175-179. [cit. 2018-02-26]. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00175. ISSN: 0253-9772. Dostupné z: <http://pub.chinasciencejournal.com/article/getArticleRedirect.action?doiCode=10.3724/SP.J.1005.2009.00175>

Meuten, D. J. c2002. Tumors in domestic animals. 4th ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa. ISBN: 0-8138-2652-7.

Ostrander, E. A., Ruvinsky, A. (ed.). c2012. The genetics of the dog. 2nd ed. CABI. Wallingford. ISBN: 978-1-84593-940-3.

Ota, Y., Saitoh, Y., Suzuki, S., Ozawa, K., Kawano, M., Imamura, T. 2002. Fibroblast Growth Factor 5 Inhibits Hair Growth by Blocking Dermal Papilla Cell Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 290 (1). 169-176. [cit. 2018-02-15]. DOI: 10.1006/bbrc.2001.6140. ISSN: 0006291x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X01961406>

Snustad, D. P., Simmons, M. J. 2009. Genetika. přeložil Anna MATALOVÁ. Masarykova univerzita. Brno. ISBN: 9788021048522

Suzuki, S., Kato, T., Takimoto, H., Masui, S., Oshima, H., Ozawa, K., Imamura, T. 1998. Localization of Rat FGF-5 Protein in Skin Macrophage-like Cells and FGF-5S Protein in Hair Follicle: Possible Involvement of twoFgf-5 Gene Products in Hair Growth Cycle Regulation. *Journal of Investigative Dermatology*. 111 (6). 963-972. DOI: 10.1046/j.1523-

1747.1998.00427.x. ISSN: 0022202x. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15403045>

Suzuki, S., Ota, Y., Ozawa, K., Imamura, T. 2000. Dual-Mode Regulation of Hair Growth Cycle by Two Fgf-5 Gene Products. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 114 (3). 456-463. [cit. 2018-02-15]. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00912.x. ISSN: 0022202x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1540795X>

Svobodová, I. 2010. Využití zvířat v zoorehabilitaci. Česká zemědělská univerzita v Praze. V Praze. ISBN: 978-80-213-2129-8.

Yamamoto, M., Ohtani, N., Ohta, M. 2011. The response of dogs to attentional focus of human beings: A comparison between guide dog candidates and other dogs. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* [online]. 6 (1). 4-11. [cit. 2018-04-14]. DOI: 10.1016/j.jveb.2010.10.002. ISSN: 15587878. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1558787810002200>

Weiss, E., Greenberg, G. 1997. Service dog selection tests: Effectiveness for dogs from animal shelters. *Applied Animal Behaviour Science* [online]. 53 (4). 297-308. [cit. 2018-04-14]. DOI: 10.1016/S0168-1591(96)01176-8. ISSN: 01681591. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168159196011768>