

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Mutace genu *SOD1* u plemene rhodéský ridgeback
a jejich vztah k degenerativní myelopatii**

Bakalářská práce

Autor práce: Michaela Trousilová

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mutace genu *SOD1* u plemene rhodéský ridgeback a jejich vztah k degenerativní myelopatii" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7.4.2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi a Ing. Daniele Čílové za odborné vedení, pomoc, ochotu, trpělivost a poskytnuté rady v průběhu zpracování mé bakalářské práce. Dále bych také ráda poděkovala Ing. Jakubu Vaškovi, Ph.D. za odborné informace při zpracovávání výsledků. Poděkování patří rovněž Českému klubu rhodéských ridgebacků za poskytnutí vzorků a informací o hodnocených psech.

Mutace genu *SOD1* u plemene rhodéský ridgeback a jejich vztah k degenerativní myelopatii

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá detekcí polymorfismů genu *SOD1* molekulárními metodami a vyhodnocením vztahu k onemocnění degenerativní myelopatie u psů.

První částí bakalářské práce je část teoretická tedy literární rešerše, která pojednává o zařazení plemene rhodéský ridgeback do skupiny a její popsání. Pokračuje detailním popisem plemene rhodéský ridgeback z hlediska historie, charakteristiky, povahových rysů a zdravotního stavu tohoto plemene. Dále je zmíněno onemocnění degenerativní myelopatie, vyskytující se též u plemene rhodéský ridgeback, avšak i u dalších plemen. Degenerativní myelopatie u psů je popsána z hlediska klinických příznaků, diagnostiky a léčby. Rovněž jsou uvedeny informace o genu *SOD1* a na něm se vyskytující kauzální mutaci, která spočívá v záměně nukleotidů G a A v exonu 2, jež předpovídá mutaci na pozici E40K. Taktéž byla nastíněna podobnost degenerativní myelopatie u psů s lidskou amyotrofickou laterální sklerózou. Nakonec tohoto oddílu jsou uvedeny popisy laboratorních metod týkající se molekulární biologie, které byly použity pro výzkumnou část bakalářské práce, a to PCR konkrétněji PCR-RFLP a gelová elektroforéza.

Další oddíl bakalářské práce je praktická část, která je zaměřena na materiály a metody použité pro výzkumnou část práce. Uvedeny jsou hodnocené genotypy, celý postup izolace DNA a to od odběru vzorků, přes izolaci genomické DNA, až po hodnocení kvality a kvantity izolované DNA. Dále je uveden PCR-RFLP marker kauzální mutace genu *SOD1* vedoucí k degenerativní myelopatii u psů a to od volby restriktivního enzymu schopného rozlišit alely genu *SOD1*, přes použití PCR-RFLP markeru kauzální mutace genu *SOD1* a použití sekvenčních primerů, až po podmínky pro amplifikaci fragmentu genu *SOD1* vymezeného k sekvenaci.

V posledním oddílu bakalářské práce je uvedeno vyhodnocení izolace genomické DNA a hodnocení její kvality a kvantity, detekce mutace genu *SOD1* metodou

PCR-RFLP, sekvenační analýza exonu 2 genu *SOD1* a genealogická studie přenašečů degenerativní myelopatie u modelové populace plemene rhodéský ridgeback.

Výsledkem této bakalářské práce je potvrzení hypotézy, že mutace v exonu 2 genu *SOD1* mohou být kauzální z hlediska predispozice psů k degenerativní myelopatii.

Klíčová slova: rhodéský ridgeback, *Canis lupus familiaris* L., degenerativní myelopatie, *SOD1*, kauzální mutace, PCR-RFLP

Mutations in the Gene *SOD1* the Breed Rhodesian Ridgeback and their Relationship to Degenerative Myelopathy

Summary

In this bachelor work I am interested with detection of polymorphisms of gen *SOD1* by molecular methods and evaluation of relations to degeneration myelopathy disease in dogs.

In the first part of bachelor work is theoretical part thus literature search which deals with inclusion of breed of Rhodesian ridgeback to group and its description. Continue with detailed description of breed Rhodesian ridgeback in terms of history, characteristics, temperament and health status of the breed. Next is mentioned degenerative myelopathy disease affects Rhodesian ridgeback also other breeds. Degenerative myelopathy of dogs is describe in terms clinical signs, diagnose and treatment. Also information about gen *SOD1* and its casual station, which is consist in substitution of nucleotides G and A on exon 2, which predicts station on E40K, are listed. Also similarity of dog degenerative myelopathy and human amyotrophic laterally sclerosis is outlined. At the end of this section are listed description of laboratory methods which are relates to molecularly biology and which were used for research part of bachelor work, specifically PCR-RFLP and gel electrophoresis.

Next section of bachelor work is practical part, which is aimed on materials and methods used for research part of work. Evaluated genotypes and whole procedure of isolation of DNA, from collecting samples through isolation of genomic DNA until evaluation of quality and quantity of isolated DNA are listed. Next PCR-RFLP marker of casual station of gen *SOD1* leads to dog degenerative myelopathy from choose of restriction enzyme able distinguish alleles of gen *SOD1*, through use of PCR-RFLP marker casual station of gen *SOD1* and use of sequence primers, until conditions for amplification of fragment of gen *SOD1* defined for sequenation are listed.

In the last section of bachelor work is listed evaluation of isolation of genomic DNA and evaluation its quantity and quality, detection of station of gen *SOD1* PCR-RFLP, sequency analysis of exon 2 of gen *SOD1* and genealogical study of transporters of degenerative myelopathy in model population of Rhodesian ridgeback breed.

Result of this bachelor work is confirmation of hypothesis of mutation on exon 2 of gen *SOD1* may be casual in terms of predisposition for dog degenerative myelopathy.

Keywords: rhodesian ridgeback, *Canis Lupus familiaris* L., degenerative myelopathy, *SOD1*, causal mutation, PCR-RFLP

Obsah

1 ÚVOD	1
2 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	2
2.1 Vědecké hypotézy	2
2.2 Cíle bakalářské práce	2
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE	4
3.1 Honiči, barváři a příbuzná plemena	4
3.1.1 Honiči.....	4
3.1.1.1 Náruživí lovci	4
3.1.1.2 Velcí honiči	5
3.1.1.3 Středně velcí honiči	5
3.1.1.4 Malí honiči.....	5
3.1.2 Barváři	5
3.1.3 Příbuzná plemena.....	6
3.2 Rhodéský ridgeback	6
3.2.1 Historie plemene	6
3.2.2 Charakteristika plemene	8
3.2.3 Povaha plemene	9
3.2.4 Zdravotní stav plemene.....	10
3.3 Degenerativní myelopatie	12
3.3.1 Definice.....	12
3.3.2 Klinické příznaky degenerativní myelopatie	13
3.3.3 Diagnostika degenerativní myelopatie.....	14
3.3.4 Léčba degenerativní myelopatie	15
3.3.5 <i>SOD1</i>	15
3.3.6 Psi s DM jako modely pro ALS.....	20
3.3.7 Amyotrofická laterální skleróza.....	21
3.4 Polymerázová řetězová reakce	22
3.4.1 Princip metody PCR	22
3.4.2 Výhody a nevýhody PCR	24
3.4.3 Využití PCR.....	25
3.5 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)	25
3.6 Gelová elektroforéza	26

4	Materiál a metody	28
4.1	Hodnocené genotypy	28
4.2	Izolace DNA	30
4.2.1	Odběr vzorků DNA.....	30
4.2.2	Izolace DNA	31
4.2.3	Kvalita a kvantita izolované DNA.....	31
4.3	PCR-RFLP marker kauzální mutace genu <i>SOD1</i> vedoucí k degenerativní myelopatii u psů	32
4.3.1	Volba restrikčního enzymu schopného rozlišit alely genu <i>SOD1</i>	32
4.3.2	Použití PCR-RFLP markeru kauzální mutace genu <i>SOD1</i>	32
4.3.3	Použití sekvenčních primerů.....	34
4.3.4	Podmínky pro amplifikaci fragmentu genu <i>SOD1</i> vymezeného k sekvenaci.....	34
4.4	Sekvenační analýza PCR-RFLP markeru kauzální mutace genu <i>SOD1</i> ..	35
4.4.1	Gelová purifikace PCR produktů markeru genu <i>SOD1</i>	35
4.4.2	Příprava vzorků k sekvenaci	35
4.4.3	Příprava sekvenační reakce.....	36
4.4.4	Purifikace produktu sekvenační reakce	36
4.4.5	Rozpoznání sekvencí pomocí kapilární elektroforézy.....	37
4.4.6	Bioinformatické vyhodnocení polymorfismů sekvenovaného markeru genu <i>SOD1</i>	37
4.4.7	Genealogická studie – sestavení rodokmenů	38
5	VÝSLEDKY	39
5.1	Izolace genomické DNA a hodnocení její kvantity a kvality	39
5.1.1	Testování vysokomolekularity DNA	39
5.1.2	Hodnocení kvantity a kvality izolované DNA.....	40
5.2	Detekce mutace genu <i>SOD1</i> metodou PCR-RFLP.....	40
5.2.1	Amplifikace monomorfního PCR produktu a ověření jeho velikosti elektroforézou	40
5.2.2	Hodnocení polymorfismů restrikčním štěpením.....	41
5.2.3	Výsledky PCR-RFLP testu u modelové populace plemene rhodéský ridgeback.....	41
5.3	Sekvenační analýza exonu 2 genu <i>SOD1</i>	43
5.3.1	Porovnání sekvencí exonu 2 u vybraných zástupců plemene rhodéský ridgeback.....	43
5.3.2	Porovnání aminokyselinové sekvence proteinu kódovaného exonem 2 u psů s genotypem N/N a DM/DM.....	46

5.4	Genealogická studie přenašečů degenerativní myelopatie u modelové populace plemene rhodéský ridgeback	46
5.4.1	Sestavení rodokmenů nalezených přenašečů	46
5.4.2	Vyhodnocení blízkých rodin nalezených přenašečů a nalezení teoretických zdrojů mutované alely genu <i>SOD1</i>	53
6	DISKUSE	56
6.1	Volba plemene rhodéský ridgeback pro studium genetických příčin DM.....	56
6.2	Izolace DNA a hodnocení její kvality a kvantity	56
6.3	Detekce kauzální mutace <i>SOD1</i> genu u plemene rhodéský ridgeback pomocí sekvenace	57
6.4	Detekce kauzální mutace <i>SOD1</i> genu u plemene rhodéský ridgeback pomocí PCR-RFLP	59
6.5	Frekvence výskytu mutované alely genu <i>SOD1</i> u plemene rhodéský ridgeback.....	59
6.6	Analýza rodokmenů a vyhledání potenciálního zdroje mutované alely genu <i>SOD1</i> u plemene rhodéský ridgeback	60
7	ZÁVĚR.....	62
8	SEZNAM LITERATURY	64
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	68
10	SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY	70

1 ÚVOD

V 19. stol se rozšířilo využití plemene rhodéský ridgeback díky jeho vlastnostem, kterými jsou nebojácnost, vytrvalost, inteligence a výborné lovecké schopnosti. V té době se toto plemeno používalo především jako lovecký pes. V dnešní době plemeno rhodéský ridgeback slouží ke dvěma účelům, které byly dány zájmem veřejnosti o psa hlídacího a zároveň psa rychlého a vytrvalého.

Rhodéský ridgeback se od ostatních plemen odlišuje specifickým znakem tzv. ridgem, což je hřeben obráceně rostoucí srsti vedoucí uprostřed hřbetu rhodéského ridgebacka.

Podobně jako i jiná plemena též rhodéský ridgeback trpí nemocemi, které jsou geneticky podmíněné různými mutacemi v řetězci DNA. Jednou z těchto nemocí je degenerativní myelopatie.

Degenerativní myelopatie u psů je geneticky podmíněné recesivní onemocnění, které je charakteristické rozšířenou demyelizací a ztrátou axonů zejména v hrudní a bederní míše, což vede k narušování systému drah neurologických vzruchů a tím k poruchám pohyblivosti. Původně bylo toto onemocnění nazýváno myelopatie německých ovčáků, protože se myslelo, že je specifické pro německého ovčáka. Ovšem od doby raných pozorování byla degenerativní myelopatie diagnostikována u několika dalších plemen včetně rhodéského ridgebacka, welsh corgi pembroke, boxera nebo chesapeake bay retrievera.

Při studiu jedinců různých plemen psů, kteří trpí degenerativní myelopatií, byla zjištěna shodná mutace na genu *SOD1*, která spočívá v záměně nukleotidů G a A v exonu 2, jež předpovídá mutaci na pozici E40K. Protože výskyt této nemoci je rozšířen napříč plemen, které mohou onemocnět degenerativní myelopatie, výzkum této nemoci se často ubírá cestou molekulární biologie.

V této bakalářské práci se snažím na vybrané skupině rhodéských ridgebacků s predispozicí k degenerativní myelopatii identifikovat mutace, o kterých předpokládám, že mají přímou souvislost s tímto onemocněním. V této práci popisují všechny postupy a metody experimentu, od výběru hodnocených zvířat a odběru vzorků z bukálních sliznic až po analýzu DNA a detekci genu *SOD1*, který je kauzální pro degenerativní myelopatii u psů.

2 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

2.1 Vědecké hypotézy

Cílem práce je ověřit platnost následujících vědeckých hypotéz:

- V literárních zdrojích je uváděno, že plemeno rhodéský ridgeback patří do skupiny plemen s výskytem onemocnění degenerativní myelopatie.
- Je známo několik typů kauzálních mutací genu *SOD1*, které vedou ke vzniku degenerativní myelopatie. Mutace genu *SOD1:c.118G > A* je považovaná za nejčastější příčinu vzniku degenerativní myelopatie. Lze předpokládat, že i u plemene rhodéský ridgeback bude onou kauzální mutací.
- Metoda PCR-RFLP představuje dostatečně citlivý postup, kterým lze odhalit výše uvedenou mutaci. PCR-RFLP markery vykazují kodominantní charakter a umožňují odlišit homozygoty a heterozygoty z hlediska této mutace. Sekvenačními technikami lze jednoznačně ověřit spolehlivost a citlivost PCR-RFLP markeru.
- U zástupců plemene rhodéský ridgeback chovaných v České republice nepatří degenerativní myelopatie mezi frekventovaná onemocnění. Lze však předpokládat, že v české populaci u tohoto plemene se mohou vyskytovat přenašeči, u kterých se onemocnění neprojeví.
- Lze vyslovit hypotézu, že původ mutované alely genu *SOD1* v české populaci rhodéských ridgebacků je odvozen z importovaných zahraničních psů.
- U plemene rhodéský ridgeback existuje detailně zpracovaná rodokmenová databáze a na základě porovnání rodokmenů hodnocených přenašečů lze vyhledat hypotetického donora mutované alely genu *SOD1*.

2.2 Cíle bakalářské práce

Konkrétní cíle práce vycházejí z výše uvedených hypotéz a lze je shrnout do následujících bodů:

- Na základě spolupráce s Českým klubem rhodéských ridgebacků získat vzorky psů v podobě stěrů bukalních sliznic.
- Izolovat vysokomolekulární genomickou DNA a ověřit její kvalitu a kvantitu.
- U vzorků populace aplikovat PCR-RFLP marker mutace genu *SOD1:c.118G > A* u vzorku populace rhodéských ridgeback chovaných v České republice.

- Pomocí sekvenace PCR ampliconu ověřit spolehlivost metody PCR-RFLP.
- Provést charakterizaci tohoto vzorku populace z hlediska výskytu frekvence mutované a nemutované alely genu *SOD1* a na základě studia rodokmenu hodnocených zvířat vytipovat potenciální zdroj mutované alely.
- Doporučit chovatelům, jak přistupovat k možnostem využití molekulární detekce mutace genu *SOD1* při výběru rodičů.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

V literární rešerši se nejprve zaměřím na charakteristiku skupiny, do které je řazen rhodéský ridgeback, poté na charakteristiku samotného plemene rhodéský ridgeback a nemoci degenerativní myelopatie u psů a nakonec se budu věnovat DNA analýze.

3.1 Honiči, barváři a příbuzná plemena

3.1.1 Honiči

Předkové honičů byli známi již v Antice. Ovšem obdobím rozvoje honičů byla feudální Evropa. Tehdy králové a císaři přeměnili některé krajinářské celky v pravé lovecké ráje, kde vysazovali lesy a vydržovali si tam veliké smečky loveckých psů pro ukojení své lovecké vášně (Krämerová, 2010).

Jak Krämerová (2010) ve své knize uvádí, časy družinových honů skončily spolu s úpadkem šlechtitelského stavu. Mnoho psů nenáviděné šlechty přišlo o život také během francouzské revoluce. Před druhou světovou válkou byly lovecké štvanice za pomoci smeček loveckých psů zakázány v Německu. Zatímco v Anglii byl hon na lišku ještě v nedávné době velmi oblíben, ve Francii byla tradice honu na lišku s velkým zájmem obnovena a je čím dál populárnější. Díky těmto loveckým událostem se znovu začala objevovat i některá původní plemena loveckých psů.

3.1.1.1 Náruživí lovci

Náruživí lovečtí psi jsou všichni honiči, kteří i přesto, že pracují ve velké vzdálenosti od pána, tak si s ním udržují neustálý kontakt. Mají vynikající čich, díky kterému jim neujde stopa žádného zvířete. Tito psi mají tak vrozený lovecký instinkt, že v případě, kdy mají neloveckého pána, jsou těžko zvladatelní při zachycení stopy, avšak tento problém nelze vyřešit pouhou výchovou. Tito lovečtí psi nejsou teritoriálně orientovaní, jejich revíry se nacházejí tam, kde se právě loví, a proto nemohou plnit funkci ochranného či strážného psa. Ve velkých smečkách vždy dodržují pravidla dominance a subordinace, přesto jsou k lidem přátelští a sociálně únosní. Pána a lovce, jenž tyto psy vlastní, považují jeho psi za toho, kdo o ně pečuje, kdo určuje zahájení a ukončení štvanice, kdo má právo uštvanou zvěř nakonec usmrtit a přisoudit spolupracujícím psům podíl na kořisti. Lovec pro ně představuje výše postavenou autoritu v hierarchii, které jsou povinni se podřídit (Krämerová, 2010).

3.1.1.2 Velcí honiči

Velcí honicí psi jsou psi pronásledující štvanou zvěř v početné smečce až do úplného vyčerpání kořisti a jejího skolení lovcem. Jsou využíváni při honu na lišku, srnce nebo jelena. Lovci na koních následují honiče často daleko za nimi, řídí se štěkotem psů, díky kterému zkušený lovec na koni rozezná podle síly a barvy štěkotu, jaký druh zvěře psi pronásledují a v jaké vzdálenosti od pronásledovaného zvířete jsou. Lovci na koni se se psy dorozumívají pomocí lesních rohů, kterými je mohou zavolat zpět v případě, že ztratili stopu či je odlákat z falešné stopy (Krämerová, 2010).

3.1.1.3 Středně velcí honiči

Řadíme mezi ně brakýře přizpůsobené loveckému prostředí a lovu zvěře. Revíry těchto psů jsou nepřístupné regiony, jako jsou například hustě zarostlé lesní oblasti Švédska, Finska a Ruska, horské lesy Norska nebo krasové oblasti na Balkáně, horská krajina v Itálii a alpské regiony Švýcarska a Rakouska. V takovýchto regionech jdou honiči po stopě samostatně a štvanou zvěř nahánějí ve velkém oblouku před flinty myslivců. Klasický lov pomocí brakýřů je prováděn pouze ve velkých revírech, které ovšem u nás ani v Německu již prakticky neexistují. Přesto jsou tito psi stále oblíbenějšími a to především v rodinách myslivců. Díky tomu, že do oněch regionů zasahuje člověk minimálně, zvěř zde má velkou možnost úkrytu a není tedy možné nalézt postřelenou zvěř bez stopařského psa (Krämerová, 2010).

3.1.1.4 Malí honiči

Malí honicí psi mají sice krátké nohy, díky čemuž jsou pomalejší, avšak v hustě zarostlém terénu se orientují rychleji než velcí honiči. Též pěšímu chodci se lépe následují tito menší psi. Malí honiči jsou vytrvalí, houževnatí psi, kteří jsou schopní pronásledovat ve dvou či větší skupině vše od velikosti králíka až po divoké prase (Krämerová, 2010).

3.1.2 Barváři

Jsou to specialisté pro sledování poraněné spárkaté zvěře, schopní sledovat mnoho hodin starou stopu na velkou vzdálenost.

3.1.3 Příbuzná plemena

Patří mezi ně dalmatin, jehož původ není znám a je to pouze doprovodný pes, a rhodéský ridgeback, jenž byl vyšlechtěn v Africe pro lov křížením různých ras psů.

3.2 Rhodéský ridgeback

3.2.1 Historie plemene

Původ rhodéského ridgebacka je velmi starodávný. První psi s hřebenem zpětně rostoucí srsti na hřbetě se objevili již v Egyptě 3000 let před n. l. Tyto poznatky byly získány z řezb a maleb, které byly nalezeny v hrobech faraonů. Rhodéský ridgeback má na hřbetě hřeben s obráceně rostoucí srstí, jak zobrazuje jedna dřevorezba. Na některých malbách jsou zobrazeni kupírovaní ridgebacki lovící v poušti antilopy. Jasně u něj je běžné starověké dědictví, které můžeme vidět ve zbarvení a chování tehdejších plemen vyskytujících se v této oblasti jako byl například faraonský chrt, azavak, saluka, greyhound, sluga či ibizský podengo (Chamberlainová, 2002).

Pravděpodobně díky velkému stěhování národů po Africe se psi s hřebenem obráceně rostoucí srsti dostali do jižní Afriky.

Charles Helm byl nejslavnějším člověkem spojeným s ridgebacky dávných dob. V roce 1875 založil misií v dnešní Zimbabwe. Přivezl si z Kimberly dvě feny typu chrta, jmenovaly se Powder a Lorna. Těmito fenami byl nesmírně fascinován slavný lovec a cestovatel Cornelius Von Rooyen, který byl jedním z návštěvníků misie reverenda Helma, a tak nechal jeho feny nakrýt svými loveckými psy. Avšak ani jeden ze dvou Helmových psů neměli ridge, ale u potomků Von Rooyenových psů se hřebeny objevily. Tito psi jsou zakladateli dnešního rhodéského ridgebacka (Chamberlainová, 2002).

Cornelius Von Rooyen pokračoval v selekci svých loveckých psů a to podle přítomnosti ridge, nebojácnosti, vytrvalosti a výborných loveckých vlastností. Jeho psi se stali legendami. Byli hodně žádaní. Používali se především jako lovečtí psi, k honu a přinášení zvěře. Byli též známí pro svou chytrost, vytrvalost, inteligenci a vlastnostmi, které Von Rooyen šlechtil (Chamberlainová, 2002).

Dnes můžeme u plemene vidět dvojdílnost. Základ dvojdílnosti plemene byl dán tím, že farmáři měli větší zájem o psa, který by hlídal farmu, a lovci měli větší zájem o velmi

rychlého psa s vytrvalostí při honu. Rhodéský ridgeback je tedy opravdu dvojúčelový pes, pracovní pes na farmě pasoucí dobytek a střežící dům a honící pes na všechny typy zvěře (Chamberlainová, 2002).

Plukovník Francis Barnes z Mashonalandu křížil přímé potomky Von Rooyenových psů, Dinga a Judy, kteří se stali základem chovatelské stanice Eskdale.

V roce 1918 byl předveden první ridgeback na zemědělské výstavě v Bulawayu. Krátce po výstavě se nadšenci rozhodli pro sestavení standardu pro toto plemeno a pomohli si standardem dalmatina. V roce 1922 byl standard předložen Kennel Union of Southern Africa (KUSA). V roce 1926 byl standard rhodéského ridgebacka po revizi přijat. A roku 1928 byl jihoafrický standard rhodéského ridgebacka přijat i Kennel Clubem. American Kennel Club uznal toto plemeno v roce 1955, standard rhodéského ridgebacka převzal ze standardu Kennel Union of Southern Africa. V roce 1924 byli Kennel Union of Southern Africa zaregistrováni první dva rhodéští ridgebackové z chovatelské stanice Grootedam pana L. Herringa (Chamberlainová, 2002).

Dnešní plemeno rhodéského ridgebacka je odvozeno pravděpodobně od psů Khoinkhoiňů zkřížených se psy typu mastifa, chrta a skotským jelením psem.

Během druhé světové války poklesl zájem o rhodéského ridgebacka a tak muselo hodně chovatelských stanic ukončit svou činnost. Za obnovu chovu plemene rhodéského ridgebacka v Jižní Africe se zasloužila roku 1960 paní Mylda Arsenisová za pomoci paní Irene Kingcombeové (Chamberlainová, 2002).

Chov v České republice

Jak Chamberlainová (2002) uvádí ve své knize, v srpnu roku 1987 byly dovezeny první ridgebackové ještě do Československé socialistické republiky. Byla to fena jmenující se Amy Red Wayside ze Zambie a Merigals Elanda ze Švýcarska. První pes byl též přivezen ze Zimbabwe. První vrh Merigals Elandy se narodil v Brně. Z potomků jejího druhého vrhu byla založena chovatelská stanice Rhodana (paní Polákové).

O chov rhodéského ridgebacka v České republice se starají dva chovatelské kluby ato Český klub rhodéských ridgebacků a Klub chovatelů rhodéských ridgebacků Brno.

3.2.2 Charakteristika plemene

Rhodéský ridgeback je podle FCI řazen do 8. skupiny honiči, barváři a příbuzná plemena, sekce 3 příbuzná plemena.

Plemeno rhodéského ridgebacka je dnes velmi oblíbené. Dle Chamberlainové (2002) obliba tohoto plemene neustále vzrůstá a to především ve Velké Británii, Spojených státech, Španělsku, ale i ostatních evropských zemích stejně jako v Austrálii a na Novém Zélandě.

Spoustu lidí přitahuje právě zajímavý charakteristický znak tohoto plemene a tím je ridge. Ridge je hřeben vedoucí uprostřed hřbetu psa, ovšem tato srst roste směrem k hlavě, kde opět přechází chlupy v růst normálním směrem. Víry v srsti tvoří dvě korunky u vrcholku ridge. Někdy můžeme nalézt také vějířky kolem korun.

Srst je krátká, hladká, hustá a lesklá. Barva srsti je světle pšeničná až červeně pšeničná.

Rhodéští ridgebackové jsou psi inteligentní s dlouho pamětí, jsou schopní řešit problémy. Jsou oddaní rodině, avšak je třeba, aby měli majitele s vůlí k disciplíně a to už od malého štěněte, které si přinesou domů. Není potřeba je cvičit na obranu.

Stavbu těla má toto plemeno vyváženou. Je to plemeno elegantní, silné, svalnaté. Hlava je střední délky, plochá a široká mezi ušima, kde se v klidu netvoří žádné vrásky. Krk má poměrně dlouhý, silný a bez volné kůže na hrdle. Hrudník je nepřilíš široký, ale za to velmi hluboký a prostorný. Hrudní končetiny jsou zcela rovné, silné a se silnými kostmi. Pánevní končetiny jsou štíhle osvalené. Ocas je u kořene silný a směrem ke špičce se zužuje. Přesto, že to tak nevypadá, množství tuku po těle rhodéského ridgebacka je mimořádně malé jako u typických chrtů.

Podle standardu uznaným FCI by měla být výška v kohoutku dospělého samce rhodéského ridgebacka 63 cm až 69 cm, samice potom 61 cm až 66 cm. Váha u samců by měla být 36,5 kg a u samic 32 kg.

Běžně se tomuto plemeni též nazývá „lví pes“, avšak lvy lovili jen málokdy. Většinou rhodéští ridgebackové lvy pouze naháněli, díky své rychlosti, vytrvalosti a obratnosti pohybu, a udržovali je na místě, dokud k nim nedorazil lovec, který poté lva zabil.

Ridgebackové ve skutečnosti lovili jenom někdy. Často byli používání k pasení dobytka a odhánění predátorů.

3.2.3 Povaha plemene

Rhodéský ridgeback je inteligentní, hrdý, laskavý a oddaný společník se silnou vůlí a smečkovým instinktem, ale protože dnes nemá možnost žít ve smečkách, jeho „smečkou“ se stala lidská rodina. Toto plemeno potřebuje vůdce smečky, tedy rodiny, když bude mít vůdce, nebudou s ním zásadní výchovné problémy. Stát se vůdcem jeho rodiny, není žádný problém, je potřeba se k němu chovat spravedlivě. Nesnáší bití, a když je nespravedlivě potrestán, tak je schopný to člověku nikdy nezapomenout díky své dobré paměti. Samozřejmostí je schopnost naučit se dorozumívat se psem a chápat jeho signály. Je-li jeho pozornost vzbuzena, poslouchá klidně, tiché povely a reaguje na lidské chování a značně reaguje na tón hlasu, který je nejužitečnějším nástrojem.

Hodně záleží na tom, jak dobře je vycvičený a vychovaný. K dětem ve své rodině je tolerantní a trpělivý, nechá si od nich líbit téměř všechno, ale v případě, že jsou moc hrubé, dokáže je sám patřičně odehnat. Avšak pozor, v přítomnosti cizích dětí, ochraňuje pouze ty „své“ děti, k ostatním se chová jako k cizím. Je tedy ochranný a to hlavně vůči své rodině. Což naznačuje jeho zdrženlivou povahu vůči cizím lidem, ale bez příznaků agresivity nebo strachu (Carlson, 1999).

Poté, co se tento pes začlení do rodiny, už nemá chuť být sám, chce být stále v přítomnosti své rodiny.

Další výraznou vlastností rhodéského ridgebacka je jeho silná touha po pohodlí (Chamberlainová, 2002). V případě, že se usadí na pohovce či v posteli, velice nerad ji opouští. Pokud nechce místo opustit ani na povely, myslí si, že je značně v právu.

Už od malého štěněte je potřeba dbát na důsledný, ale citlivý výcvik. Seznamovat ho s jinými plemeny psů stejně jako i s jinými druhy zvířat, jedná se o velmi družné plemeno. Je potřeba neustále rozvíjet jeho sociální dovednosti a v žádném případě mu netolerovat jakoukoli míru agresivity, jelikož je příliš rychlý a silný.

Rhodéský ridgeback má rád zábavu, přesto, že nepotřebuje velkou fyzickou námahu, rád se účastní různých aktivit a vyžaduje neustálou mentální stimulaci. Jedná se o aktivní, velmi pohyblivé a energické plemeno, které nepohrdne procházkou po lese nebo honičkou s jinými psy.

3.2.4 Zdravotní stav plemene

Rhodéští ridgebackové jsou všeobecně po celý svůj život zdraví psi. Mnoho psů se dožije dvanácti nebo třinácti let, někteří dokonce i patnácti. V osmi letech se začnou objevovat první příznaky stárnutí, ale při udržování pohybu zůstávají aktivní až do deseti či jedenácti let svého života, pouze se pomalu přizpůsobují věku.

Pro psa je samozřejmě důležité správné očkování, každoroční lékařská prohlídka, správná strava a pravidelný pohyb. Je potřeba dávat pozor na to, co sežerou, protože bohužel sežerou vše, co uvidí bez výjimky například mýdla. Díky tomu je také mnoho ridgebacků obézních. Stačí jim pouze malé dávky potravy, přesto že jsou tak aktivní. V případě štěněte by potrava neměla obsahovat více než 22 až 25 % bílkovin, jinak může poškodit jeho růst. V opačném případě to může způsobit zánětlivé onemocnění kostí neboli ostitis nebo růstové bolesti. Také není vhodné podávat štěněti více vápníku než je potřeba. Jednoduše řečeno nadbytek čehokoli je nezdravý a to třeba i pohybu. Čím pomaleji štěně poroste, tím bude poté zdravější jako dospělý (Chamberlainová, 2002).

Zánětlivé onemocnění kostí se často objevuje, když se začnou tvořit hormony, u psů tedy kolem desátého měsíce a u fen kolem čtrnáctého měsíce. Příznakem je náhlé nevysvětlitelné kulhání, každý den jakoby na jinou nohu. Obvyklou léčbou je aspirin, odpočinek a omezený pohyb. Toto onemocnění je považováno za benigní, protože se samo vyléčí. Je zbytečné dělat u veterináře rentgenové snímky, protože většinou nic neukáží, nebo podávat psovi léky proti bolesti, jelikož by se pak mohl lehce přetáhnout. Přesto to veterináři doporučují. Stejně náhle jako se onemocnění objevilo, zase zmizí. Častěji se vyskytuje u dospívajících psů, u fen jen vzácně (Chamberlainová, 2002).

U rhodéského ridgebacka se vyskytuje dědičné onemocnění zvané dermoid (dermoid sinus). Ridgeback se s ním již narodí, případně se dermoidní cysta vyskytne na těle psa do několika měsíců po narození. Jedná se o bolestivou cystu pod kůží, tedy vchlípeninu kůže dovnitř tkáně, která se vyskytuje v okolí ridge, je tedy pravděpodobné, že s ním nějak souvisí. Cysta je různě hluboká, může zasahovat jenom do podkoží nebo třeba až do páteřního kanálu, kde je uložena mícha. Hluboké cysty mohou mít negativní dopad na zdravotní stav jedince, mohou se jimi zanést i infekce způsobující zánětlivé onemocnění. Cystu lze nahmatat případně vidět vchlípeninu vyholením srsti na určitém místě. Pravděpodobně cysty, podobně jako ridge, vznikají jakousi vývojovou anomálií, poruchou, díky které se tkáň kožní neoddělí úplně a beze zbytku od tkáně tvořící páteř. V roce 1932 popsal tuto vývojovou poruchu

u rhodéského ridgebacka jako první T. Hare. T. Hare vyslovil názor, že se jedná o dědičnou poruchu, který podložil faktem, že pes s dermoidem po křížení se zdravou fenou zplodil potomky stejně postižené, jako byl on sám. Psi s dermoidem na těle jsou vyřazeni z chovu. Postižená štěňata se hned po narození utrácejí (<http://www.ckrr.cz>).

Dalším běžným dědičným onemocněním vyskytujícím se u rhodéských ridgebacků je dysplazie kyčelního kloubu. Znamená to, že pánevní končetina psa má nesprávně utvářený kyčelní kloub. Hlavice stehenního kloubu se neustálým používáním více a více uvolňuje z jamky pánve, opotřebovává se, způsobuje artritické změny v kloubu a bolest. Avšak u tohoto plemene to není tak vážný problém jako u jiných plemen. U štěňat je vhodné udržovat odpovídající váhu vůči jejich velikosti, aby nedocházelo k přílišnému zatížení rostoucích kloubů a tak se předešlo možným problémům v pozdějším věku. Též není vhodný kluzký povrch, který neumožňuje sevření prstů na tlapě psa a způsobuje časté pády, které mohou poškodit kyčelní kloub a způsobit tak možné problémy v pozdějším životě. Dysplazie kyčelního kloubu je považována za dědičné onemocnění. U psa ji lze přesně rozpoznat rentgenovým vyšetřením až ve dvou letech života. Do té doby lze pozorovat pouze příznaky nemoci. Nejčastější léčbou je operace, během které dojde k obnovení porušené pánevní kosti a k výměně hlavice stehenní kosti za náhradní hlavici, jež je umístěna zpět do jamky pánve. Jedná se o úspěšnou léčbu (Chamberlainová, 2002).

Novějším problémem je dysplazie lokte způsobená stále větším zdomácňováním zvířat (Chamberlainová, 2002). Naopak od dysplazie kyčelního kloubu je rozpoznatelná již v raném věku. Podle Dostála (2007) již ve stáří čtyř až šesti měsíců. Dysplazií lokte může být postižen jeden či oba klouby u obou pohlaví. Častější výskyt této nemoci je u některých plemen uváděn u psů než u fen.

Stále častějším vážným onemocněním u rhodéských ridgebacků se stává hypotyreóza štítné žlázy, ve které značnou roli hraje genetika. Proto je dobré si před koupí štěněte prozkoumat jeho původ. Toto onemocnění je možné úspěšně léčit syntetickými hormony. Psi s hypotyreózou štítné žlázy by měli být vždy vykastrováni (Chamberlainová, 2002).

Vážným onemocnění jsou šelesty na srdci tedy kornatění kanálek. Ukazuje to na to, že po porodu nedošlo k úplnému propojení pravé a levé poloviny srdce. Někdy se může vyskytovat pouze lehký šelest v mládí psů. I zde je třeba se zajímat o genetické informace (Chamberlainová, 2002).

Co se týká zažívacích problémů u ridgebacků, je třeba zmínit dva případy. Prvním je pankreatitida tedy zánět slinivky břišní. V brzkém zjištění této nemoci je možné její vyléčení syntetickými hormony. Druhým je megasofagus nebo echolazie. Štěněti se velice špatně polyká a nestrávená potrava je často vyzvrácena. K přesnému určení diagnostiky je potřeba rentgenové vyšetření (Chamberlainová, 2002).

Mezi další, avšak již vzácně se vyskytující nemoci u tohoto plemene, patří atrofie sítnice u mladistvých, nemoci autoimunity a degenerativní myelopatie, kterou se budu více zabývat dále v této práci.

3.3 Degenerativní myelopatie

3.3.1 Definice

Degenerativní myelopatie (dále DM) u psů je geneticky podmíněné progresivní neurodegenerativní onemocnění míchy objevující se u několika psích plemen. Dochází při něm k ubývání ochranného myelinového pláště míchy (bílé míšní hmoty), která chrání míšní neurony (šedou míšní hmotu), především v oblasti hrudní páteře. Dochází k narušování systému drah neurologických vzruchů, které pak vede k poruchám pohyblivosti.

Tato nemoc byla rozeznána před více než 35 lety. Když u DM byla vyzorována hyporeflexie pánevních končetin a účast nervových kořenů, byla nemoc označena jako chronická degenerativní radikulomyelopatie. Původně se myslelo, že je specifická pro německého ovčáka a byla také nazývána myelopatie německých ovčáků. Od doby raných pozorování byla DM diagnostikována u několika dalších plemen včetně welsh corgi pembroke, boxer, rhodéský ridgeback nebo chesapeake bay retriever (Awano et al., 2009).

Příčinou onemocnění DM jsou mutace v exonových částech genu *SOD1*, který kóduje enzym superoxid dismutázu 1. Superoxid dismutázy patří mezi významné enzymy, které se vyskytují u všech aerobních organismů. Jejich funkce spočívá v tom, že na základě antioxidantní aktivity fungují jako účinný obranný mechanismus zejména proti volným radikálům kyslíku (Zelko et al., 2002).

SOD1 byla v historii izolována například z lidských erytrocytů. Z biochemického hlediska bylo zjištěno, že tento enzym obsahuje velké množství mědi. Dále byl tento enzym

izolován i z mozkových tkání. V minulosti u těchto proteinů nebyla předpokládána žádná enzymatická aktivita. Teprve McCord a Fridowich (1969) prokázali, že tento protein vykazuje enzymatickou aktivitu, která katalyzuje aktivitu volných kyslíkových radikálů.

Green et al. (2002) dokázali, že enzym *SOD1* je schopen katalyzovat změnu toxických superoxidových radikálů na netoxické produkty, kterými jsou vodík, peroxidy a kyslík. Pro správnou funkci tohoto enzymu je zapotřebí měď (Lewis, 2001).

3.3.2 Klinické příznaky degenerativní myelopatie

Příznaky onemocnění u psů se obvykle objevují kolem osmého roku života nebo v pozdějším věku. U DM nezáleží na pohlaví jedince (Awano et al., 2009). Vzorec klinického postupu psí DM je poměrně stejný mezi všemi plemeny, které postižuje (Shelton et al., 2012).

Počátečním klinickým příznakem je degenerace horních motorických nervů (UMN), která způsobuje obecnou proprioceptivní ataxii a křečovitou paralýzu v pánevních končetinách (Coates et al., 2009). Při projevu DM je pozorován charakteristický styl chůze, který se projevuje ztrátou koordinace a rovnováhy nejprve zadních a později i předních končetin a nakonec dochází k celkovému ochrnutí (Shelton et al., 2012).

Nemoc může trvat až 3 roky, nicméně majitelé psů často volí eutanázii již během prvního roku od stanovení diagnózy DM, když už psi nemohou déle unést svou zadní část těla (Awano et al., 2009). V případě, že se s eutanázií vyčkává, budou klinické projevy výraznější a postihnou i dolní motorické nervy (Shelton et al., 2012). Mezi klinické příznaky nemoci dolních motorických nervů patří hyporeflexie, postupná slabost, motorická axonopatie, demyelinizace periferního nervstva, denervativní atrofie, rozšířené bolestivé svalové atrofie, včetně postupně rostoucí tetraparalýzy (Awano et al., 2009).

Shelton et al. (2012) ve svém výzkumu uvádí, že pomocí patologických a morfometrických studií bylo prokázáno, že DM postižení welsh corgi pembroke a boxeři si rozvinou patologii periferních nervů spolu s postupem nemoci. Tento názor byl podpořen zhoršením dolních motorických nervů (LMN) doprovázející rozvoj nemoci, limitovaným elektrodiagnostickým testováním, patologií a morfometrií, jež charakterizuje poškození periferních nervů. Jejich nálezy jsou v souladu s mechanismy degenerace motorických nervů u amyotrofické laterální sklerózy (dále ALS), které primárně zahrnují defekty v axonální struktuře a funkčnosti. Na základě těchto studií by měla být předepsána u psí DM analýza

celého spektra patologických změn v periferním nervovém systému zahrnující smyslové nervy, nemyelinizovaná epidermální nervová vlákna, neuromuskulární spojení a nervové kořeny ke kompletnějšímu zjištění vzorce degenerace periferního nervstva (Shelton et al., 2012).

3.3.3 Diagnostika degenerativní myelopatie

Nepřímá diagnóza DM se obvykle stanovuje vyloučením ostatních onemocnění, které mají podobné příznaky jako je například výhřez plotýnky, artróza nebo nádor. Ve srovnání s uvedenými diagnózami není DM nikdy bolestivá (Coates et al., 2009).

Vzhledem k tomu, že existuje velké množství míšních nemocí, které také postihují horní motorické nervy a obecné propioceptivní cesty, může být definitivní diagnóza DM potvrzena až posmrtně histopatologickým pozorováním axonální a myelinové degenerace, která se může vyskytovat na všech úrovních míchy a ve všech míšních výběžcích, ale nejvíce trpí dorzální část laterálních funikulů za středem kaudální hrudní oblasti (Awano et al., 2009).

Jak uvádí Wininger et al. (2011) ve svém článku, DM byla také diagnostikována u plemene bernský salašnický pes. Vykastovaná osmiletá fena bernského salašnického psa byla v Bush Veterinary Neurology Service (BVNS) kvůli paralýze. Fena byla v BVNS už o 13 měsíců dříve kvůli vyhodnocení postupu slabosti pánevních končetin. V té době fena vykazovala cupitání zadních končetin, střední postojové reflexové nedostatky a laxnost v pravém kyčelním kloubu. Obecná asymetrická propioceptivní ataxie a křečovitá paralýza byly přítomné při neurologickém vyšetření. Postojové reakce byly zpožděné v obou pánevních končetinách a segmentové reflexy byly v normálu. DNA test pro *SOD1* 118G > A mutaci, běžně spojován se psí DM, byl normální (homozygot pro G alelu). Fyzioterapie byla zahájena.

Po 16 měsících od původní prezentace příznaky paraplegie se zachováním citlivosti na bolest postoupily. Snížení případně ztráta reflexů byly přítomny u obou pánevních končetin a naznačovaly neurodegeneraci, která postoupila až k dolním motorickým nervům spojeným se stehenním a sedacím nervem (Wininger et al., 2011).

Fena byla utracena 21 měsíců od první prezentace, protože nemoc postoupila k močové a fekální inkontinenci. Histopatologické hodnocení míchy naložené ve formalínu bylo provedeno ve Veterinární medicínské diagnostické laboratoři Univerzity Missouri. V postižených tkáních byly v zadních částech bočních funikulů přilehlých k dorsálním

kořenům zjištěny bilaterální oblasti sklerózy téměř zbavené myelinu se sníženou axonální hustotou. Ve všech traktech bílé hmoty byla přítomna oteklá axonální pouzdra. GFAP značení bylo více homogenní a intenzivnější v oblastech axonálního a myelinového úbytku bez zřejmého zvýšení v astrocytických jádrech. Přidružené míšní nervy vypadaly normálně. Ačkoli distribuce axonálního opadávání a gliózy byla více difundovaná a méně koncentrovaná v dorsálních funikulech než u typických DM *SOD1* 118A homozygotních psů, celkový vzorec histologických lézí včetně distribuce úbytku axonů a demyelinizování v míše silně podporoval diagnózu DM (Wininger et al., 2011).

Wininger et al. (2011) tím popsali DM u bernského salašnického psa, která je typická jako u jiných plemen psů kromě pomalejšího postupu nemoci než je průměr, a výsledky testů DNA indikují homozygoty pro alelu G v *SOD1* 118. Tento náález slouží k připomenutí, že přímé DNA testy indikují přítomnost nebo nepřítomnost alel způsobujících nemoc, ale nemohou být užity pro vyloučení diagnózy, protože další sekvenční varianty ve stejném genu nebo v jiném genu mohou produkovat stejné nebo podobné fenotypy nemoci.

3.3.4 Léčba degenerativní myelopatie

Onemocnění DM je bohužel neléčitelné a vždy končí smrtí. Jedinci s DM lze život pouze prodloužit a to správnou výživou a zdravým pohybem.

DM u psů má mnohé podobnosti s formou lidské ALS projevující se na horních motorických nervech, která vyplývá z mutací v genu superoxide dismutase (*SOD1*). A proto byla psí DM navržena jako potencionální zvířecí model nemoci pro lidskou ALS (Shelton et al., 2012).

3.3.5 *SOD1*

Jako genetický rizikový faktor pro DM u několika psích plemen byla před časem, americko-švédským výzkumným týmem, identifikována mutace genu *SOD1*. O genu *SOD1* se ví, že každý jedinec má ve svém genotypu dvě kopie tohoto genu a DM se u postižených touto nemocí projeví pouze v případě, že jedinec má obě dvě kopie tohoto genu poškozené. Z čehož můžeme usoudit, že se jedná o recesivní onemocnění. Pokud má jedinec pouze jednu poškozenou kopii genu *SOD1* a jednu kopii genu v pořádku nebo má obě kopie v pořádku, je velká pravděpodobnost, že ke vzniku onemocnění DM nikdy nedojde (Green et al., 2002).

První vědecké práce, které se zabývají studiem genetické příčiny onemocnění DM u psů, pocházejí z roku 2002, kdy Green et al. (2002) potvrdili obecně platnou teorii, že stejně jako u člověka, tak i u psů je DM způsobená mutacemi genu *SOD1*. Jedná se o mutaci v exonové části tohoto genu.

Green et al. (2002) ve svých experimentech provedli nejen sekvenční charakteristiku genu *SOD1*, ale rovněž lokalizovali tento gen na 31. chromozomu psa. Tito autoři prováděli veterinární, biochemické, histologické a genetické analýzy u psů s typickými příznaky DM. Genetické analýzy byly založeny na izolaci mRNA, která je následně překládána do proteinového produktu – enzymu *SOD1*. Molekuly mRNA byly pomocí reverzní transkriptázy přepsány do molekul cDNA, které byly následně sekvenovány. Získané sekvence autoři porovnali s publikovanými sekvencemi genu *SOD1* u myši a u člověka a zjistili významné sekvenční shody.

Green et al. (2002) současně identifikovali kauzální mutaci, která je způsobena záměnou G/A ve 2. exonu genu *SOD1*. Z práce těchto autorů vyplývá jeden důležitý poznatek, na základě porovnání sekvencí cDNA genu *SOD1* a genomické sekvence psa identifikovali v genomické DNA exony 2, 3, 4 a 5 a současně introny, které tyto exony oddělovaly. Exon 1, který byl identifikován v cDNA, však nebyl lokalizován v genomické DNA psa.

Sekvenci genu *SOD1* uvádí i dvě nejdůležitější mezinárodní nukleotidové databáze – Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) a NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Na obrázku 1 je znázorněna stručná charakteristika genu *SOD1* získaná z mezinárodní databáze NCBI. Z tohoto obrázku vyplývá, že v sekvencích jsou vyznačeny pouze 4 exony v genu *SOD1*, na rozdíl od 5 exonů, které identifikovali Green et al. (2002). Na obrázku 2 je uvedena charakteristika genu *SOD1* z databáze Ensembl. Z tohoto obrázku vyplývá, že v sekvenci genu je vyznačeno skutečně 5 exonů. Z porovnání sekvencí těchto exonů, se sekvencemi které publikovali Green et al. (2002) vyplývá, že sekvence exonu 1 nejsou shodné. Tento rozdíl lze vysvětlit zřejmě tím, že databáze Ensembl identifikuje exony genů na základě automatických programů, které neberou v potaz již publikované výsledky.

Obrázek 1: Charakteristika genu *SOD1* v databázi NCBI

Location: chromosome: 31
Sequence: Chromosome: 31; NC_006613.3 (26540291..26544212)

See SOD1 in [MapViewer](#)



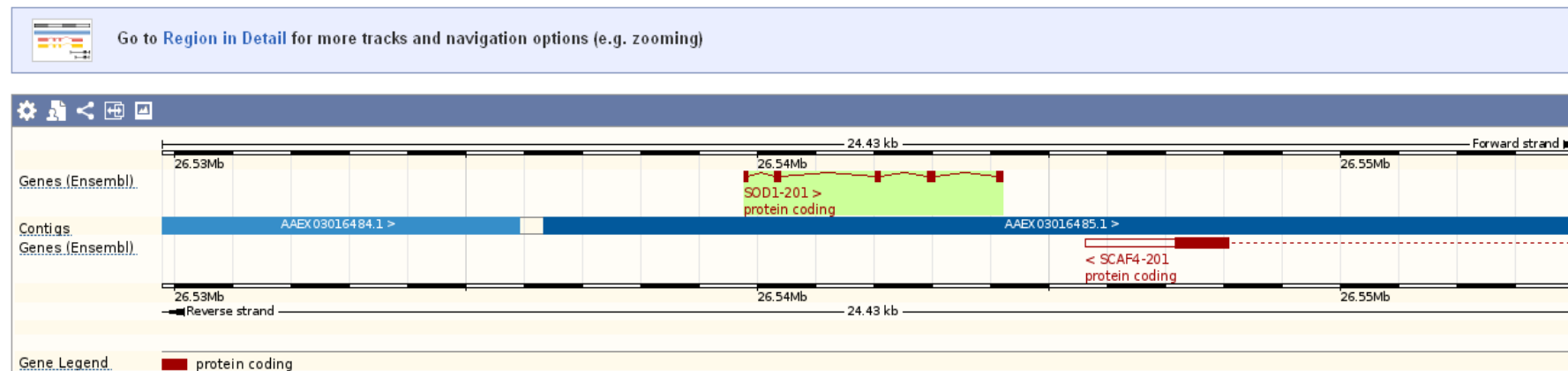
Obrázek 2: Charakteristika genu *SOD1* v databázi Ensembl

Gene: SOD1 ENSCAF00000008859

Description superoxide dismutase 1, soluble [Source:HGNC Symbol;Acc:11179]
Location [Chromosome 31: 26,539,773-26,544,206](#) forward strand.
INSDC coordinates chromosome:CanFam3.1:CM000031.3:26539773:26544206:1
Transcripts This gene has 1 transcript (splice variant) [Show transcript table](#)

Summary ⓘ

Name SOD1 (Projected HGNC Symbol)
Synonyms ALS, ALS1, IPOA [To view all Ensembl genes linked to the name [click here](#).]
Ensembl version ENSCAF00000008859.3
Gene type Known by_projection protein_coding
Prediction Method Annotation produced by the Ensembl [genebuild](#).



Genotypy genu *SOD1* podle OFA (upraveno podle <http://www.offa.org>)

Genotyp Normal/Normal N/N (také G/G). Jedná se o dominantního homozygota, který má obě kopie genu nezmutované. Tento jedinec je zdravý. S největší pravděpodobností u něj nikdy nepropukne onemocnění DM.

Genotyp Normal/Abnormal N/A (také G/A G/DM). Jedná se o heterozygota, který má jednu kopii mutovaného genu *SOD1*. S největší pravděpodobností u něj též nedojde k propuknutí onemocnění DM, ovšem je přenašečem zmutované kopie genu *SOD1* a tak ji může předat svým potomkům.

Genotyp Abnormal/Abnormal A/A (také DM/DM). Jedná se o recesivního homozygota, který má obě kopie mutovaného genu *SOD1*. Tím pádem se u tohoto jedince může projevit onemocnění DM, ale také nemusí. Tyto zmutované kopie genu přenáší na své potomky, přičemž každý získá alespoň jednu a stane se tak přenašečem tedy heterozygotem.

Genome-wide association (GWA) v rámci výzkumu DM uskutečnila celogenomovou analýzu u plemene welsh corgi pembroke, přičemž 38 psů bylo postižených DM a 17 psů bylo kontrolních, neprojevujících klinické příznaky DM, starších 6 let (průměrný věk 9,4 let), za použití Affymetrix Canine Genome 2.0 Array. Celogenomové mapování ukázalo nejsilnější spojení na chromozomu 31 (CFA31), který obsahuje psí gen *SOD1*, a slabší spojení na dalších 4 chromozomech, což naznačuje modifikace nebo populační strukturu. Během spojení oblasti CFA31 byli všichni postižení psi homozygoti na běžném haplotypu od 28,91 do 29,67 Mb (CanFam 2.0), který obsahuje 3 geny: *SOD1*, *TIAMI* a *SFRS15*. Díky tomu, že mutace na lidském *SOD1* může způsobovat ALS, což je u člověka v dospělosti se projevující smrtelná paralyzující neurodegenerativní nemoc, ve které jsou angažovány horní a dolní motorické neurony, udělala klinická podobnost mezi DM u psů a ALS u lidí z genu *SOD1* nejpravděpodobnějšího kandidáta.

Resekvenací 17 kontrolních případů a 38 případů postižených psů DM se odhalila záměna nukleotidu G a A v exonu 2, která předpovídala mutaci na pozici E40K. Všechny 38 postižených jedinců plemene welsh corgi pembroke bylo homozygotních na velké A alele, zatímco 17 vzorků kontrolní skupiny obsahovalo 10 A/A homozygotů, 6 A/G heterozygotů a 1 G/G homozygota. Pro potvrzení lokalizování DM mutace, bylo důkladně zmapováno SNP napříč oblastí o velikosti 1,9 Mb od 29,04 do 30,97 Mb u 5 plemen

(welsh corgi pembroke, boxer, rhodéský ridgeback, německý ovčák a chesapeake bay retriever), která byla oddělena pro DM. Postižení psi ze všech 5 plemen měli 5-SNP haplotyp (maximum 195 kb), který obsahoval mutaci na pozici E40K. Tento haplotyp byl ovšem také přítomen u psů, kteří neměli onu mutaci. Žádný další SNP nebo haplotyp v této oblasti nebyl sdílen všemi plemeny a souhlasil s recesivní dědičností (Awano et al., 2009). Kauzální mutace genu *SOD1* u plemene wesh corgi pembroke studovali také March et al. (2009).

Významný poměr A/A mutantních homozygotů napříč kontrolní skupinou a přítomnost mutace E40K na dědičných haplotypech v populaci může vysvětlovat relativně slabé celogenomové mapování v této oblasti. Nicméně prezentovaná genetická data významně spojují mutaci na pozici E40K s nemocí DM (Awano et al., 2009).

Pro další celogenomové mapování byli použiti jedinci GWA a dalších 64 welsh corgi pembroke a 418 reprezentantů ze 4 dalších plemen, kteří byli genotypizováni pro *SOD1* s výsledkem 118 G > A polymorfismus. Napříč plemeny bylo 100 vzorků od psů, kterým byla diagnostikována DM, nicméně diagnóza neměla stejná striktní kritéria. Významné propojení mezi DM fenotypem a homozygoty pro alelu A bylo zjištěno, když všech 5 plemen bylo společně analyzováno, a i když každé plemeno bylo analyzováno individuálně. Frekvence alely A v separovaných kontrolních skupinách jiných plemen sestávajících se ze vzorků od psích plemen, u kterých je DM diagnostikována vzácně, byla významně nižší než u postižených plemen (Awano et al., 2009).

3.3.6 Psi s DM jako modely pro ALS

Awano et al. (2009) ve svém článku uvádí, že objev toho, že homozygotnost pro pozici E40K je hlavním genetickým rizikovým faktorem podporujícím DM, může vést k dlouhodobé strategii psí plemenitby pro vyhnutí se budoucím generacím psů s rizikem vývoje DM. Nicméně vysoká frekvence mutací v některých plemenech jako například boxer či welsh corgi pembroke, naznačuje, že striktní vyhnutí se této mutaci velmi sníží efektivní velikost populace těchto plemen. Populaci plemene lze z hlediska výskytu onemocnění DM ovlivnit pomocí selekce s využitím genetických markerů, která vede ke snížení frekvence výskytu letální mutované alely genu *SOD1*. I s DM marker testem mnoho tisíc běžných psů, narozených před dostupností testů, budou stále vykazovat klinické příznaky a může trvat

nejméně dekádu, než cílená plemenitba může podstatně snížit výskyt této pozdně se projevující nemoci.

Mezitím psi postižení DM jsou potenciaálními zvířecími modely pro formu lidské ALS. Tito psi mohou být využiti k vyšetření procesu degenerace motorických nervů u DM a ALS nebo k mapování modifikovaného loku a k identifikaci faktorů prostředí, které zhoršují nebo zlepšují průběh nemoci. Běžně se provádějící eutanázie postižených psů v brzkém vývoji nemoci může poskytnout pitevní materiál ve stádiu nemoci, který je vzácně přístupný u lidských pacientů. Psí model se může ukázat zejména cenný pro vyhodnocení terapeutických intervencí. Šíře potenciaálních terapeutických agens se ukázala být důležitá pro věk propuknutí nemoci nebo rychlosti postupu u *hSOD1m* hlodavčích modelů, nicméně tyto agens se zřídka vyskytují u lidských klinických zkoušek. V porovnání s *hSOD1m* hlodavčími modely jsou psi více podobní lidem, co se týče velikosti, struktury a komplexnosti jejich nervového systému a v délce nemoci. Také nejsou často postihováni vysokou úrovní mutace exprese genu *SOD1*, která se objevuje u mnoha *hSOD1m* hlodavčích modelů, a která může vyvolat patologické procesy odlišné od pacientů s ALS. Z tohoto důvodu výsledky klinických zkoušek prováděných se psi postižených DM lépe předpovídají účinnost terapeutických intervencí pro léčbu ALS (Awano et al., 2009).

3.3.7 Amyotrofická laterální skleróza

ALS odkazuje na skupinu heterogenních nemocí, které se objevují v dospělosti u člověka. Tyto nemoci jsou progresivní neurodegenerativní, ovlivňují jak horní, tak dolní nervový motorický systém (Awano et al., 2009). Postupující degenerace horních motorických nervů způsobuje ztuhlost, zpomalování svalových pohybů, zhoršování mluvení a polykání, svalovou atrofii a bolestivou slabost (Shelton et al., 2012).

Pacienti s ALS mohou být hodnoceni pouze v posledním stádiu nemoci, na rozdíl od psů postižených DM, které je možno studovat v různých fázích nemoci. Lidé s ALS umírají během tří až pěti let od objevení se příznaků nemoci (Shelton et al., 2012), dojdou do stavu kompletní paralýzy a podlehnou selhání dýchacích svalů (Awano et al., 2009). Patologické znaky ALS jsou svalová degenerace (amyotrofie), axonální degenerace a axonální ztráta, rozsáhlá astroglióza (skleróza), intracelulární „protein-agregát“ formaci a smrt buněk horních a dolních motorických nervů v míše, mozgovém kmenu a mozkové kůře. Studie popisují, že patologické změny v periferním nervovém systému u lidského ALS

jsou neobvyklé a omezené na konečnou fázi nemoci, ale připomínají distální axonopatii, také se projevující jako smyslová neuropatie (Shelton et al., 2012).

Genetické podobnosti jsou klíčovým spojením mezi DM a ALS. Přibližně 5 až 10 % případů ALS jsou příbuzní. Ostatní výskyt se zdá být nepříliš častý. Mutace *SOD1* je zodpovědná přibližně za 20 % případů ALS v rodině (Shelton et al., 2012). 1 až 5 % případů jsou sporadické. U pacientů s ALS bylo identifikováno více jak 120 různých *SOD1* mutací. Objasnění mechanismu základní ALS bylo složité kvůli malému množství biologického materiálu od nemocných v raném stádiu nemoci. Výzkumníci ALS se museli spoléhat pouze na transgenní hlodavce s lidským genem *SOD1*, aby tím vyvolali nemoc horních motorických nervů, která se projevuje mnoha příznaky ALS. Myši se *SOD1* se vyvíjeli normálně, což naznačuje, že neurodegenerace, v myších s lidským *SOD1* (*hSOD1m*) a u pacientů s ALS, byla způsobena toxickou mutací. Avšak podstata toho toxinu je nejistá, několik experimentů naznačovalo, že k neurodegeneraci dochází kvůli změně zmutovaného *SOD1*. Dochází ke změně biologické aktivity nebo podpoře tvorby intracelulárních *SOD1* produktů (Awano et al., 2009).

3.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (z anglického Polymerase chain reaction, dále PCR) je metoda v molekulární biologii sloužící ke zmnožení neboli amplifikaci fragmentů nukleových kyselin v cyklické reakci o třech teplotních fázích. Využívá procesu denaturace, hybridizace a syntézy deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Tato metoda byla vyvinuta v laboratořích Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii (Bartůňková et al., 2005).

3.4.1 Princip metody PCR

Jedná se o reakci, která je založena na denuraci neboli rozkladu dvouvláknové DNA při vysoké teplotě a opětovné renaturaci neboli složení DNA po snížení oné teploty a to za zachování pravidla komplementarity bází (Bartůňková et al., 2005).

K metodě PCR jsou zapotřebí primery, zásoba deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP) pro dostatek substrátu pro syntézu nových vláken a termostabilní DNA polymeráza (Griffin and Griffin, 1994, Innis et al., 1990).

Primery jsou syntetické oligonukleotidy DNA, což znamená, že jsou složeny z méně jak 50 nukleotidů, obvykle z 20 až 30 nukleotidů.

Často používanou DNA polymerázou je tzv. *Taq* polymeráza, která je izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech. Její teplota zůstává aktivní i po zahřátí na 95 °C, která je potřeba pro denaturaci.

Při PCR metodě dochází ke třem základním fázím (Glick and Thompson, 1993; Henry, 1997).

První fází je denaturace vyšetřovaného vzorku DNA na dva jednoduché řetězce, při které se teplota pohybuje nad 90 °C, obvykle při 95 °C. Při této teplotě dochází k rozvolňování vodíkových můstků, které spojují purinové a pyrimidinové báze vzájemně komplementárních nukleotidů a tím vzniká jednořetězová DNA (ssDNA) (Pavlík, 1999).

Další fází je annealing neboli nasednutí primerů na komplementární sekvenci matricového řetězce DNA, kterým je ssDNA z první fáze. Při této fázi dochází k ochlazení vzorku na 50 až 60 °C. Aby bylo možné použít primery, je potřeba znát minimálně počáteční a koncovou sekvenci amplifikace. Poté tedy místa vazby primerů vymezují oblast, která bude amplifikována. Hybridizované primery jsou základem pro tvorbu nových DNA vláken. Od jejich 3' konce začíná syntéza nových vláken. Jednotlivé nukleotidy jsou přiřazovány podle komplementarity bází (A-T, C-G) (Pavlík, 1999).

Třetí a poslední fází PCR reakce je elongace neboli prodlužování nukleotidových řetězců působením *Taq* polymerázy při teplotě 72 °C. Na 3' konce navázaných primerů nasedá *Taq* polymeráza, která k oběma primerům připojuje nové nukleotidy podle komplementarity bází, a prodlužuje řetězec směrem od 5' konce ke 3' konci. Po dokončení syntézy nových vláken DNA je směs ve zkumavce opět zahřáta na 95 °C, aby znovu došlo k denaturaci a k syntéze dalších vláken a proces se opakoval.

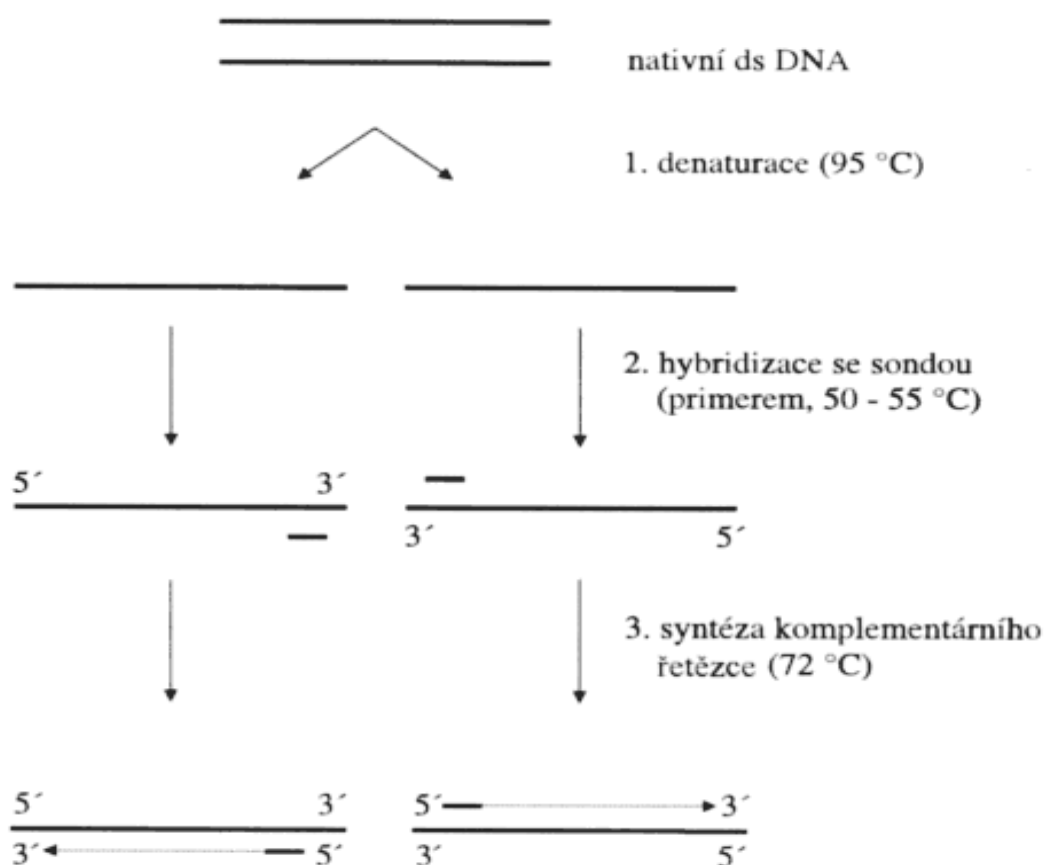
Výsledkem procesu je nově vytvořený úsek dvouřetězové DNA (dsDNA) tzv. amplikon. Vzhledem k tomu, že dochází k amplifikaci dvou matricových vláken DNA, vzniknou během cyklu z jedné výchozí molekuly dsDNA dvě nově vytvořené molekuly dsDNA tedy dva amplikony (Pavlík, 1999).

Po každém cyklu dochází ke zdvojnásobení počtu amplikonů. Z jedné jediné molekuly dsDNA, jež vstupuje na začátku do reakce, vzniká během reakce při 30 cyklech více jak miliarda amplikonů. Avšak skutečný počet amplikonů může být nižší vzhledem k možnosti vzniku chyb. Čím delší je amplifikovaný úsek, tím stoupá riziko vzniku chyb. Ke snížení

tohoto rizika je doporučováno při delších amplifikovaných úsecích zvýšit počet cyklů (Pavlík, 1999).

Obecně lze tedy říci, že po proběhnutí n cyklů se jedna molekula DNA zmnoží na 2^n molekul. Proces PCR je znázorněn níže na obrázku.

Obrázek 3: Schéma reakce PCR (Bartůňková, 2005)



3.4.2 Výhody a nevýhody PCR

Výhodami PCR je vysoká specifita a citlivost, rychlost, bezpečnost, návaznost na ostatní vyšetření, dobrý rozlišovací schopnost, možnost automatizace.

Mezi nevýhody PCR patří délka amplifikovaného úseku, nutnost znát sekvence ohraničující amplifikovaný úsek, nepřesnost replikace, možnost kontaminace cizorodou DNA, obtížnost kvantitativního stanovení.

3.4.3 Využití PCR

PCR metodu lze použít při stanovení diagnózy geneticky podmíněné choroby (například: cystická fibróza – CF, Duchennova svalová dystrofie – DMD), určení pohlaví, diagnostice infekčního onemocnění, monitorování terapie CML (chronická myeloidní leukemie), ve forenzní medicíně k identifikaci osob, v archeologie či klinické genetice.

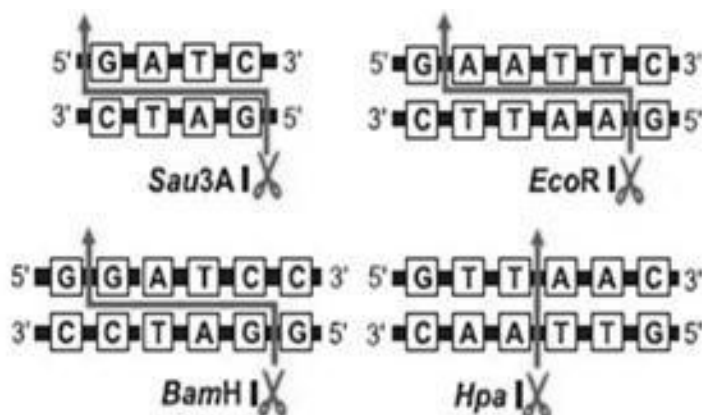
3.5 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)

V molekule DNA je genetická informace uložená ve sledu nukleotidů. K tomu, aby bylo možné se dostat ke genu, je zapotřebí danou DNA šroubovici rozbít na menší fragmenty. Dnes jsou k tomu využívány bakteriální enzymy nazývané restrikční endonukleázy. Tyto enzymy mají jednu speciální vlastnost, štěpí DNA pouze v palindromech, vždy stejných pro každou restrikční endonukleázu, se specifickou krátkou nukleotidovou sekvencí, zpravidla 4 – 8 nukleotidových párů (Alberts et al., 1998).

Technika PCR-RFLP je založena na rozpoznání specifické sekvence amplifikovaného PCR fragmentu pomocí restrikční endonukleázy. Restrikčním štěpením lze identifikovat bodové mutace, které se nacházejí uvnitř amplifikovaného fragmentu DNA. Výsledkem restrikčního štěpení jsou různé velké fragmenty DNA, které jsou separovány na agarózovém gelu. Pomocí ethidiumbromidum je možné vizualizovat DNA. Výhodou této metody je, že určí konkrétní místo mutace.

Obrázek 4: Restrikční štěpení (upraveno podle

<http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/58-restrickni-nukleazy-vyznam-v-genovem.html>)



3.6 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je řazena mezi nejpoužívanější separační techniky, jež slouží k analýze nukleových kyselin a proteinů.

Princip gelové elektroforézy spočívá v pohybu záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě. Díky této metodě lze separovat tedy oddělovat molekuly DNA na základě různé rychlosti pohybu molekul DNA v gelu (Sambrook et al., 1989).

Vhodným nosičem pro elektroforézu je agarózový gel nebo polyakrilamid.

Agarózový gel je vytvořen pomocí určitého množství TBE pufru a určitého množství práškové agarózy a to závisí na tom, kolika procentní agarózový gel má být vytvořen. Po smíchání je tato směs zahřívána v mikrovlnné troubě tak dlouho, dokud nemá požadovanou hustotu, během zahřívání je také ještě promíchávána. Poté je gel nalit do nádoby a přidá se do něj ethidumbromid, který slouží k následné vizualizaci DNA v UV transluminátoru. Je ponechán čas na zatvrdnutí gelu (Sambrook et al., 1989).

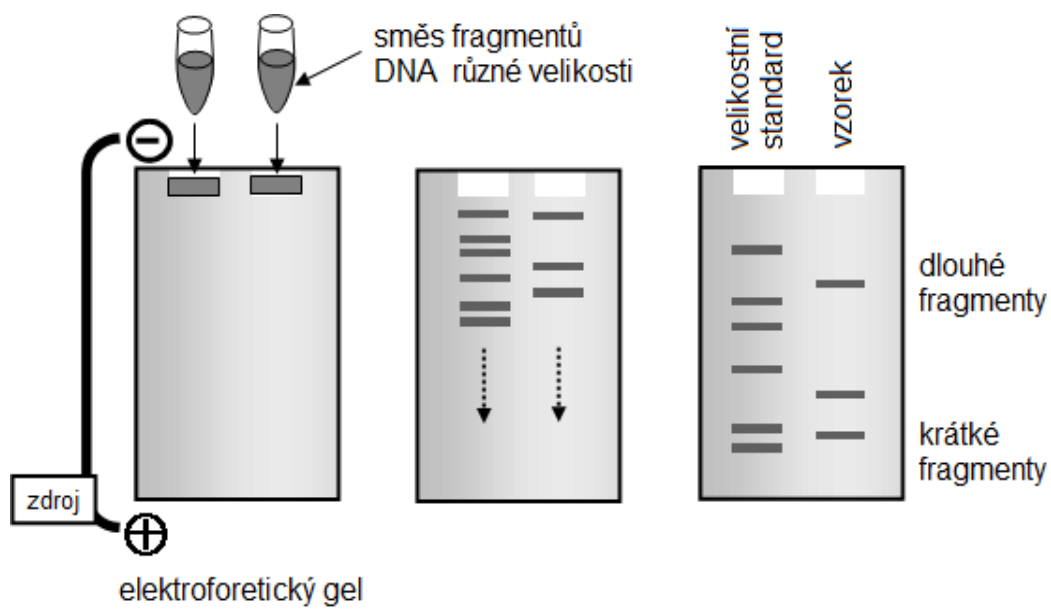
Agarózový gel je poté vložen do elektroforetické vany. Pomocí tzv. hřebíků byly v agarózovém gelu při jeho přípravě vytvořeny jamky, do kterých jsou nanášeny pipetou vzorky DNA. Gel je tvořen složitou sítí polymerních molekul s póry, jimiž se molekuly DNA pohybují různou rychlostí v závislosti na velikosti, tedy malé fragmenty se pohybují rychleji a tak v gelu urazí větší vzdálenost než větší fragmenty DNA. Kontrola vložení PCR produktu do jamky, zatížení a migrace DNA v gelu je zajištěna přidáním tmavě zbarveného tzv. nanášecího neboli vkládacího pufru. Dále se do poslední jamky gelu nanáší tzv. velikostní marker (hmotnostní standard, DNA ladder = žebřík) o definované velikosti jednotlivých fragmentů, aby bylo možno odhadnout velikost sledovaných DNA fragmentů.

Separované fragmenty DNA je potřeba po skončení elektroforézy zviditelnit. Pro zviditelnění separovaných fragmentů DNA se používá značení barvivem, které se dokáže vázat na DNA, například ethidumbromid, a UV záření v přístroji nazývaném UV transluminátor. V UV transluminátoru jsou odečteny výsledky.

Rozdělené molekuly DNA lze také ve funkční formě izolovat z gelu.

Obrázek 5: Gelová elektroforéza (upraveno podle

http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz)



4 Materiál a metody

4.1 Hodnocené genotypy

Do sledované skupiny bylo zařazeno 74 psů plemene rhodéský ridgeback, o kterých byly dále shromažďovány tyto údaje: jméno, pohlaví, věk, místo narození, barva srsti.

V následující tabulce je uveden přehled hodnocených psů.

Tabulka 1: Přehled hodnocených psů – 1. část

Číslo vzorku	Pohlaví	Rok narození	Narozen u nás/ import	Barva srsti
CZU1	fena	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU2	pes	2008	ČR	červeně pšeničná
CZU3	fena	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU4	pes	2004	import	pšeničná
CZU5	pes	2007	import	červeně pšeničná
CZU6	fena	2007	ČR	červeně pšeničná
CZU7	pes	2003	ČR	červeně pšeničná
CZU8	pes	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU9	pes	2005	import	červeně pšeničná
CZU10	pes	2007	ČR	červeně pšeničná
CZU11	pes	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU12	pes	2008	ČR	červeně pšeničná
CZU13	fena	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU14	pes	2010	import	červeně pšeničná
CZU15	pes	2009	ČR	pšeničná
CZU16	pes	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU17	fena	2012	ČR	červeně pšeničná
CZU18	pes	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU19	fena	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU20	fena	2008	import	červeně pšeničná
CZU21	fena	2009	ČR	červeně pšeničná
CZU22	pes	2007	import	červeně pšeničná
CZU23	pes	2010	ČR	pšeničná

Tabulka 1: Přehled hodnocených psů – 2. část

Číslo vzorku	Pohlaví	Rok narození	Narozen u nás/ import	Barva srsti
CZU24	pes	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU25	pes	2010	import	červeně pšeničná
CZU26	fena	2010	ČR	pšeničná
CZU27	fena	2009	ČR	pšeničná
CZU28	pes	2010	ČR	pšeničná
CZU29	fena	2009	ČR	červeně pšeničná
CZU30	pes	2009	ČR	červeně pšeničná
CZU31	fena	2008	ČR	pšeničná
CZU32	fena	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU33	fena	2010	ČR	pšeničná
CZU34	fena	2010	ČR	pšeničná
CZU35	pes	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU36	fena	2009	ČR	pšeničná
CZU37	fena	2012	ČR	červeně pšeničná
CZU38	pes	2009	ČR	červeně pšeničná
CZU39	pes	2008	ČR	červeně pšeničná
CZU40	pes	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU41	fena	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU42	fena	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU43	fena	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU44	fena	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU45	fena	2007	ČR	pšeničná
CZU46	fena	2009	ČR	červeně pšeničná
CZU47	pes	2010	ČR	červeně pšeničná
CZU48	fena	2009	ČR	červeně pšeničná
CZU49	fena	2004	ČR	pšeničná
CZU50	fena	2009	ČR	červeně pšeničná
CZU51	pes	2009	import	pšeničná
CZU52	pes	2004	import	červeně pšeničná
CZU53	pes	2008	ČR	červeně pšeničná
CZU54	fena	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU55	fena	2009	ČR	červeně pšeničná
CZU56	pes	2012	ČR	pšeničná
CZU57	pes	2011	ČR	pšeničná
CZU58	pes	2011	ČR	červeně pšeničná

Tabulka 1: Přehled hodnocených psů – 3. část

Číslo vzorku	Pohlaví	Rok narození	Narozen u nás/ import	Barva srsti
CZU59	pes	2011	ČR	pšeničná
CZU60	fena	2010	ČR	pšeničná
CZU61	fena	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU62	fena	2011	ČR	pšeničná
CZU63	pes	2012	import	červeně pšeničná
CZU64	pes	2012	ČR	červeně pšeničná
CZU65	pes	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU66	pes	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU67	pes	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU68	pes	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU69	fena	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU70	fena	2011	ČR	červeně pšeničná
CZU71	fena	2010	ČR	pšeničná
CZU72	fena	2013	ČR	červeně pšeničná
CZU73	fena	2012	ČR	červeně pšeničná
CZU74	pes	2002	import	červeně pšeničná

Jako referenční genotypy byli použiti tři zástupci plemene československý vlčák, u kterých byly zjištěny různé kombinace alel genu *SOD1*. Jednalo se o jednoho jedince s genotypem N/N, N/DM a DM/DM. U všech jedinců byly provedeny genetické testy v profesních laboratořích poskytujících certifikát o výsledku vyšetření. U psa s genotypem DM/DM byly zjištěny klinické příznaky onemocnění.

4.2 Izolace DNA

4.2.1 Odběr vzorků DNA

DNA vzorky byly odebrány za pomoci sterilního cytologického kartáčku (Lotus Global Co., Ltd.) z epitelálních buněk bukálních sliznic psů, aby byla použita neinvazivní metoda. Psi nesměli být dvě hodiny před odběrem krmeni ani napájeni. Po odebrání vzorků a následném vyschnutí kartáčků v aseptickém prostředí, byl každý kartáček uzavřen samostatně do papírové obálky, která byla označena jménem psa, a uložena do mrazicího boxu s teplotou – 20 °C.

4.2.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena za pomoci kitu NucleoSpin® Tissue XS (Machery-Nagel), který je k těmto účelům vyráběn, a to za dodržení návodu stanoveným výrobcem.

Postup

- 1) vyjmutí kartáčku z papírové obálky a jeho vložení do čisté zkumavky
- 2) rozklad buněk po přidání 180 µl T1 pufru a 25 µl proteinázy
- 3) promíchání vzorku
- 4) vložení vzorku do termoboxu, který je předehřátý na 56 °C, nechat nahřívat 15 min, během té doby vzorek 3x promíchat
- 5) přidání 200 µl B3 pufru a promíchání vzorku 2 x 5 sekund
- 6) vložení vzorku na 10 min do termoboxu, který má teplotu 70 °C, 1x promíchat
- 7) vyndání kartáčku sterilní pinzetou ze zkumavky
- 8) přidání 210 µl 100 % ethanolu a přetáčením zkumavek vysrážit DNA
- 9) přepipetování vzorku po částech do čisté zkumavky s filtrem
- 10) centrifugování vzorku po 1 min při 11 000 otáčkách a následné odlití proteklé frakce
- 11) přidání 500 µl BW pufru a následné centrifugování po 1 min při 11 000 otáčkách a odlití proteklé frakce
- 12) přidání 600 µl B5 pufru a následné centrifugování po 1 min při 11 000 otáčkách a odlití proteklé frakce
- 13) centrifugování filtru ve zkumavce po 1 min při 11 000 otáčkách
- 14) přenesení filtru do čisté finální zkumavky
- 15) přidání 100 µl BE pufru, nechat 1 min odstát a poté centrifugovat po 1 min při 11 000 otáčkách
- 16) vyjmutí filtru, zavření víčka finální zkumavky a uložení do mrazicího boxu

4.2.3 Kvalita a kvantita izolované DNA

Vzorky s izolovanou DNA byly po extrakci hodnoceny z hlediska vysokomolekulárního pomocí gelové elektroforézy, která probíhala při laboratorní teplotě a konstantním napětí 120V po dobu 60 minut v elektroforetické cele SubCell (BioRad). Dále byly vzorky separovány v 1 % agarózovém gelu, v prostředí 1xTBE pufru.

Získané elektroforeogramy mohly být digitalizovány díky systému GelDoc (BioRad) a programu Quantity One (BioRad).

Kvantita a kvalita izolované DNA byla zjištěna metodou UV-spektrometrie za pomoci přístroje NanoPhotometer (IMPLEN). Tento přístroj zároveň u vzorků DNA vyhodnotil poměry absorbcí A260/A280 a A260/A230, které mohou sloužit pro detekci případné kontaminace organickými sloučeninami izolované DNA. U všech extrahovaných vzorků byla genomická DNA naředěna na konstantní koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ x TE pufrém.

4.3 PCR-RFLP marker kauzální mutace genu *SOD1* vedoucí k degenerativní myelopatii u psů

4.3.1 Volba restrikčního enzymu schopného rozlišit alely genu *SOD1*

Při volbě restrikčního enzymu, který bude schopen rozlišit alely genu *SOD1*, byl použit metodický postup, který ve své práci uvádí Dujková (2013).

4.3.2 Použití PRC-RFLP markeru kauzální mutace genu *SOD1*

Pro amplifikaci byly použity primery, které publikovali Awano et al. (2009) – SOD1ORIG F 3'AGTGGGCCTGTTGTGGTATCA5' a SOD1ORIG R 3'CTCCAAACTGATGGACGTGGAAT5'.

Tabulka 2: Složení PCR reakce pro amplifikaci PRC-RFLP marker genu *SOD1*

Složka	Koncentrace
DNA	$20 \text{ ng} \cdot 12,5 \mu\text{l}^{-1}$
Tris-HCl	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
SOD1ORIG F	0,4 μM
SOD1ORIG R	0,4 μM
dNTP	200 μM
BSA	$5 \mu\text{g} \cdot 12,5 \mu\text{l}^{-1}$
Enhancer – TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
<i>Taq</i> polymeráza (Roche)	$0,5 \text{ U} \cdot 12,5 \mu\text{l}^{-1}$
objem	12,5 μl
pH	8,3

Pro amplifikaci byl použit termocykler C100TM Thermal Cycler (BioRad). Fáze amplifikace z hlediska teplotního a časového jsou popsány v další tabulce.

Tabulka 3: Teplotní a časový profil amplifikace PRC-RFLP markeru genu *SOD1*

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Úvodní denaturace	95	180	1
Denaturace	95	30	30
Annealing	60	40	30
Elongace	72	40	30
Závěrečná elongace	72	420	1

V následující tabulce je uvedeno složení reakční směsi pro restriční štěpení.

Tabulka 4: Podmínky restričního štěpení pro detekci polymorfismu genu *SOD1*

Složka	Množství (μl)
PCR produkt	5,15
10x pufr G (Fermentas)	1,20
0,5 mM SAM (Fermentas)	0,24
<i>Eco57I</i> (<i>AcuI</i>) (Fermentas)	0,50
ddH ₂ O	4,91

Restriční štěpení probíhalo po dobu 7 hodin při teplotě 37 °C v termocykleru C100TM Thermal Cycler (BioRad). Vlastní detekce polymorfismu byla poté provedena pomocí agarózové gelové elektroforézy SubCell (BioRad). Dále byly fragmenty separovány v 5 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru po dobu 40 minut, při laboratorní teplotě a konstantním napětí 120V. Následovala vizualizace DNA fragmentů pomocí ethidiumbromidum. Elektroforeogramy byly zaznamenány díky systému GelDoc (BioRad) a programu Quantity One (BioRad).

4.3.3 Použití sekvenčních primerů

Byla použita dvojice sekvenčních primerů, kterou navrhla ve své práci Dujková (2013). Do oblasti před genem *SOD1* byl navržen sekvenační primer SOD1EX2SEKV F (3'TCAAGTCCATGTTTCCTTCCA5'). Do oblasti prvního intronu genu *SOD1* byl navržen primer SOD1EX2SEKV R (3'TTTGGCATGTTGAGGATTTTC5').

4.3.4 Podmínky pro amplifikaci fragmentu genu *SOD1* vymezeného k sekvenaci

V následujících tabulkách jsou uvedeny podmínky pro amplifikační reakci.

Tabulka 5: Složení PCR reakce pro amplifikaci úseku *SOD1* genu určeného k sekvenaci

Složka	Koncentrace
DNA	20 ng . 12,5 μl^{-1}
Tris-HCl	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
SOD1EX2SEKV F	0,4 μM
SOD1EX2SEKV R	0,4 μM
dNTP	200 μM
BSA	5 μg . 12,5 μl^{-1}
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
<i>Taq</i> polymeráza (Roche)	0,5 U . 12,5 μl^{-1}
objem	12,5 μl
pH	8,3

Pro amplifikaci byl použit termocykler C100TM Thermal Cycler (BioRad). Fáze amplifikace z hlediska teplotního a časového jsou popsány v následující tabulce.

Tabulka 6: Teplotní a časový profil amplifikace úseku *SOD1* genu určeného k sekvenaci

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Úvodní denaturace	95	180	1
Denaturace	95	30	35
Annealing	60	40	35
Elongace	72	120	35
Závěrečná elongace	72	420	1

4.4 Sekvenační analýza PCR-RFLP markeru kauzální mutace genu *SOD1*

4.4.1 Gelová purifikace PCR produktů markeru genu *SOD1*

Gelová purifikace byla použita k vyčištění amplikonu od zbytků nukleotidů a od případně vznikajících dimerů primerů.

K tomuto účelu bylo potřeba připravit výše popsanou PCR reakci o celkovém objemu 50 μl . Po dobu 50 minut byly produkty amplifikace separovány při laboratorní teplotě a konstantním napětí 120V v 1 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Dále byl PCR amplikon vyříznut pomocí sterilního skalpelu a přenesen do sterilní polypropylenové zkumavky. Pomocí MiniElute PCR Purification Kit (Qiagene) byla DNA z tohoto fragmentu extrahována. Extrakce byla provedena dle návodu výrobce kitu. Ve finální fázi bylo získáno 100 μl vodného roztoku amplifikovaného fragmentu, který byl kvantifikován za použití UV spektrofotometru, stejnou metodou jako tomu bylo u extrahované genomické DNA. Takto očištěné PCR produkty byly naředěny ddH₂O na stálou koncentraci 5 ng \cdot μl^{-1} .

4.4.2 Příprava vzorků k sekvenaci

Postup:

- 1) vyříznutí DNA fragmentů z agarózního gelu čistým ostrým skalpelem
- 2) vložení vyříznutých DNA fragmentů do zkumavek
- 3) přidání 3 objemů QG pufru na 1 objem gelu
- 4) inkubace vzorků při 50 °C po 10 min., během této doby 2 – 3x vzorek promíchat, zahřívat a promíchávat dokud se fragment DNA v gelu zcela nerozpustí v roztoku
- 5) přidání 1 objemu isopropanolu do zkumavek
- 6) přepipetování obsahu zkumavek maximálně po 750 μl do filtračních zkumavek, centrifugování po 1 min, znovupřepipetování 750 μl roztoku a centrifugování, po každé centrifugaci odlítí proteklé frakce a usušení zkumavky
- 7) přidání 500 μl QG pufru a centrifugování po 1 min, odlítí proteklé frakce a osušení zkumavky
- 8) přidání 750 μl PE pufru a centrifugování po 1 min
- 9) centrifugování filtrů pro jejich vysušení po dobu 1 min při 13 000 otáčkách
- 10) vyjmutí filtrů a jejich vložení do finálních zkumavek

- 11) přidání 20 μl vody (pH 7,8) přímo na filtry (do centra membrány), nechat 1 min odstát a poté centrifugování po 1 min
- 12) vyjmutí filtru z finální zkumavky, ve které zůstává roztok obsahující DNA

Pro kontrolu koncentrace DNA v roztoku využijeme přístroj zvaný Nanophotometr.

4.4.3 Příprava sekvenační reakce

Pro sekvenaci PCR byl použit BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

V následující tabulce je popsáno složení jedné sekvenační reakce.

Tabulka 7: Složení sekvenační reakce pro studium mutací genu *SOD1*

Složka	Objem	Koncentrace
PCR produkt (5 ng . μl^{-1})	4,0 μl	20 ng . 20 μl^{-1}
5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems)	4,0 μl	1x
Primer F resp. R (1 pikomol . μl^{-1})	3,2 μl	3,2 pikomolů . 20 μl^{-1}
Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)	2,0 μl	2 μl . 20 μl^{-1}

4.4.4 Purifikace produktu sekvenační reakce

K produktům sekvenační reakce, které měly objem 20 μl , bylo přidáno 2 μl roztoku glykogenu (koncentrace 20 ng . μl^{-1} , Fermentas), 2 μl 3M octanu sodného a 50 μl 96 % čistého etanolu. Vzniklý roztok byl promíchán ve zkumavce a po dobu 15 minut inkubován při laboratorní teplotě.

Na základě odstředivé síly byly usazené produkty amplifikace odděleny během 30 minut při 13200 otáčkách/min. Poté pomocí sterilní pipety byla tekutina vyskytující se nad sraženinou šetrně odstraněna. Vzniklý sediment, jenž obsahoval fragmenty DNA, se nacházel na dně zkumavky a dále byl propláchnut 250 μl 70 % čistého etanolu. Vzorky byly opět odstředěny podobu 15 minut při 13200 otáčkách/min. Poté byl ještě jednou zopakován proces opláchnutí etanolem.

Po odsátí tekutiny byl vzniklý sediment vysoušen po dobu 45 minut při teplotě 50 °C ve vyhřátém bloku Bio TDB-120 (Biosan). Po úplném vysušení byla sraženina rozpuštěna v 15 μl Hi-DI formamidu. Vzniklé vzorky byly dále denaturovány po dobu 5 minut při teplotě

95 °C v polypropylenových stripech v termocykleru C1000™ Thermal Cycler (BioRad). Vzorky po denuraci byly ochlazeny na teplotu 0 °C a připraveny pro vyhodnocení za použití kapilární elektroforézy.

4.4.5 Rozpoznání sekvencí pomocí kapilární elektroforézy

Pro sekvenaci byl použit genetický analyzátor ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

V následující tabulce jsou uvedeny podmínky pro separaci na kapilární elektroforéze.

Tabulka 8: Podmínky kapilární elektroforézy při sekvenaci markeru genu *SOD1*

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

Sekvence markeru genu *SOD1* byla automaticky zpracována za použití programu DNA Sequencing Analysis (Applied Biosystems).

4.4.6 Bioinformatické vyhodnocení polymorfismů sekvenovaného markeru genu *SOD1*

Pro porovnání sekvencí byl použit program BioEdit Version 7.0.9.0. (Hall, 1999). Stejný program byl použit pro predikci aminokyselinové sekvence v části proteinu kódovaného exonem 2.

4.4.7 Genealogická studie – sestavení rodokmenů

Pro konstrukci rodokmenů byl použit program MyHeritage Family Tree Builder (MyHeritage Ltd., Version 7.0.0.). U všech jedinců s heterozygotní kombinací alel N/DM byl sestaven rodokmen na základě jejich průkazu původu. Pro grafické vyjádření rodokmenů byla použita metoda rodokmenů předků – vodorovný vývod. Pro grafické vyjádření genealogického propojení hodnocených rodin rhodéských ridgebacků byla použita metoda blízkých rodin. Informace o dalších generacích společných předků hodnocených zvířat, které již nebyly uvedeny v průkazech původu, byly získány na základě dat mezinárodní databáze rodokmenů rhodéských ridgebacků, která je volně k dispozici na adrese <http://www.rhodesian-ridgeback-pedigree.org/>.

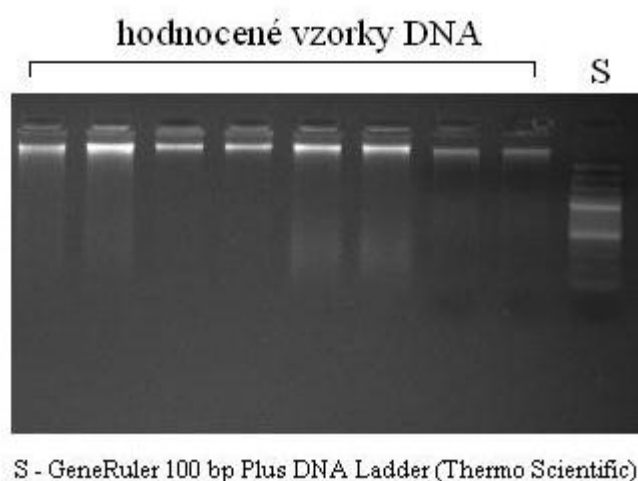
5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace genomické DNA a hodnocení její kvantity a kvality

5.1.1 Testování vysokomolekularity DNA

U všech testovaných vzorků izolované DNA byla pomocí agarózové gelové elektroforézy potvrzena vysokomolekulární DNA. Na obrázku 6 je uveden elektroforeogram vysokomolekulární genomické DNA.

Obrázek 6: Hodnocení vysokomolekularity izolované DNA



Z obrázku je patrné, že u všech vzorků představovala izolovaná DNA jasně ohraničený fragment blízko startovací jamky. Z obrázku jsou rovněž patrné rozdíly v množství DNA. Tyto rozdíly byly způsobeny tím, že jednotlivé vzorky odebírali různí chovatelé, kteří odebírali různě intenzivně stěry bukálních buněk. Dalšími molekulárními analýzami, kterými jsem se zabývala v bakalářské práci, bylo potvrzeno, že takto izolovaná DNA je bez problému použitelná pro detekci kauzální mutace genu *SOD1*.

5.1.2 Hodnocení kvantity a kvality izolované DNA

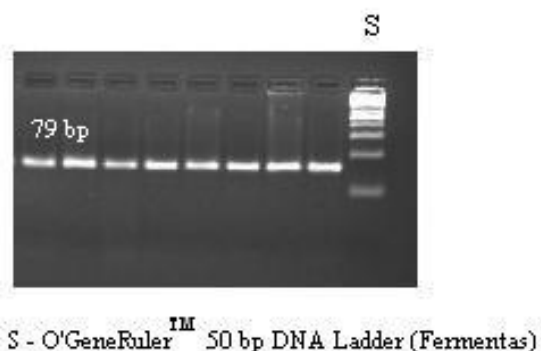
Cílem bakalářské práce nebyla optimalizace metod izolace DNA. Vycházela jsem z předpokladu, že použitý izolační kit je přímo aplikovatelný na izolaci DNA z bukálních buněk. Přesto bylo nutné u všech vzorků provést kvantifikaci z důvodu naředění všech vzorků na jednotnou koncentraci ($5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Bylo zjištěno, že průměrné množství DNA izolované z jednoho cytologického kartáčku bylo 10 200 ng. Variabilita výtěžnosti DNA vyjádřená variačním koeficientem byla rovna 9,5 %. Spektrūmfotometrická metoda byla použita rovněž pro hodnocení čistoty DNA na základě parametrů A260/A280, který byl v průměru roven 1,95 a parametru A260/A230, který byl v průměru roven 2,03. Hodnoty obou dvou parametrů svědčí o čisté genomické DNA.

5.2 Detekce mutace genu *SOD1* metodou PCR-RFLP

5.2.1 Amplifikace monomorfního PCR produktu a ověření jeho velikosti elektroforézou

Získané PCR produkty byly testovány agarózovou gelovou elektroforézou s cílem ověřit, zda dvojice primerů amplifikuje specifický produkt o velikosti 79 bp. Tímto testem bylo u všech vzorků prokázáno, že primery specificky ohraničují hodnocenou sekvenci v genomu psa. U všech vzorků byl amplifikován vždy jeden fragment a jeho velikost odhadnuta na základě porovnání s velikostním standardem odpovídala předpokládané velikosti 79 bp. Výsledek tohoto testu je patrný z následujícího obrázku.

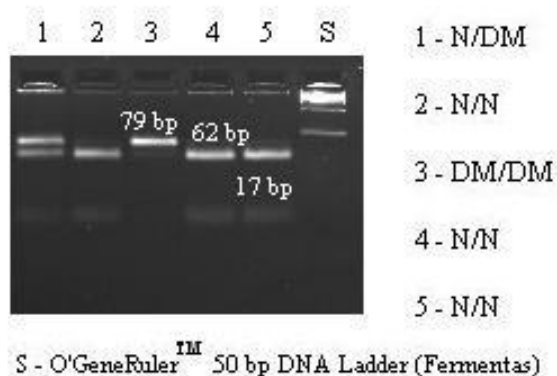
Obrázek 7: PCR marker genu *SOD1* před restričním štěpením



5.2.2 Hodnocení polymorfismů restrikčním štěpením

Elektroforetická separace v 5 % agarózovém gelu byla použita pro ověření specifčnosti restrikčního štěpení PCR produktu a současně byla přímo použita i jako diagnostická metoda pro detekci kauzální mutace genu *SOD1*. Výsledky restrikčního štěpení u vybraných jedinců jsou uvedeny na následujícím obrázku.

Obrázek 8: PCR marker genu *SOD1* po restrikčním štěpení



Z výše uvedeného obrázku je patrné, že u jedinců, kteří nemají mutaci genu *SOD1*, je PCR produkt o velikosti 79 bp kompletně rozštěpen na dva fragmenty o velikosti 62 bp a 17 bp. Jedinec číslo 3, který je na obrázku 6 označen jako DM/DM, je představitel československého vlčáka, který byl použit jako referenční genotyp s diagnostikovanými klinickými příznaky onemocnění degenerativní myelopatie (dále DM). Jedinec číslo 1, který je označen genotypem N/DM, představuje heterozygota neboli přenašeče mutované alely genu *SOD1*. U tohoto genotypu je na elektroforeogramu patrný fragment o velikosti 79 bp, který odpovídá nemutované alele. Druhá mutovaná alela byla rozštěpena na fragmenty o velikosti 62 bp a 17 bp.

5.2.3 Výsledky PCR-RFLP testu u modelové populace plemene rhodéský ridgeback

Metodický postup, jehož obecné výsledky byly patrné v předcházejících kapitolách, byl aplikován na 74 zástupců plemene rhodéský ridgeback chovaných v České republice. Bližší charakteristika hodnocených zvířat je uvedena v tabulce 1. V následující tabulce jsou uvedeny alelické kombinace genu *SOD1*.

Tabulka 9: Přehled výsledků hodnocených psů

Číslo vzorku	Výsledky	Číslo vzorku	Výsledky	Číslo vzorku	Výsledky
CZU1	N/DM	CZU26	N/N	CZU51	N/DM
CZU2	N/N	CZU27	N/N	CZU52	N/N
CZU3	N/DM	CZU28	N/N	CZU53	N/N
CZU4	N/N	CZU29	N/N	CZU54	N/DM
CZU5	N/N	CZU30	N/N	CZU55	N/N
CZU6	N/N	CZU31	N/N	CZU56	N/DM
CZU7	N/N	CZU32	N/N	CZU57	N/N
CZU8	N/N	CZU33	N/N	CZU58	N/N
CZU9	N/N	CZU34	N/N	CZU59	N/N
CZU10	N/N	CZU35	N/N	CZU60	N/N
CZU11	N/N	CZU36	N/N	CZU61	N/DM
CZU12	N/N	CZU37	N/N	CZU62	N/N
CZU13	N/N	CZU38	N/N	CZU63	N/N
CZU14	N/DM	CZU39	N/N	CZU64	N/N
CZU15	N/N	CZU40	N/N	CZU65	N/N
CZU16	N/DM	CZU41	N/N	CZU66	N/N
CZU17	N/N	CZU42	N/N	CZU67	N/N
CZU18	N/DM	CZU43	N/N	CZU68	N/N
CZU19	N/N	CZU44	N/N	CZU69	N/N
CZU20	N/N	CZU45	N/N	CZU70	N/N
CZU21	N/N	CZU46	N/N	CZU71	N/N
CZU22	N/N	CZU47	N/DM	CZU72	N/N
CZU23	N/N	CZU48	N/N	CZU73	N/N
CZU24	N/N	CZU49	N/N	CZU74	N/N
CZU25	N/N	CZU50	N/N		

Z tabulky 9 vyplývá, že z hodnocených psů plemene rhodéský ridgeback je 13,5 % N/DM a 86,5 % je N/N.

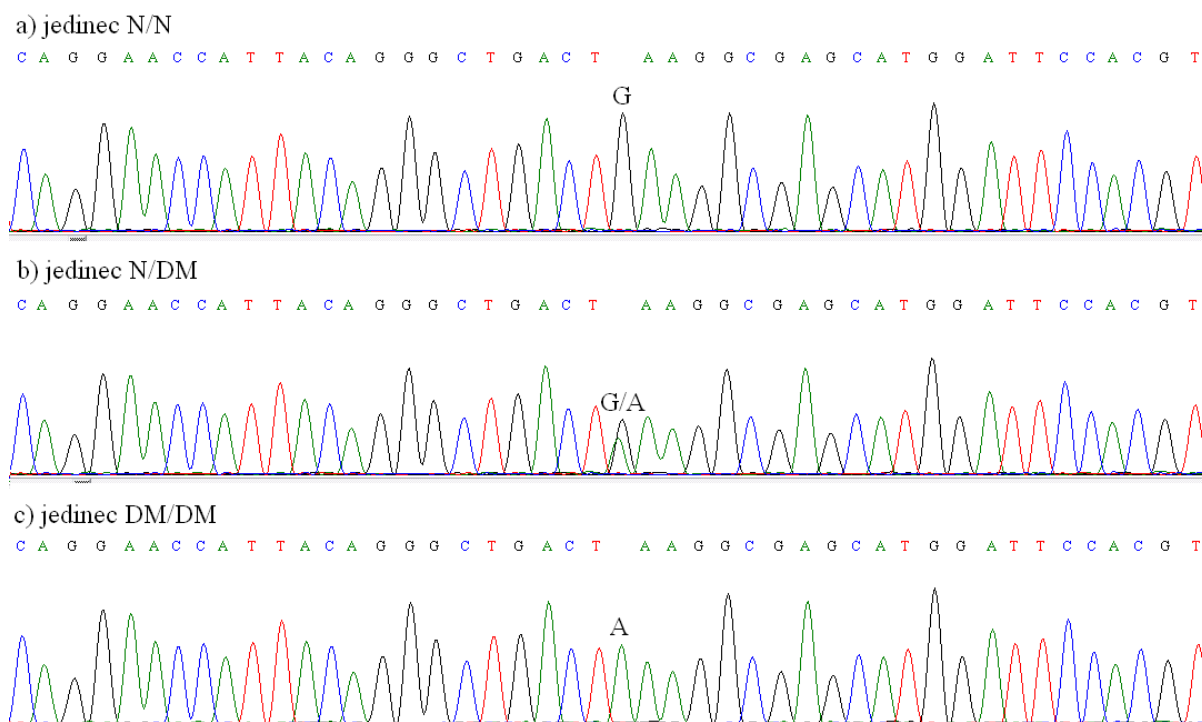
Vzhledem k tomu, že ve vzorku populace plemene rhodéský ridgeback nebyla zjištěna alelická kombinace DM/DM, je možné konstatovat, že hodnocený vzorek populace nemůžeme považovat za rovnovážnou populaci podle Hardy-Weinbergova zákona. Z těchto důvodů nebylo provedeno populačně genetické vyhodnocení frekvencí alel genu *SOD1*.

5.3 Sekvenační analýza exonu 2 genu *SOD1*

5.3.1 Porovnání sekvencí exonu 2 u vybraných zástupců plemene rhodéský ridgeback

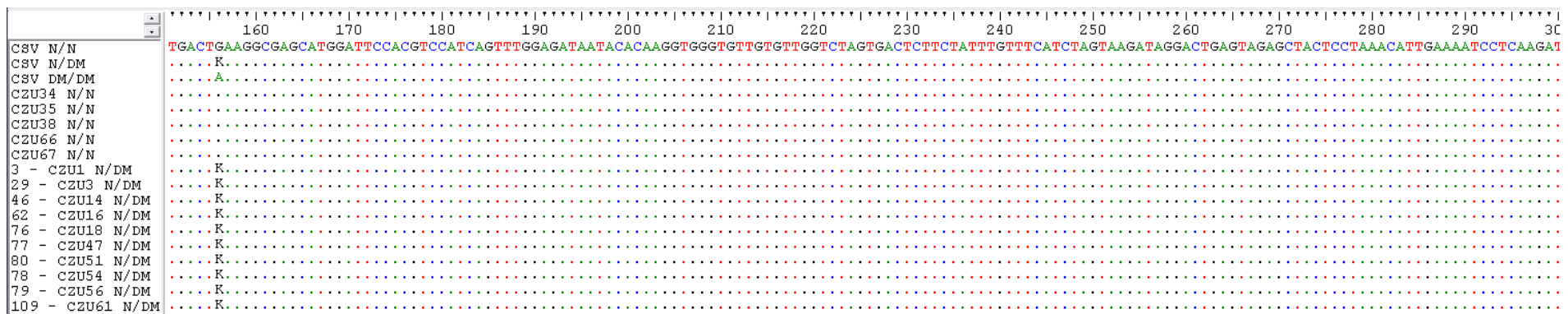
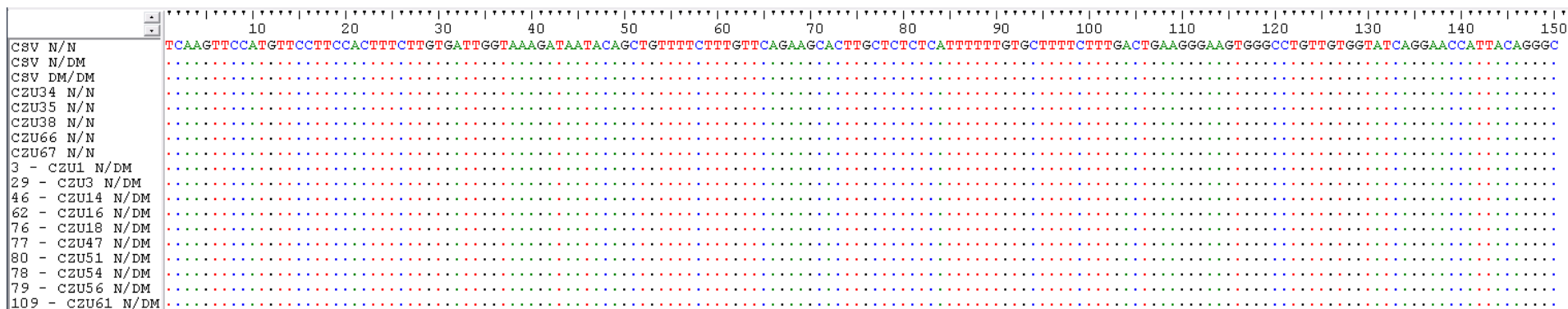
Sekvenační analýzou bylo potvrzeno, že referenční zástupce plemene československý vlčák s příznaky onemocnění DM je ve skutečnosti nositelem mutace genu *SOD1* v homozygotní sestavě. U plemene rhodéský ridgeback byla sekvenace provedena u všech psů, kteří byli na základě PCR-RFLP metody identifikováni jako přenašeči DM. U všech těchto jedinců byla sekvenční analýzou detekována heterozygotní sestava N/DM. Pro sekvenční analýzu byli použiti i 4 jedinci plemene rhodéský ridgeback s negativním výsledkem PCR-RFLP testu a jeden zástupce československých vlčáků s negativním výsledkem genetického testu provedeného v certifikované laboratoři. I u těchto psů byly potvrzeny negativní výsledky sekvenační analýzou. Na následujících obrázcích jsou znázorněny výřezy chromatogramů v oblasti výskytu kauzální mutace genu *SOD1*.

Obrázek 9: Část sekvence exonu 2 genu *SOD1* s různými kombinacemi alel



Pomocí programu BioEdit Version 7.0.9.0. (Hall, 1999) bylo provedeno porovnání všech získaných sekvencí, které potvrdilo, že v amplikonu o velikosti 300 bp byla zjištěna pouze jedna jediná mutace, která je považována za kauzální pro vznik onemocnění DM.

Obrazek 10: Sekvence exonu 2 u vybraných zástupců plemene rhodéský ridgeback



5.3.2 Porovnání aminokyselinové sekvence proteinu kódovaného exonem 2 u psů s genotypem N/N a DM/DM

Sekvence ampliconů, které jsou uvedeny na obrázku 7, byly použity jako vstupní data pro program BioEdit Version 7.0.9.0. (Hall, 1999), pomocí kterého byla simulována translace. Výsledné sekvence aminokyselin u jedince, který má obě alely nemutované a u jedince, který má obě alely mutované, jsou uvedeny v následující části práce.

Genotyp N/N

```
1 GGA AGT GGG CCT GTT GTG GTA TCA GGA ACC ATT ACA GGG CTG ACT 45
1 Gly Ser Gly Pro Val Val Val Ser Gly Thr Ile Thr Gly Leu Thr 15

46 GAA GGC GAG CAT GGA TTC CAC GTC CAT CAG TTT GGA GAT AAT ACA 90
16 Glu Gly Glu His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly Asp Asn Thr 30

91 CAA 93
31 Gln
```

Genotyp DM/DM

```
1 GGA AGT GGG CCT GTT GTG GTA TCA GGA ACC ATT ACA GGG CTG ACT 45
1 Gly Ser Gly Pro Val Val Val Ser Gly Thr Ile Thr Gly Leu Thr 15

46 AAA GGC GAG CAT GGA TTC CAC GTC CAT CAG TTT GGA GAT AAT ACA 90
16 Lys Gly Glu His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly Asp Asn Thr 30

91 CAA 93
31 Gln
```

Z porovnání sekvencí vyplývá, že exon 2 těchto dvou jedinců se liší substitucí G a A vedoucí k záměně aminokyseliny Glu za Lys. I tento výsledek je v naprostém souladu s vědeckými publikacemi zaměřenými na studium genetických příčin vzniku DM u psů.

5.4 Genealogická studie přenašečů degenerativní myelopatie u modelové populace plemene rhodéský ridgeback

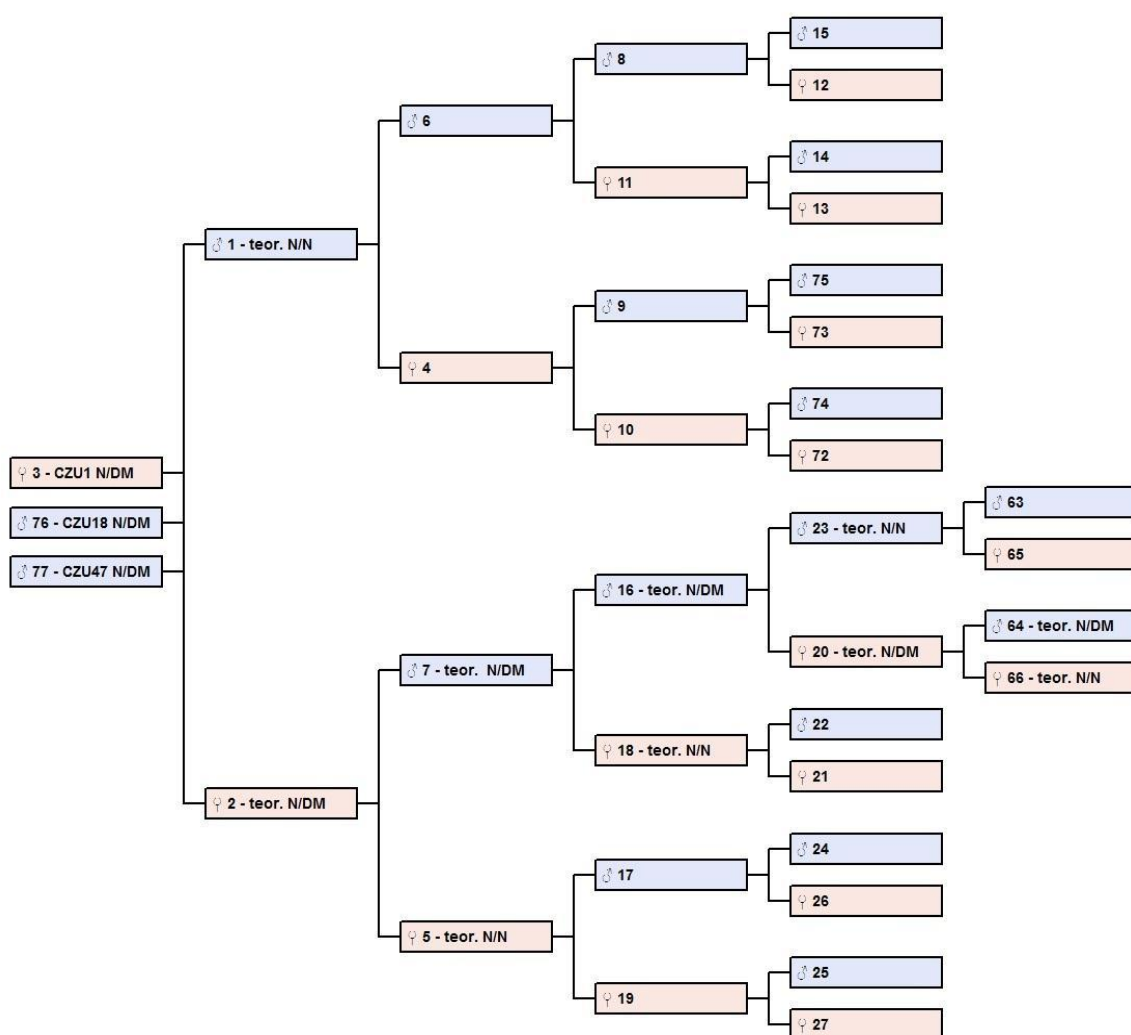
5.4.1 Sestavení rodokmenů nalezených přenašečů

Bakalářská práce je postavená na vědecké hypotéze, že nositelé mutované alely genu *SOD1* byli do České republiky importováni ze zahraničí. Z těchto důvodů byly jednotlivé rodokmeny nalezených přenašečů mutace genu *SOD1* zpracovány pomocí programu

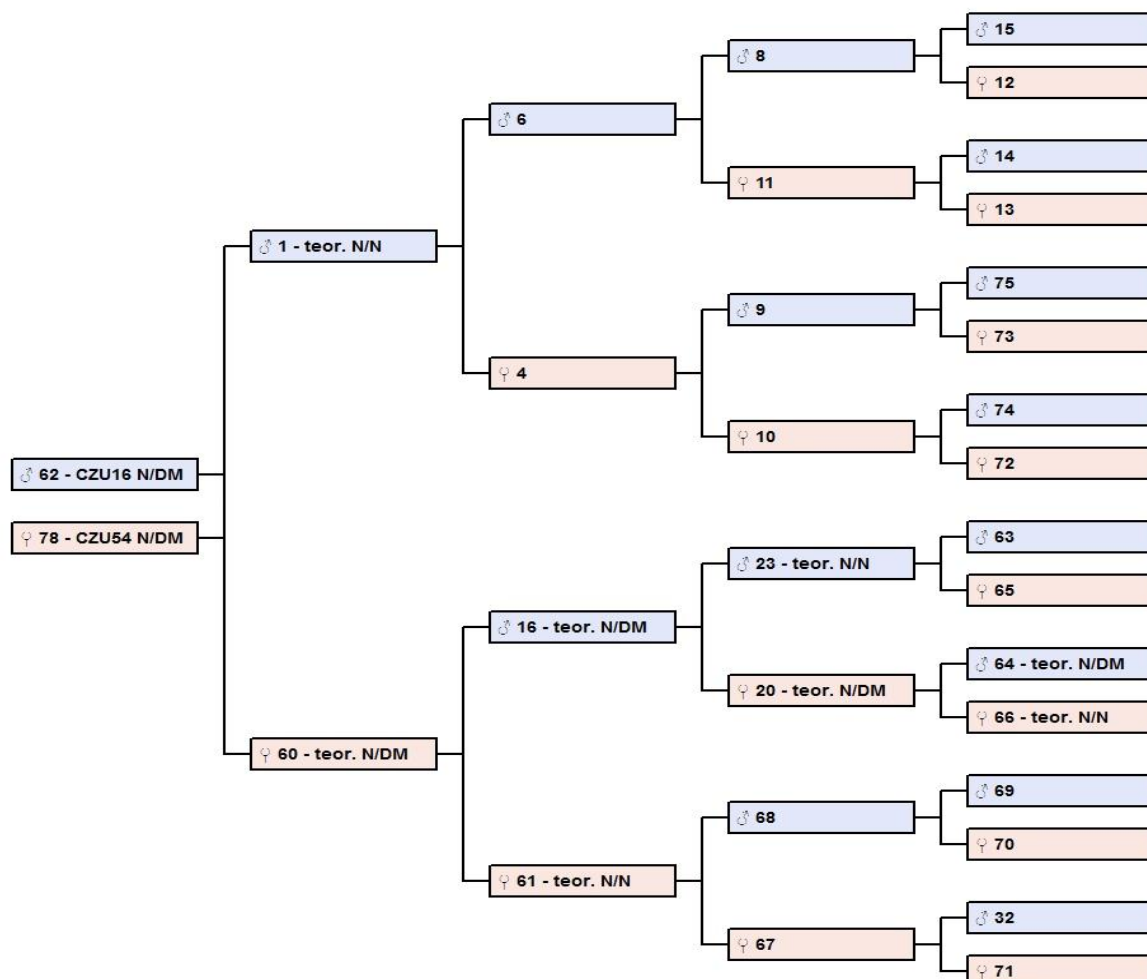
MyHeritage Family Tree Builder (MyHeritage Ltd., Version 7.0.0.). Cílem této části práce bylo propojení jednotlivých rodokmenů, které by teoreticky mohlo napomoci při hledání společných předků – potenciálních nositelů mutované alely genu *SOD1*.

Na následujících obrázcích jsou uvedeny výstupy tohoto programu, které charakterizují hodnocené rodiny identifikovaných přenašečů v rámci české populace rhodéských ridgebacků.

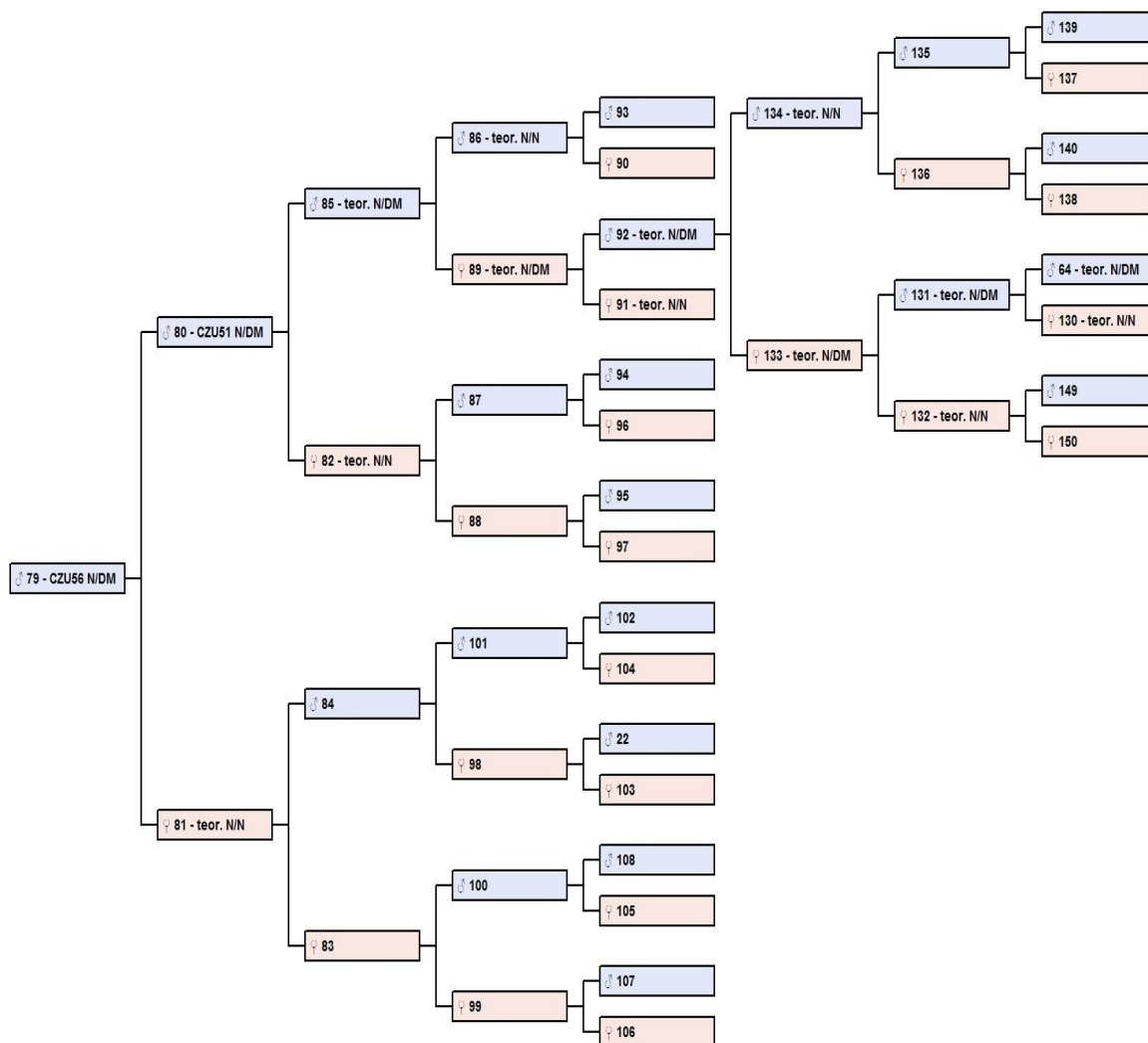
Obrázek 11: Předkové hodnocených psů CZU1, CZU18 a CZU47



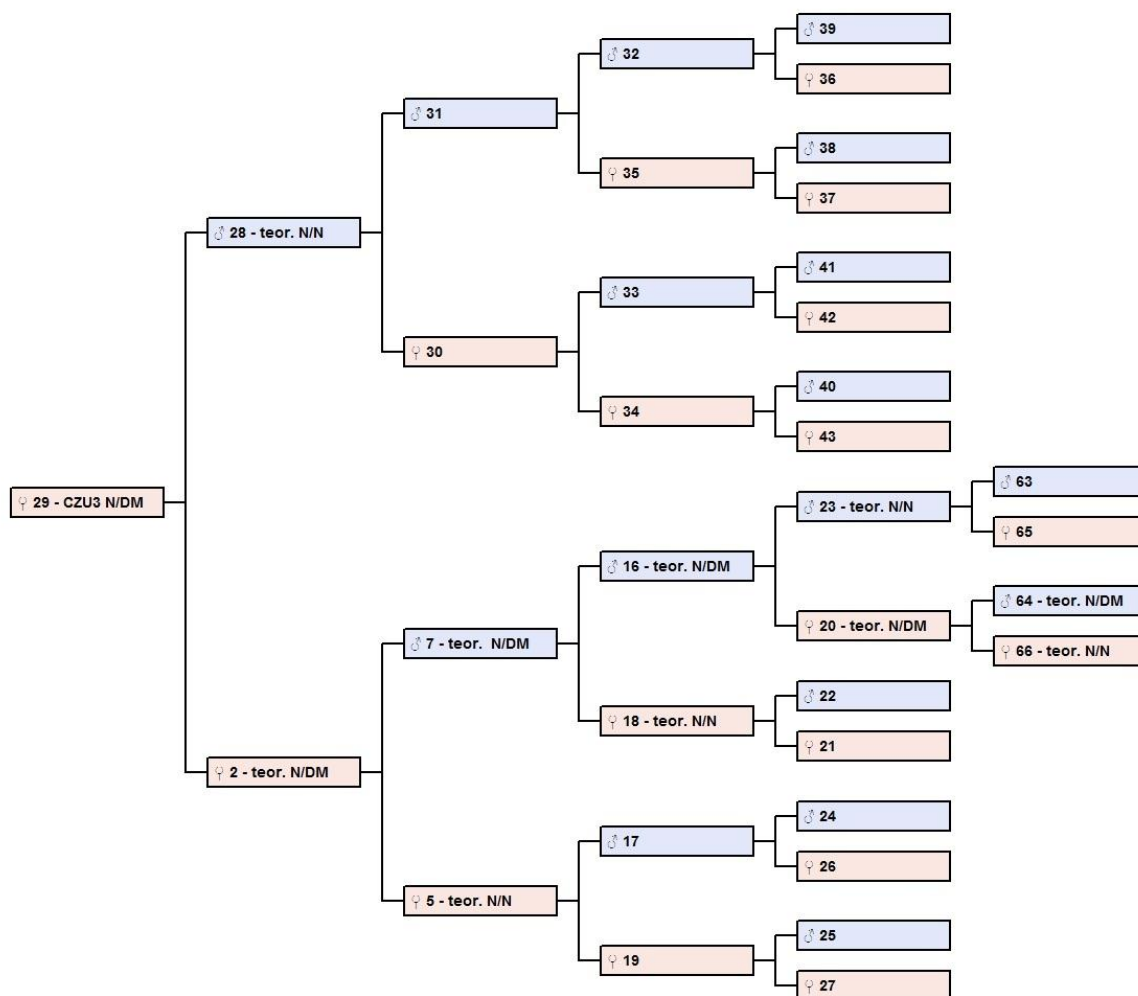
Obrázek 12: Předkové hodnocených psů CZU16 a CZU54



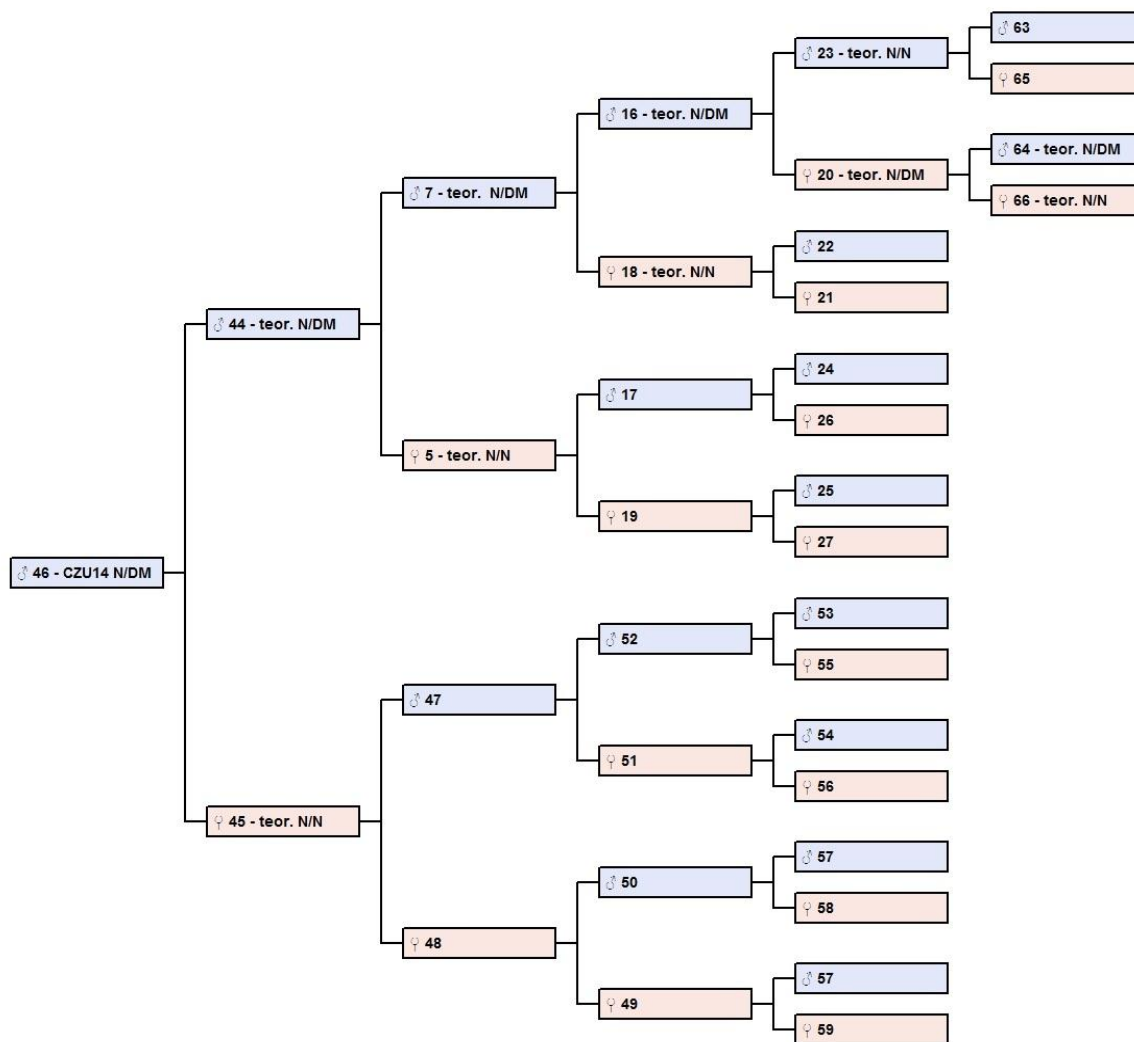
Obrázek 13: Předkové hodnocených psů CZU51 a CZU56



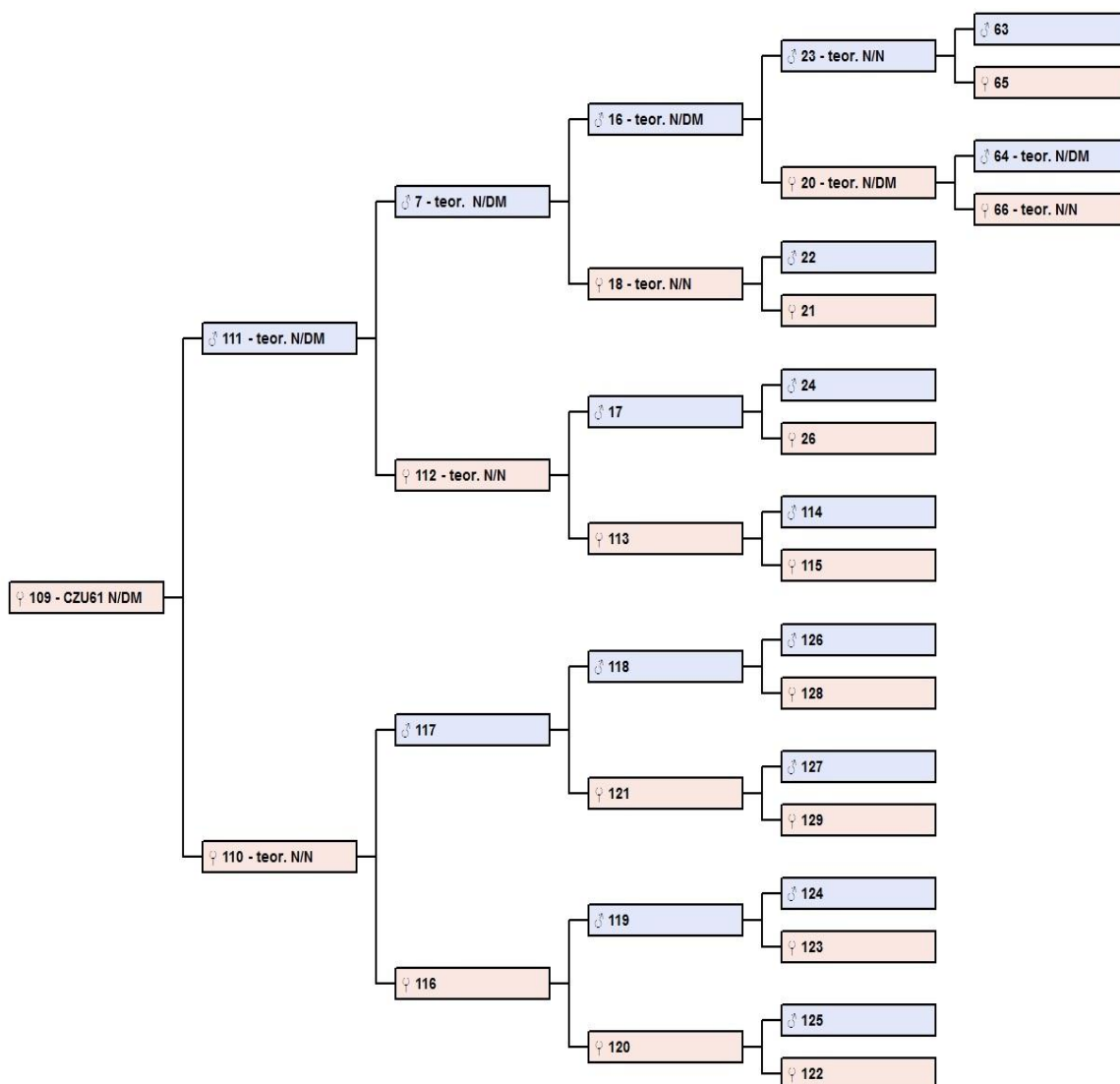
Obrázek 14: Předkové hodnoceního psa CZU3



Obrázek 15: Předkové hodnocení psa CZU14



Obrázek 16: Předkové hodnocení psa CZU61

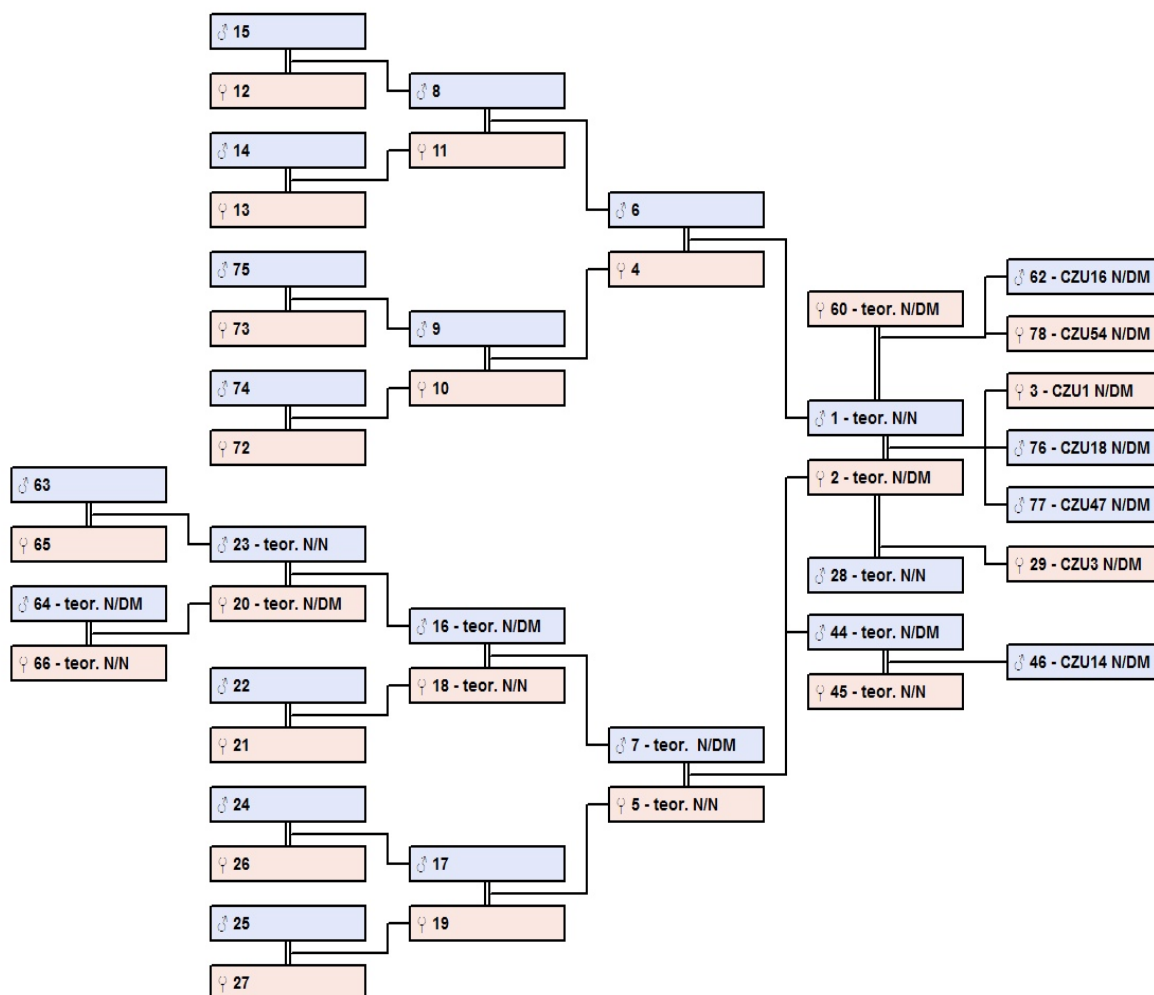


Z výše uvedených obrázků vyplývá, že přenašeče mutované alely genu *SOD1* nalezené v hodnocené populaci je možné rozdělit do 6 rodin.

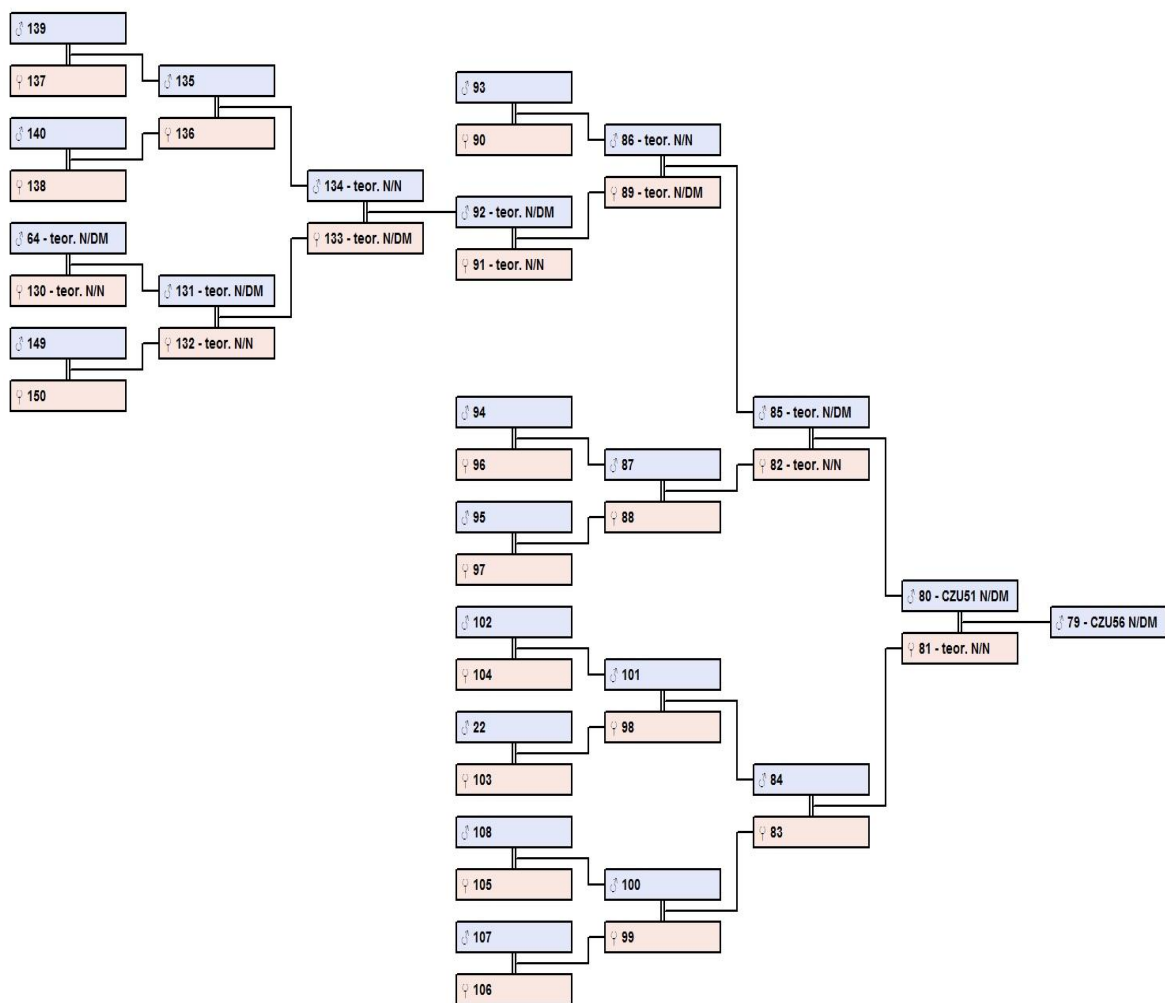
5.4.2 Vyhodnocení blízkých rodin nalezených přenašečů a nalezení teoretických zdrojů mutované alely genů *SOD1*

Pro propojení rodokmenů uvedených v předchozí kapitole byla použita funkce vytváření blízkých rodin, která je součástí programu MyHeritage Family Tree Builder (MyHeritage Ltd., Version 7.0.0.). Výstupy programu jsou znázorněny na následujících obrázcích, které odpovídají propojení nalezených 6 rodin.

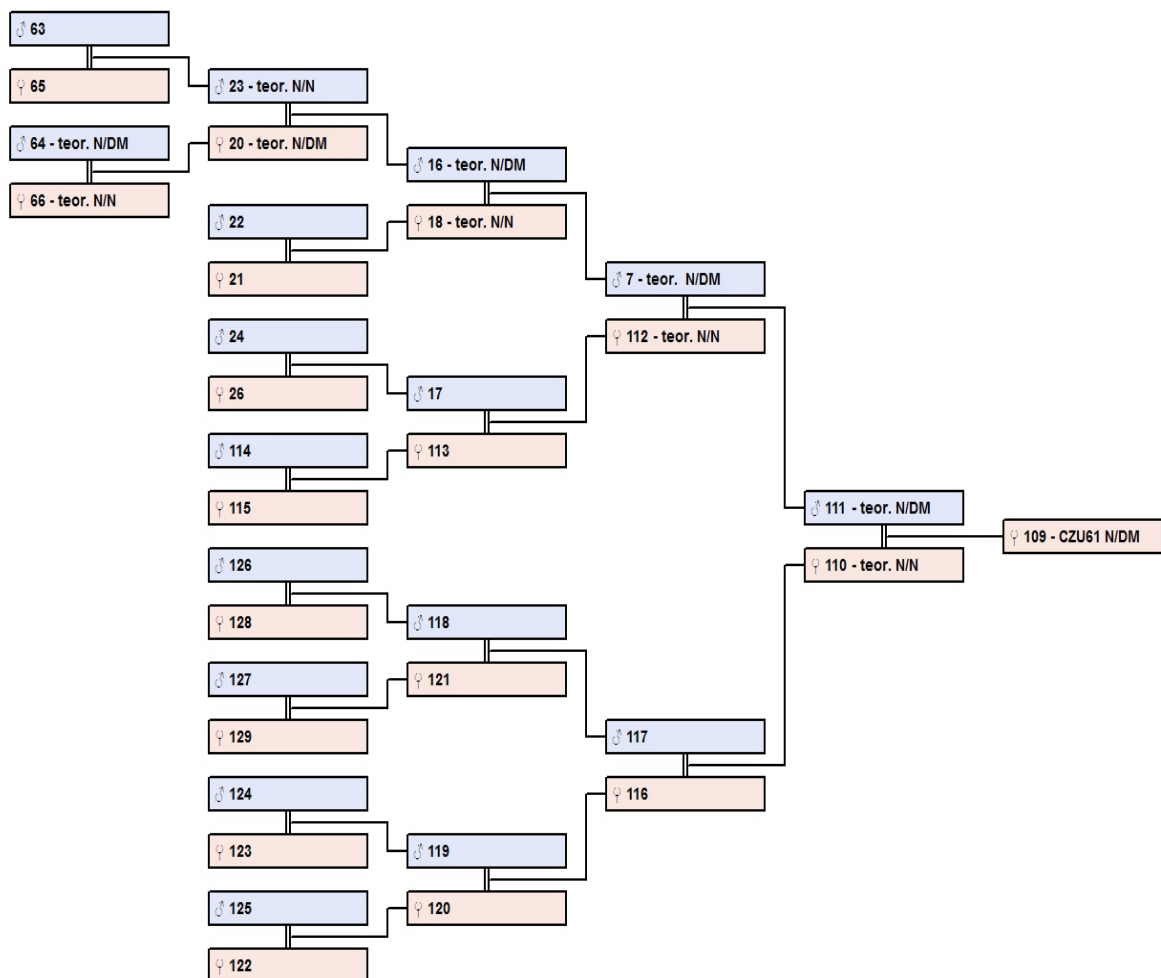
Obrázek 17: Blízká rodina hodnocených psů CZU16, CZU54, CZU1, CZU18, CZU47, CZU3 a CZU14



Obrázek 18: Blízká rodina hodnocených psů CZU51 a CZU56



Obrázek 19: Blízká rodina hodnoceného psa CZU61



Z předchozích obrázků 11 až 19 je patrné, že všechny rodiny mají minimálně jednoho společného předka (na obrázcích pod číslem 64), který je teoreticky heterozygotem N/DM tedy přenašečem DM.

6 DISKUSE

6.1 Volba plemene rhodéský ridgeback pro studium genetických příčin DM

Při řešení bakalářské práce jsem vycházela ze zkušeností katedry genetiky a šlechtění FAPPZ s identifikací kauzální mutace genu *SOD1* u plemene československý vlčák. Český klub rhodéských ridgebacků projevil zájem o testování vybraných jedinců populace tohoto plemene z hlediska výskytu kauzální mutace genu *SOD1*. Ze studia vědecké literatury jsem zjistila, že Awano et al. (2009) uvádí, že rhodéský ridgeback je považován za plemeno s vyšší frekvencí výskytu studované kauzální mutace. Z tohoto důvodu je možné považovat toto plemeno jako další modelovou populaci pro studium genetických příčin DM. Jsem si vědoma, že 74 hodnocených jedinců zcela jistě nepředstavuje úplnou populaci tohoto plemene chovanou v České republice. Hodnocený počet psů vycházel z ochoty jednotlivých chovatelů poskytnout vzorky pro anonymní testování.

6.2 Izolace DNA a hodnocení její kvality a kvantity

Metoda PCR je všeobecně chápána jako technika, která nevykazuje velké nároky na kvantitu izolované DNA (Griffin and Griffin, 1994; Innis et al., 1990). Přesto jsem se při řešení bakalářské práce snažila postupovat při izolaci tak, aby izolovaná DNA byla získána ve velkém množství a současně splňovala požadované parametry vysokomolekularity a čistoty. Metody izolace DNA jsou podle aktuální vědeckých publikací považovány za zcela rutinní laboratorní techniky, a proto řada autorů neuvádí ani výchozí biologický materiál ani způsob izolace DNA. Při řešení bakalářské práce jsem zvolila izolaci DNA pomocí komerčně vyráběného kitu NucleoSpin® Tissue XS (Machery-Nagel). Domnívám se, že mezi jednoznačné výhody izolace genomické DNA za pomoci kitu patří naprostá stabilita podmínek během izolace, rychlost izolace a konstantní vlastnosti izolované DNA. Například Green et al. (2002), který se jako první věnoval výzkumu mutací genu *SOD1* u psů, nepopisuje způsob získání genomické DNA. Rovněž Wininger et al. (2011), kteří charakterizovali mutaci genu *SOD1* u plemene bernský salašnický pes, neuvádí způsob izolace DNA. Awano et al. (2009) uvádí, že DNA použitá pro analýzy psů s příznaky DM pocházela ze sbírek izolované DNA.

V současné době existuje velké množství firem, které vyrábějí kity určené přímo k izolaci živočišné DNA z různých typů biologického materiálu. Při studiu literatury

zabývající se problematikou genetické detekce mutací genu *SOD1* u psů jsem zjistila, že žádný z autorů nepoužíval kit NucleoSpin® Tissue XS (Machery-Nagel). Lze předpokládat, že různé typy výrobců využívají velice obdobné postupy u jednotlivých kolonkových kitů. Izolaci DNA kitem QIAamp (Qiagen) u psů popisují například Ito et al. (2004). Jiný typ kitu – Isoquick extraction kit (Orca Research Inc.) použili pro izolaci DNA u psových šelem Vilà et al. (2003).

Jako výchozí biologický materiál pro izolaci DNA jsem při řešení bakalářské práce použila bukální stěry získané pomocí cytologického kartáčku. Volba tohoto výchozího materiálu vycházela z požadavků chovatelů hodnocených psů. Ve většině případů vzorky odebírali samotní chovatelé. Tento způsob odběru výchozího biologického materiálu je možné označit jako neinvazivní metodu (Beja-Pereira et al, 2009), kterou na rozdíl od odběru vzorku krve nemusí provádět veterinární lékař. Odběr bukálních vzorků pomocí kartáčku, dle mého názoru, hodnocené psy nestresuje. Odběr buněk bukálních sliznic pro izolaci DNA určené k různým genetickým analýzám popisují například Niimi et al. (2001), Schmutz et al. (2003) nebo Ito et al. (2004).

V bakalářské práci jsem neprováděla cílené statistické vyhodnocení variability kvality a kvantity izolované DNA. Přesto z výsledků průměrných výtěžností DNA a parametrů čistoty A260/A280 a A260/A230 vyplývá, že tyto parametry odpovídají vysoce čisté genomické DNA. Hodnoty těchto parametrů se shodují s údaji, kterými izolovanou DNA bez kontaminací proteiny a sacharidy charakterizují například Glasel (1995) a Wilfinger et al. (1997).

6.3 Detekce kauzální mutace *SOD1* genu u plemene rhodéský ridgeback pomocí sekvenace

Sekvenace PCR produktu je v současné době standartní postup detekce mutací typu substituce. Masivní používání této metody vyplývá zejména z výrazného zlevnění a komercializace sekvencí. Při řešení bakalářské práce jsem zvolila tuto metodu identifikace kauzální mutace genu *SOD1* z následujícího důvodu. Plemeno rhodéský ridgeback představovalo nové, doposud nehodnocené plemeno psa na katedře genetiky a šlechtění. Awano et al. (2009) sice uvádí, že u tohoto plemene se DM může vyskytovat s vyšší frekvencí, ale současně nepodávají informace o tom, která konkrétní mutace v exonových částech genu *SOD1* je u tohoto plemene mutací kauzální. Při řešení práce jsem vycházela

z hypotézy, že rovněž u plemene rhodéský ridgeback se bude jednat o identickou mutaci jako u psů, které hodnotili Awano et al. (2009) nebo Green et al. (2002). Tato hypotéza však nemusela být potvrzena, protože například Wininger et al. (2011) uvádí u plemene bernský salašnický pes zcela jinou kauzální mutaci, která vede ke stejnému fenotypovému projevu – DM. Z těchto důvodů jsem použila sekvenační techniku pro jednoznačné odhalení, zdali se v exonu 2 genu *SOD1* nachází identická kauzální mutace popsaná Green et al. (2002) a Awano et al. (2009).

Při realizovaných experimentech jsem vycházela z předpokladu, že existuje značná sekvenční homologie mezi různými plemeny psů. Proto jsem u plemene rhodéský ridgeback použila dvojici sekvenčních primerů, kterou navrhla Dujková (2013). Z výsledků amplifikace vyplynulo, že primery umožnily amplifikaci specifického fragmentu o velikosti 300 bp. Velikost tohoto fragmentu byla jednoznačně prokázána sekvencí – obrázek 10. Do svých experimentů jsem záměrně zařadila jako kontrolní genotypy jedince plemene československý vlčák, u kterých byli veterinárními lékaři diagnostikovány příznaky DM a jedince, u kterých byl certifikovanou genetickou laboratoří potvrzený genotyp N/N, N/DM a DM/DM. Důvodem zařazení těchto referenčních genotypů byla skutečnost, že u plemene rhodéský ridgeback nejsou dostupné informace o tom, že v České republice veterinární lékaři diagnostikovali jedince s příznaky DM. U některých chovatelů rhodéského ridgebacka vzniklo podezření, že v České republice se mohou vyskytovat jedinci – přenašeči (N/DM), protože v zahraničních chovech byli již jedinci s onemocněním DM potvrzeni.

Ze sekvenační analýzy jednoznačně vyplývá, že i u plemene rhodéský ridgeback byla identifikovaná zcela identická mutace v exonu 2 genu *SOD1*, kterou popsali Green et al. (2002) a Awano et al. (2009) u různých plemen a kříženců psů. Jedná se o identickou mutaci, kterou identifikovala u plemene československý vlčák Dujková (2013). Získaná sekvenční data odpovídající exonu 2 genu *SOD1* byla použita pro simulaci translace. Aminokyselinové sekvence kódovaného polypeptidového řetězce uvedené v kapitole 5.3.2. podávají jasný důkaz, že identifikovaná mutace může teoreticky i u rhodéských ridgebacků vést ke změně proteinu. Záměnu aminokyseliny Glu za aminokyselinu Lys v této části proteinu popisují u psů postižených DM Green et al. (2002), Awano et al. (2009) a Shelton et al. (2012). Záměrně uvádím v předchozí větě slovo teoreticky, protože žádný z hodnocených zástupců plemene rhodéský ridgeback nebyl z hlediska studované mutace homozygot. Z výsledků této části práce vyplývá, že vyslovená hypotéza byla potvrzena – u plemene rhodéský ridgeback byla

identifikovaná identická mutace genu *SOD1* jako u plemene československý vlčák a dalších plemen.

6.4 Detekce kauzální mutace *SOD1* genu u plemene rhodéský ridgeback pomocí PCR-RFLP

Z předchozí kapitoly diskuse vyplývá, že sekvenační analýza jednoznačně potvrdila identitu mutace genu *SOD1* u rhodéských ridgebacků s kauzální mutací popsanou Awano et al. (2009) a Green et al. (2002). Z těchto důvodů jsem mohla při řešení bakalářské práce pokračovat podle metodického postupu PCR-RFLP detekce této mutace. Zvolila jsem dvojici primerů, kterou publikovali Awano et al. (2009), která umožňuje amplifikovat PCR produkt o velikosti 79 bp. Při detekci mutace genu *SOD1* jsem zvolila shodný restriční enzym *Eco57I*. Tento enzym ve svých experimentech použili u různých plemen psů například Awano et al. (2009) a Dujková (2013). Restriční enzym *Eco57I* vyráběný firmou Fermentas se ukázal jako spolehlivý, dokázal specificky štěpit PCR amplikon o velikosti 79 bp na fragmenty o velikostech 62 bp a 17 bp. Tento závěr byl podložen na základě porovnání výsledků sekvenace a restričního štěpení, tím byla potvrzena další hypotéza bakalářské práce, že restriční endonukleáza je schopná specificky identifikovat sekvenci v amplifikovaném PCR produktu a tím identifikovat jednotlivé kombinace alel genu *SOD1*.

6.5 Frekvence výskytu mutované alely genu *SOD1* u plemene rhodéský ridgeback

Již v úvodu diskuse jsem se zmínila, o tom že 74 hodnocených jedinců zcela jistě neodpovídá úplné populaci plemene rhodéský ridgeback.

Počet psů použitých pro molekulární analýzy je u jednotlivých autorů různý. Například Awano et al. (2009) uvádí, že hodnotil celkem 157 německých boxerů, 53 chesapeake bay retrívr, 120 německých ovčáků, 67 welsh corgi pembroke a 40 rhodéských ridgebacků.

Počet psů hodnocených v bakalářské práci vyplýval z ochoty chovatelů a majitelů psů poskytnout chované jedince pro genetické analýzy. Z výsledků prezentovaných v tabulce 9 bylo zjištěno, že z celkového počtu 74 jedinců bylo 10 přenašečů (N/DM) a 64 nemutovaných jedinců (N/N). Frekvence výskytu heterozygotních přenašečů odpovídala 13,5 % a frekvence nemutovaných jedinců byla rovna 86,5 %. Awano et al. (2009) provedli rovněž vyhodnocení

frekvencí jednotlivých genotypů u plemene rhodéský ridgeback. Zjistili, že frekvence homozygotních mutovaných jedinců (DM/DM) byla rovna 10 %. Frekvence heterozygotů byla rovna 37,5 % a frekvence nemutovaných homozygotů byla rovna 52,5 %. Z porovnání výsledků získaných při řešení bakalářské práce s údaji, které publikovali Awano et al. (2009) vyplývá, že v hodnoceném vzorku české populace se nevyskytl žádný jedinec s homozygotní kombinací mutovaných alel (DM/DM). Rovněž frekvence heterozygotních přenašečů (N/DM) ve vzorku české populace byla o 27,5 % nižší oproti populaci hodnocené Awano et al. (2009).

Příčiny těchto rozdílů je možné hledat zřejmě v původu populací, které byly hodnoceny. Vzhledem k tomu, že Awano et al. (2009) prováděli tento výzkum na univerzitě v Missouri v USA, lze předpokládat, že v jejich případě se jednalo o americkou populaci plemene rhodéský ridgeback. Z výsledků těchto autorů vyplývá, že frekvence mutované alely genu *SOD1* je v této populaci výrazně vyšší. Z frekvencí jednotlivých genotypů identifikovaných v této americké populaci bylo možné vypočítat, že frekvence mutované alely genu *SOD1* dosáhla hodnoty 28,75 %. Naopak ve vzorku české populace hodnocené v bakalářské práci byla frekvence mutované alely pouze 6,76 %. Zjištěný rozdíl ve frekvenci mutované alely může být, dle mého názoru, způsobený oddělením těchto dvou populací, relativně malou četností importů chovných zvířat popřípadě různou intenzitou křížení. Získané výsledky, které prokázaly existenci heterozygotů N/DM, potvrzují i další hypotézu bakalářské práce, která vychází z určitých obav chovatelů, že v důsledku importu zahraničních chovných jedinců se do České republiky dostala i mutovaná alela genu *SOD1*.

6.6 Analýza rodokmenů a vyhledání potencionálního zdroje mutované alely genu *SOD1* u plemene rhodéský ridgeback

Rodokmeny jsme získali od majitelů rhodéských ridgebacků, díky ochotě poskytnout informace o jejich psech a informace o dalších generacích společných předků hodnocených zvířat, které již nebyly uvedeny v průkazech původu, jsme získali na základě dat mezinárodní databáze rodokmenů rhodéských ridgebacků, která je volně k dispozici na adrese <http://www.rhodesian-ridgeback-pedigree.org/>.

Pro zpřehlednění byly rodokmeny vytvořeny v programu pro tvorbu rodokmenů MyHeritage Family Tree Builder (MyHeritage Ltd., Version 7.0.0.). Tyto rodokmeny byly následně použity pro vyhledání potencionálního zdroje mutované alely genu *SOD1* u plemene rhodéský ridgeback. Po důkladném prostudování rodokmenů všech hodnocených psů, jako i jejich předků, jsme našli společného předka, který se zdá býti potencionálním zdrojem mutované alely genu *SOD1* a tedy možným přenašečem mutované alely do následujících generací.

Pomocí metody rodokmenů jsme tedy objevili potencionální zdroj mutované alely u předka společného pro všechny hodnocené psy v této bakalářské práci. Tento způsob vyhledání je ojedinělý v rámci spektra autorů zabývajících se danou tematikou. Nejvíce podobný způsob vyhledávání potencionálního zdroje mutované alely genu *SOD1* byl použit v rámci práce Green et al. (2002), kteří zmapovali gen *SOD1* a tím identifikovali mutaci v exonu 2 genu *SOD1*, která má za následek onemocnění degenerativní myelopatie u psů postižených touto mutací.

7 ZÁVĚR

V úvodu práce byly vytyčeny vědecké hypotézy, na kterých bylo postaveno řešení celé bakalářské práce. V závěru mohu konstatovat, že všechny tyto hypotézy byly potvrzeny a můžeme je považovat za platné.

Získané výsledky je možné stručně shrnout do následujících bodů:

- Byla navázána spolupráce s Českým klubem rhodéských ridgebacků. Mezi chovateli byl zájem o anonymní testování psů z hlediska kandidátní mutace genu *SOD1*.
- Celkem bylo otestováno 74 zástupců plemene rhodéský ridgeback chovaných v České republice. Získané výsledky byly předány individuálně chovatelům.
- Izolace DNA z bukalních sliznic pomocí komerčně vyráběného kitu se ukázala jako vhodná pro následné molekulární analýzy. Její vysokomolekularita i čistota byly vhodné pro aplikaci metody PCR-RFLP.
- Dvojice primerů, které navrhli Awano et al. (2009) se ukázaly jako vhodné pro amplifikaci PCR produktu o velikosti 79 bp. Restriční enzym *Eco57I* dokázal spolehlivě rozlišit alelické varianty genu *SOD1*.
- Sekvenační analýzou bylo potvrzeno, že u plemene rhodéský ridgeback se vyskytuje mutace genu *SOD1*:c.118G > A.
- Zhodnocení vzorků populace rhodéských ridgebacků chovaných v České republice vyplynulo, že ani jeden ze psů není z hlediska této mutace homozygotní. Bylo nalezeno 10 heterozygotních přenašečů (13,5 %).
- Na základě informací chovatelů jsem předpokládala, že výskyt mutované alely genu *SOD1* v České republice je způsoben importem zahraničních psů. Na základě studia rodokmenů identifikovaných přenašečů se podařilo tyto rodokmeny propojit a vyhledat společného zahraničního předka, který může být hypotetickým původcem mutované alely genu *SOD1*.

Doporučení pro chovatele

Genetické testy na degenerativní myelopatii nejsou u plemene rhodéský ridgeback povinné pro uchovnění jedinců. Genetické testy jsou dobrovolné a záleží na zodpovědnosti jednotlivých chovatelů. Získané výsledky byly předány poradkyni chovu a lze předpokládat, že budou přínosem pro eliminaci mutované alely z plemene rhodéský ridgeback. Z řešení

bakalářské práce vyplývá, že existuje spolehlivá molekulární metoda, která umožňuje spolehlivě identifikovat zdravé jedince, nemocné jedince i přenašeče.

Vzhledem k tomu, že mutace genu *SOD1*:c.118G > A vykazuje recesivní dědičnost, je pro chovatele důležité mít přehled o přenašečích – heterozygotech, u kterých se degenerativní myelopatie neprojeví. Domnívám se, že rozumným způsobem, jak využít získané výsledky o genotypizaci psů, které by výrazně nesnížilo rozsah efektivní populace, je křížit mezi sebou dva zdravé jedince, kteří nejsou přenašeči. Při použití jednoho z rodičů, který je přenašečem degenerativní myelopatie, volit druhého rodiče, který bude zdravý homozygot nesoucí obě nemutované alely genu *SOD1*. Z takového rodičovského spojení se narodí 50 % přenašečů a 50 % zdravých jedinců, kteří nejsou přenašeči. Teoreticky se však nenarodí žádný potomek, který by byl z hlediska mutace genu *SOD1* homozygot a tudíž s vysokým rizikem vzniku onemocnění degenerativní myelopatie.

8 SEZNAM LITERATURY

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.

Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. C., Taylor, J. F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P. A., Olby, N. J., Shelton, G. D., Khan, S., O'Brien, D. P., Lindblad-Toh, K., Coates, J. R. 2009 Genome-wide association analysis reveals a *SOD1* mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. PNAS. 106 (8). 2794 – 2799.

Bartůňková, J. et al.: Vyšetřovací metody v imunologii. Grada Publishing. Praha. 2005. 176 s. ISBN 80-247-0691-1.

Beja-Pereira, A., Oliveira, R., Alves, P. C., Schwartz, M. K., Luikart, G. 2009. Advancing Ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. Molecular Ecology Resources. 9 (5). 1279 – 1301.

Carlson, S.: Rhodéský ridgeback. Ottovo nakladatelství. Praha. 1999. 96 s. ISBN 80-7181-280-3.

Coates, J. R., Lindblad-Toh, K., Wade, C., Johnson, G. S. 2009. Prediction and diagnosis of canine degenerative myelopathy. United States Patent Application Publication. Pub. No. US 2009/0239225. 4. 2. 2009.

Dostál, J.: Genetika a šlechtění plemen psů. Dona. České Budějovice. 2007. 261 s. ISBN 987-80-7322-104-1.

Glasel, J. A. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. Biotechniques. 18 (1). 62 – 63.

Glick, B. R., Thompson, J. E.: Methods in plant molecular biology and biotechnology. CRC Press. London. Tokyo. 1993. ISBN: 0849351642.

Green, S. L., Tolwani, R. J., Varma, S., Quignon, P., Galibert, F., Cork, L. C. 2002. Structure, chromosomal location, and analysis of the canine Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) gene. Journal of Heredity. 93 (2). 119 – 124.

Griffin, H. G., Griffin, A. M.: PCR Technology – Current Innovation. CRC Press. London. 1994. 370 s. ISBN: 0-8493-8674-8.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95 – 98.

Henry, R. J.: Practical applications of plant molecular biology. Chapman & Hall. London. 1997. ISBN: 0412732203.

Chamberlainová, A.: Rhodéský ridgeback. Fortuna Print. Praha. 2002. 158 s. ISBN 80-7321-005-3.

Innis, M. A., Gelfand, D. H.: Optimization of PCRs. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (ed.): PCR protocols: A guide to methods and applications, New York, academic Press, Inc., 1990, 482 s. ISBN 0123-721814.

Ito, H., Nara, H., Inoue-Murayama, M., Shimada, M. K., Koshimura, A., Ueda, Y., Kitagawa, H., Takeuchi, Y., Mori, Y., Murayama, Y., Morita, M., Iwasaki, T., Ota, K., Tanabe, Y., Ito, S. 2004. Allele Frequency Distribution of the Canine Dopamine Receptor DR Gene Exon III and I in 23 Breeds. Journal of Veterinary Medical Science. 66 (7). 815 – 820.

Jílek, P.: Základy imunologie. Anyway. Praha. 2008. 77 s. ISBN 978-80-254-2422-3.

Krämerová, E. M.: 250 plemen psů. Euromedia Group. Praha. 2010. 287 s. ISBN 978-80-242-2651-4.

Lewis, P. R., Schneider, N. A. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England Journal of Medicine*. 344 (22). 1688 – 1700.

March, P. A., Coates, J. R., Ab\ad, R. J., Williams, D. A., O'Brien, D. P., Olby, N. J., Keating, J. H., Oglesbee, M. 2009. Degenerative myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi dogs. *Veterinary Pathology*. 46 (2). 241 – 250.

McCord, J. M., Fridowich, I. 1969. Superoxide Dismutase, an enzymic fiction for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. 244 (22). 6049 – 6055.

MyHeritage Ltd. Version 7.0.0. Copyright © 2006 – 2014. Dostupné z <<http://www.myheritage.com>>.

Niimi, Y., Inoue-Murayama, M., Kato, k., Matsuura, N., Murayama, Y., Ito, S., Momoi, Y., Konno, K., Iwasaki, T. 2001. Breed differences in allele frequency of the dopamine receptor D4 gene in dogs. *The Journal of Heredity*. 92 (5). 433 – 436.

Pavlík, M. E. 1999. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku – část 3. Labor aktuell CS. Praha. 2. 22 – 25.

Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. F. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York. p. 545. ISBN: 0879693096.

Shelton, G. D., Johnson, G. C., O'Brien, D. P., Katz, M. L., Pesayco, J. P., Chang, B. J., Mizisin, A. P., Coates, J. R. 2012. Degenerative myelopathy associated with a missense mutation in the superoxide dismutase 1 (*SOD1*) gene progresses to peripheral neuropathy in Pembroke Welsh Corgis and Boxers. *Journal of the Neurological Sciences*. 318 (1 – 2). 55 – 64.

Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Ellinwood, N. M., Kerns, J. A., Barsh, G. D. 2003. MC1R studies in dogs with melanistic mask or brindle pattern. *Journal of Heredity*. 94 (1). 69 – 73.

Vilà, C., Walker, C., Sundqvist, A. K., Flagstad, Ø., Andersone, Z., Casulli, A., Kojota, I., Valdmann, H., Halverson, J., Ellegren, H. 2003. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity*. 90 (1). 17 – 24.

Wilfinger, W. W., Mackey, K., Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectro-photometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 22 (3). 474 – 481.

Wininger, F. A., Zeng, R., Johnson, G. S., Katz, M. L., Johnson, G. C., Bush, W. W., Jarboe, J. M., Coates, J. R. 2011. Degenerative Myelopathy in a Bernese Mountain Dog with a Novel *SOD1* Missens Mutation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 25 (5). 1166 – 1170.

Zelko, I. N., Mariani, T. J., Folz, R. J. 2002. Superoxid dismutase multigene family: A comparison of the Cuze-SOD (*SOD1*), Mn-SOD (*SOD2*), and EC-SOD (*SOD3*) gene structures, evolution, and expression. *Free Radiál Biology & Medicine*. 33 (3). 337 – 349.

<http://biologie-v-kostce.blogspot.cz>. [online] 2011 [cit. 2014 – 02 – 13] Dostupné z <<http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/58-restrikcni-nukleazy-vyznam-v-genovem.html>>

<http://opvk2011.ptacisvet.cz>. [online] 2011 [cit. 2014 – 02 – 13]. Dostupné z <http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz>

www.ckrr.cz. [online] 10. 07. 2013 [cit. 2014 – 01 – 27]. Dostupné z <<http://www.ckrr.cz/index.php/chov-rr/zdravi-a-genetika/1856-dermoid-sinus>>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALS	Amyotrofická laterální skleróza
bp	Páry bází molekuly DNA
ddH ₂ O	Dvakrát dionizovaná H ₂ O
dsDNA	Dvouřetězcová DNA
cDNA	DNA vzniklá reverzní transkriptázou z molekuly mRNA
CFA31	Chromozóm 31 psa domácího
DM	Degenerativní myelopatie
DM/DM	Homozygotní jedinec, který má obě alely mutované
DNA	Deoxyribonukleotidová kyselina
dNTP	Deoxynukleotid trifosfát
Ensembl	Mezinárodní nukleotidová databáze
FCI	Mezinárodní kynologická federace (Fédération Cynologique Internationale)
<i>hSOD1m</i>	Varianta genu <i>SOD1</i> vyskytující se u hlodavců
LMN	Dolní motorické nervy
Mb	Milióny párů bází
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NCBI	Nukleotidová databáze mezinárodního centra pro biotechnologické informace (National Center for Biotechnology Information)
N/DM	Heterozygotní jedinec, který má 1 alelu nemutovanou a 1 alelu mutovanou
N/N	Homozygotní jedinec, který má obě alely nemutované
OFA	Ortopedická nadace zvířat (Orthopedic Foundation for Animals)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RFLP	Délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)

SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
<i>SOD1</i>	Superoxid dismutáza 1
ssDNA	Jednořetězcová DNA
TBE	Tris-borátový pufr (Sambrook et al., 1989)
TE	Tris-EDTA pufr (Sambrook et al., 1989)
UMN	Horní motorické nervy

10 SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY

Fotografická příloha zástupce plemene rhodéský ridgeback:

