

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Studium kandidátních genů (SOD1 a DNM1)
degenerativní myelopatie a výcvikového kolapsu u psů
pomocí pyrosekvenace**

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Autor práce: Bc. Alžběta Lacinová

©2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma "Studium kandidátních genů (SOD1 a DNM1) degenerativní myelopatie a výcvikového kolapsu u psů pomocí pyrosekvenace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne: _____

Alžběta Lacinová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za odborné vedení mé diplomové práce, za pomoc a poskytnuté rady při jejím řešení. Můj velký dík patří také Ing. Jakubu Vaškovi, Ph.D., za veškeré rady, připomínky a čas, který mi věnoval. Také děkuji Ing. Daniele Čílové nejen za trpělivost při provádění laboratorních výzkumů.

Diplomová práce vznikla za podpory grantového projektu Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze "SV13-75-21360 Využití aktuálních biologických a statistických poznatků a metod pro vývoj nových postupů ve šlechtění rostlin a zvířat".

Studium kandidátních genů (SOD1 a DNM1) degenerativní myelopatie a výcvikového kolapsu u psů pomocí pyrosekvenace

Souhrn

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na charakteristiku genu SOD1, jehož mutace způsobuje degenerativní myelopatii (DM), a genu DNM1, který zapříčiňuje výcvikový kolaps (EIC). Je zde uvedena také charakteristika obou onemocnění. Byla nastíněna i podobnost degenerativní myelopatie s lidskou amyotrofickou laterální sklerózou (ALS) a využití psa jako modelového organismu pro studium této nemoci. Dále je v literárním přehledu charakterizována sekvenační metoda 454/Roche (pyrosekvenace), která byla využita při experimentech.

V následující části diplomové práce je popsán postup získávání vzorků DNA pro analýzy, amplifikace fragmentů DNA jednotlivých genů pomocí long-range PCR a vlastní pyrosekvenace genů SOD1 a DNM1. Pyrosekvenace poskytla množství údajů, které byly statisticky a bioinformaticky vyhodnoceny. Dále byla provedena detekce kauzálních mutací genů SOD1 a DNM1 pomocí PCR-RFLP. Získaná data se poté hodnotila pomocí kladogramů a z pohledu populační genetiky.

Do experimentů pomocí pyrosekvenace bylo zahrnuto 22 psů (*Canis lupus familiaris* L.) a 2 zástupci vlka eurasijského (*Canis lupus lupus* L.). Bylo popsáno 71 polymorfních míst oproti referenčním sekvencím, avšak pouze 5 mutací (substitucí) se vyskytovalo v kódujících částech jednotlivých genů. V exonu 2 genu SOD1 byla detekována 1 substituce a 4 byly nalezeny v exonech 6 a 7 genu DNM1, z nichž byla pouze 1 mutace nesynonymní a zároveň kauzální pro vznik EIC.

Do analýz pomocí PCR-RFLP bylo zařazeno 1320 psů. U dvou plemen z tohoto souboru (československý vlčák – ČSV a labradorský retriever – LR) byly následně hodnoceny genotypové i alelické frekvence, stupeň inbreedingu a byl simulován dopad úplné selekce proti recesivní (mutované) alele.

Populační analýza pro gen SOD1 byla provedena u plemene ČSV, protože pouze u nich se vyskytovala mutovaná alela. V populaci ČSV se nacházelo 56 % dominantních homozygotů, 38 % heterozygotů a 6 % recesivních homozygotů. Obdobně byla provedena populační analýza u genu DNM1 pouze u plemene LR, u něhož se vyskytovala mutovaná alela. V populaci LR bylo zjištěno 63 % dominantních homozygotů, 33 % heterozygotů a 4 % recesivních homozygotů. Koeficient inbreedingu odhadovaný na základě genotypových frekvencí genu SOD1 byl u plemene ČSV roven 2,00 %. U plemene LR byl koeficient

inbreedingu vyhodnocován na základě genotypových frekvencí genu DNM1, a byl roven 5,21 %. V případě úplné selekce po 20 generací vůči recesivním homozygotům genu SOD1 by došlo u plemene ČSV k poklesu frekvence recesivní alely v populaci o 20,88 % a v případě genu DNM1 u plemene LR by frekvence klesla o 16,39 %.

Výsledky diplomové práce poskytly díky pyrosekvenaci informace o polymorfismech v genech SOD1 a DNM1 a díky PCR-RFLP a následným populačním analýzám zhodnocení výskytu recesivních alel studovaných genů v populaci československého vlčáka a labradorského retrievera. Data mohou být dále využita například při sestavování chovných párů s ohledem na snižování frekvencí výskytu mutovaných alel způsobujících degenerativní myelopatii a výcvikový kolaps.

Klíčová slova: pes, *Canis lupus familiaris* L., degenerativní myelopatie, výcvikový kolaps, SOD1, DNM1, pyrosekvenace, 454/Roche

Study of Canine Genes (SOD1 and DNMT1) for Degenerative Myelopathy and Exercise-induced Collapse in Dogs Using Pyrosequencing

Summary

The theoretical part of the thesis describes the structure, functions and localization of genes and enzymes SOD1 and DNMT1 and characteristics of their subsequent diseases: degenerative myelopathy which is caused by the mutation of the SOD1 gene and exercise-induced collapse caused by the mutation of the DNMT1 gene. The similarities between canine degenerative myelopathy and human amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are underlined as a base for the use of dogs as model organisms for the ALS research. The principles of 454 pyrosequencing method, used for the research part of the thesis, are also characterized in the theoretical part.

The following part of the thesis presents the method used, specifically the collection of samples, DNA fragments amplification of SOD1 and DNMT1 genes by long-range PCR and subsequent pyrosequencing. The exact process of pyrosequencing is described – the genomic library preparation, emulsion PCR and actual sequencing. Data obtained by these experiments were analyzed by bioinformatical and statistical means. The experiment further included detection of causal mutation in SOD1 and DNMT1 genes by PCR-RFLP method. Cladograms and populational genetics were used for data analysis.

As samples for the pyrosequencing part of the thesis 22 dogs (*Canis lupus familiaris* L.) and 2 Eurasian wolves (*Canis lupus lupus* L.) were used. There were 71 sites of polymorphism detected compared to the referential sequences, but only 5 mutations (substitutions) were localized in coding part of the genes. In the exon 2 of SOD1 gene there was 1 mutation, whereas in the exon 6 of DNMT1 gene there were 4 mutations, from which only 1 was missense substitution causal for the EIC disease.

For the PCR-RFLP analysis, samples from 1320 dogs were used. Two breeds (The Czechoslovakian Wolfdog and The Labrador Retriever) were subsequently evaluated for genotypical and allelic frequencies, inbreeding coefficient and impact of simulated selection against recessive (mutant) allele.

The population analysis of SOD1 gene was only assessed for the Czechoslovakian Wolfdog, as it was the only breed with the mutation present. There were 56 % homozygous-dominant, 38 % heterozygous and 6 % homozygous-recessive individuals detected in their

population. Similar population analysis was performed for DNMI gene in Labrador retriever breed. There were 63 % homozygous-dominant, 33 % heterozygous and 4 % homozygous-recessive individuals found in the population. The inbreeding coefficient in the Czechoslovakian Wolfdog, calculated by genotypical frequencies of SOD1 gene, was estimated to be 2,00 %. In Labrador retriever, the inbreeding coefficient based on DNMI gene was found out to be 5,21 %. It was detected that in the case of 20 generations of complete selection against recessive homozygotes, the frequency of SOD1 recessive allele in Czechoslovakian Wolfdog population would drop by 20,88 %, whereas the frequency of DNMI recessive allele would decrease by 16,39 %.

This thesis presents information about SOD1 and DNMI genes polymorphisms from pyrosequencing experiments and the evaluation of the recessive allele incidence of these genes in the population of the Czechoslovakian Wolfdog and the Labrador retriever, based on PCR-RFLP and population studies. Presented data can be used for the forming of breeding couples and thus decreasing the frequency of SOD1 and DNMI mutant alleles causing degenerative myelopathy and exercise-induced collapse.

Keywords: dog, *Canis lupus familiaris* L., degenerative myelopathy, exercise-induced collapse, SOD1, DNMI, pyrosequencing, 454/Roche

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	2
2.1	Vědecké hypotézy.....	2
2.2	Cíle práce.....	3
3.	LITERÁRNÍ REŠERŠE	4
3.1	Superoxid dismutázy – SOD	4
3.1.1	Lokalizace genů SOD	5
3.2	Superoxid dismutáza 1 – SOD1.....	6
3.2.1	Enzymatická aktivita SOD1	6
3.2.2	Struktura a lokalizace genu SOD1	7
3.2.3	Gen SOD1 psa (<i>Canis lupus familiaris</i> L.)	8
3.3	Degenerativní myelopatie – DM	10
3.3.1	Projevy DM	11
3.3.2	Výskyt DM u psů.....	11
3.3.3	Genetická podstata DM.....	13
3.3.4	Diagnostika DM	14
3.3.5	Léčba DM.....	16
3.3.6	Podobnost DM a amyotrofické laterální sklerózy – ALS	17
3.3.7	Modelové organismy pro studium ALS	18
3.4	Dynaminy – DNM	19
3.4.1	Lokalizace genů DNM	19
3.5	Dynamin 1 – DNM1	20
3.5.1	Enzymatická aktivita DNM1	20
3.5.2	Struktura a lokalizace genu DNM1	20

3.5.3	Gen DNMI u psa (<i>Canis lupus familiaris</i> L.).....	20
3.6	Výcvikový kolaps – EIC	21
3.6.1	Projevy EIC	21
3.6.2	Výskyt EIC u psů.....	22
3.6.3	Genetická podstata EIC.....	22
3.6.4	Diagnostika EIC	23
3.6.5	Léčba EIC.....	23
3.7	Sekvenování nové generace	24
3.8	Pyrosekvenování (metoda 454/Roche)	24
3.8.1	Příprava DNA knihovny	26
3.8.2	Emulzní PCR – emPCR	27
3.8.3	Vlastní pyrosekvenace	27
3.8.4	Schéma reakcí probíhajících při pyrosekvenování	29
4.	MATERIÁL A METODY	31
4.1	Výběr hodnocených jedinců pro analýzy DNA.....	31
4.1.1	Plemena psů a zástupci vlka eurasijského použité pro pyrosekvenaci	31
4.1.2	Plemena psů použité pro detekci kauzálních mutací genů SOD1 a DNMI pomocí PCR-RFLP	31
4.2	Izolace genomické DNA	32
4.2.1	Odběr buněk bukálních sliznic	32
4.2.2	Vlastní izolace DNA	32
4.2.3	Vyhodnocení kvality a kvantity izolované DNA	32
4.3	Získání amplikonů studovaných genů pomocí long-range PCR.....	33
4.3.1	Navržení primerů pro amplifikaci genu SOD1	33
4.3.2	Navržení primerů pro amplifikaci fragmentu genu DNMI	33
4.3.3	Podmínky amplifikace fragmentů genů SOD1.....	34
4.3.4	Podmínky amplifikace fragmentu genů DNMI	34

4.4	Pyrosekvenace genů SOD1 a DNMI.....	35
4.4.1	Příprava DNA knihovny	35
4.4.2	Emulzní PCR	36
4.4.3	Příprava na pyrosekvenaci a vlastní pyrosekvenace.....	37
4.5	Zpracování dat získaných pomocí pyrosekvenace	37
4.5.1	Filtrování dat	38
4.6	Haplotypy genů SOD1 a DNMI a jejich bioinformatické vyhodnocení	38
4.6.1	Definice haplotypů.....	38
4.6.2	Vyhodnocení podobností mezi haplotypy genů SOD1 a DNMI na základě kladogramů.....	39
4.7	Detekce kauzální mutace genu SOD1 vedoucí k DM u psů pomocí PCR-RFLP	40
4.7.1	Navržení PCR-RFLP markeru mutace genu SOD1.....	40
4.7.2	Výběr enzymu pro restriční štěpení PCR fragmentu genu SOD1	41
4.7.3	Amplifikace fragmentů genu SOD1 pomocí PCR-RFLP	41
4.7.4	Restriční štěpení PCR fragmentu genu SOD1.....	42
4.8	Detekce kauzální mutace genu DNMI vedoucí k EIC u psů pomocí PCR-RFLP	43
4.8.1	Navržení PCR-RFLP markeru mutace genu DNMI	43
4.8.2	Výběr enzymu pro restriční štěpení PCR fragmentu genu DNMI	44
4.8.3	Amplifikace fragmentu genu DNMI pomocí PCR-RFLP.....	45
4.8.4	Restriční štěpení PCR fragmentu genu DNMI	46
4.9	Vyhodnocení frekvencí mutovaných a nemutovaných alel genů SOD1 a DNMI z pohledu populační genetiky	46
4.9.1	Pozorovaná heterozygotnost – H_O	46
4.9.2	Očekávaná heterozygotnost – H_E	47
4.9.3	Stupeň inbreedingu – F_{IS}	47

4.9.4	Simulace dopadu úplné selekce proti homozygotním jedincům nesoucím mutované alely genů SOD1 a DNM1	47
5.	VÝSLEDKY	48
5.1	Variabilita sekvencí genů SOD1 a DNM1 stanovená na základě pyrosekvenace	48
5.1.1	Polymorfismy nalezené v pyrosekvenované části genu SOD1	48
5.1.2	Polymorfismy nalezené v pyrosekvenované části genu DNM1	53
5.2	Haplotypy vyplývající z pyrosekvenace genů SOD1 a DNM1	60
5.2.1	Haplotypy genu SOD1	60
5.2.2	Haplotypy genu DNM1	61
5.2.3	Charakterizace aminokyselin kódovaných haplotypy genů SOD1 a DNM1	62
5.3	Hodnocení variability pyrosekvenovaných částí genu SOD1 a DNM1 pomocí kladogramů	65
5.3.1	Kladogramy zpracované na základě sekvencí částí genu SOD1	65
5.3.2	Kladogramy zpracované na základě sekvencí částí genu DNM1	68
5.4	Kauzální mutace genu SOD1 způsobující DM	71
5.4.1	Detekované alely PCR-RFLP markeru genu SOD1	71
5.4.2	Frekvence výskytu mutovaných alel genu SOD1 v modelových populacích psů a jejich hodnocení z hlediska populační genetiky	72
5.5	Kauzální mutace genu DNM1 způsobující EIC	74
5.5.1	Detekované alely PCR-RFLP markeru genu DNM1	74
5.5.2	Frekvence výskytu mutovaných alel genu DNM1 v modelových populacích psů a jejich hodnocení z hlediska populační genetiky	75
6.	DISKUZE	77
6.1	Volba modelových plemen zahrnutých do experimentů	77
6.1.1	Volba modelových plemen pro studium kauzální mutace genu SOD1	77
6.1.2	Volba modelových plemen pro studium kauzální mutace genu DNM1	78
6.2	Analýzy studovaných genů pomocí pyrosekvenace	79

6.2.1	Analýzy genu SOD1 pomocí pyrosekvenace	79
6.2.2	Analýzy genu DNMI pomocí pyrosekvenace.....	80
6.3	Analýzy studovaných genů pomocí kladogramů.....	80
6.4	Analýzy studovaných genů pomocí PCR-RFLP	81
6.4.1	Analýzy genu SOD1 pomocí PCR-RFLP	81
6.4.2	Analýzy genu DNMI pomocí PCR-RFLP.....	82
6.5	Analýzy studovaných genů pomocí metod populační genetiky	82
6.5.1	Analýzy genu SOD1 pomocí metod populační genetiky	82
6.5.2	Analýzy genu DNMI pomocí metod populační genetiky.....	83
7.	ZÁVĚR.....	85
8.	SEZNAM LITERATURY	87
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	97
10.	PŘÍLOHY	100

Seznam příloh

Příloha 1: Schéma pyrosekvenování

Příloha 2: Pufry a roztoky použité při elektroforetické separaci

1. ÚVOD

Dnes je známo více než 400 různých plemen psů. Jak roste zájem o jejich chov, šlechtění a využití v rozličných oblastech lidského života, roste však i množství onemocnění, která psy postihují, ať už se jedná o nemoci civilizační nebo geneticky podmíněné. V řízeném chovu totiž většinou neprobíhá přirozená selekce a některé mutované alely genů se tak mohou v populaci daného plemene stále udržovat. Proto je velmi důležité provádět genetické testy pro tato onemocnění, a tím odlišit jedince nesoucí mutovanou alelu.

Jedním z geneticky podmíněných onemocnění u psů je degenerativní myelopatie. Toto progresivní onemocnění způsobuje ztrátu koordinace a následně celkovou neschopnost pohybu psa. Nemoc je v současné době neléčitelná. Degenerativní myelopatie je velice podobná neurodegenerativnímu onemocnění člověka nazývanému amyotrofická laterální skleróza, a to jak z hlediska projevů, tak i na molekulární úrovni. Proto byl pes zvolen jako modelový organismus pro studium tohoto onemocnění.

Syndrom výcvikového kolapsu u psů je také podmíněn geneticky a je rozšířen především v populacích velice oblíbeného plemene labradorský retriever.

Obě tato onemocnění jsou způsobena jednonukleotidovým polymorfismem, v případě degenerativní myelopatie substitucí v exonu 2 genu SOD1 a u výcvikového kolapsu se jedná o mutaci v exonu 6 genu DNMT1.

2. VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

2.1 Vědecké hypotézy

Na začátku řešení diplomové práce byly vysloveny následující vědecké hypotézy:

- 1) Onemocnění psů degenerativní myelopatie a výcvikový kolaps patří do skupiny geneticky podmíněných chorob s autozomálně recesivní dědičností. Byly identifikovány geny SOD1 a DNMI, ve kterých se vyskytují kauzální mutace těchto onemocnění.
- 2) V kódujících částech obou studovaných genů se mohou vyskytovat další mutace typu substituce, delece nebo inserce. Teoreticky je možné předpokládat, že vyšší frekvence mutací se bude vyskytovat v nekódujících (intronových) sekvencích obou studovaných genů.
- 3) Pomocí molekulárních technik založených na amplifikaci dlouhých fragmentů lze získat dostatečné množství kopií celých genů nebo jejich částí, které se dají použít jako vstupní molekuly DNA pro pyrosekvenování.
- 4) Technika pyrosekvenování 454/Roche umožňuje vytvořit knihovnu DNA obsahující fragmenty genů pocházející z většího počtu jedinců, které lze vzájemně odlišit pomocí adapterů (MID sekvencí).
- 5) Jedna ze strategií 454/Roche pyrosekvenace je založena na porovnávání získaných sekvencí se sekvencí referenčních genotypů, které jsou dostupné v mezinárodních nukleotidových databázích.
- 6) Pokud kauzální mutace způsobí takovou změnu nukleotidové sekvence, která vede ke vzniku nebo zániku palindromu pro konkrétní restriční endonukleázu, lze navrhnout PCR-RFLP markery, umožňující rychlé a přesné genetické testy velkých populací.
- 7) PCR-RFLP markery vykazující kodominantní charakter umožňují odlišit oba dva typy homozygotů a heterozygoty. Získané informace o frekvencích genotypů a alel lze využít k populačně genetickým analýzám.

2.2 Cíle práce

Vlastní cíle diplomové práce jsou zaměřeny na realizaci a vyhodnocení experimentů, které povedou k ověření platnosti výše uvedených hypotéz. Tyto cíle jsou vyjádřeny v následujících bodech:

- 1) Oslovení chovatelů psů vybraných plemen se zájmem o anonymní testování jedinců z hlediska výskytu mutací genů SOD1 a DNMI. Získání výchozího biologického materiálu nezbytného pro izolaci genomické DNA.
- 2) Navržení specifických primerových párů, které ohraničují gen SOD1 a část genu DNMI s předpokládaným výskytem exonu s kauzální mutací.
- 3) Amplifikace PCR produktů obou genů určených k pyrosekvenaci, jejich izolace a čištění po gelové elektroforéze.
- 4) Pyrosekvenování ampliconů genů SOD1 a DNMI.
 - a. Tvorba knihovny DNA určená k pyrosekvenování.
 - b. Emulzní PCR.
 - c. Vlastní sekvenace.
 - d. Zpracování výstupních dat, výběr a filtrování nalezených polymorfismů.
- 5) Bioinformatické vyhodnocení nalezených mutací v exonových a intronových částech genů SOD1 a DNMI.
- 6) Simulace translace kódujících částí studovaných genů a stanovení aminokyselinových sekvencí.
- 7) Identifikace haplotypů u studovaných genů a vyhodnocení jejich podobnosti pomocí kladogramů.
- 8) Aplikace PCR-RFLP markerů kauzálních mutací genů SOD1 a DNMI u vybraných modelových populací různých plemen psů.
- 9) Vyhodnocení výsledků PCR-RFLP analýz z hlediska populační genetiky.

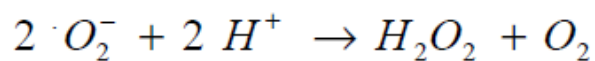
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Superoxid dismutázy – SOD

Superoxid dismutázy (SOD) patří mezi metaloenzymy, což jsou enzymy, v jejichž struktuře je zabudován kovový prvek. SOD fungují jako obranný systém proti reaktivním formám kyslíku (ROS – reactive oxygen species), které přeměňují na méně škodlivé látky a chrání tak organismus před oxidačním stresem (Fridovich, 1995; Zelko et al., 2002). Jsou totiž schopny převádět volný superoxidový radikál (O_2^-) na peroxid vodíku (H_2O_2) a molekulární kyslík (O_2) (Fridovich, 1995). Tato reakce je znázorněna na obrázku 1.

Obrázek 1: Přeměna superoxidového radikálu na peroxid vodíku a kyslík.

(upraveno podle McCord a Fridovich, 1969)



V aktivním místě dismutáz se z iontů kovů může nacházet mangan (Mn-SOD), měď a zinek (Cu/Zn-SOD) nebo železo (Fe-SOD). Dále se superoxid dismutázy dělí na tři formy. První forma SOD1 je homodimerický enzym označovaný jako Cu/Zn-SOD, který se nachází v buněčné cytoplazmě. SOD2 neboli také mangan obsahující superoxid dismutáza (Mn-SOD) je tetramer, nacházející se převážně v mitochondriích a některých bakteriích (*Escherichia coli*). Enzym SOD3 je taktéž tetramer, který se vyskytuje v extracelulárním prostoru a ve svém aktivním místě obsahuje měď a zinek. Tato třetí forma se také označuje jako EC-SOD (Zelko et al., 2002; Coates et al., 2009).

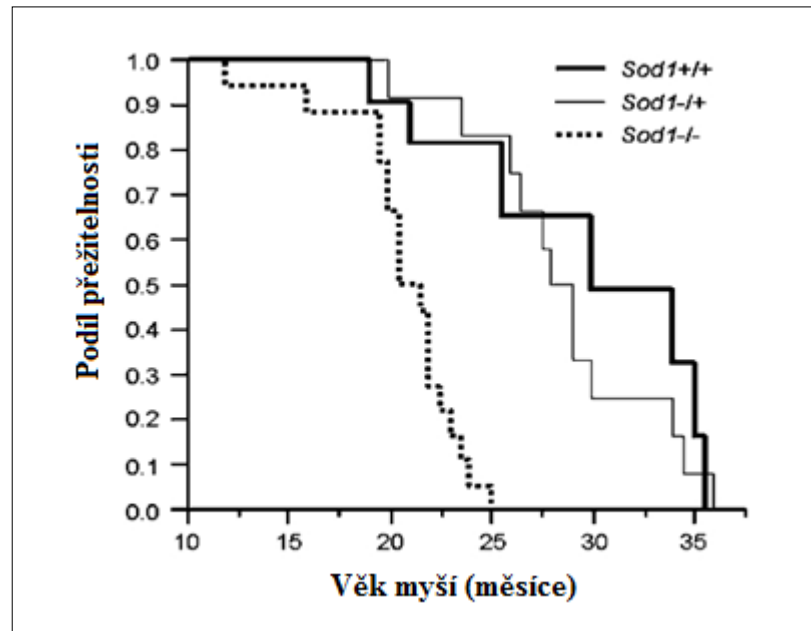
Jak prokázala studie Elchuri et al. (2005), pro správnou funkci organismu a životaschopnost jedince je důležité, aby proběhla exprese genů SOD. V této studii byla porovnávána délka života myši s plně exprimovaným genem SOD1 oproti myším, kterým byl proveden knock-out tohoto genu. Rozdíly jsou znázorněny na obrázku 2.

Pokud je provedeno vyblokování genů SOD, neprobíhá jejich exprese, a tím pádem chybí enzym, který by vylučoval volné superoxidové radikály. Ty potom významně poškozují buněčné struktury a celkově narušují homeostázu organismu. Jak uvádějí Elchuri et al. (2005), myším s neexprimovaným SOD1 se výrazně snížila délka života a objevily se jim

hepatocelulární karcinomy. Degenerativní změny u myši probíhaly i v cytoplazmě buněk, v jejich jádrech a v mitochondriích (Elchuri et al., 2005).

Obrázek 2: Porovnání délky života myši v závislosti na expresi genu SOD1.

(upraveno podle Elchuri et al., 2005)



Vysvětlivky: Myši s plně exprimovaným genem SOD1 (*SOD1+/+*) přežívají mnohem déle oproti myším, které mají vyblokovanou buď jednu alelu (*SOD1-/+*), nebo obě dvě (*SOD1-/-*).

K poškození organismu nemusí docházet pouze při vyblokování všech genů pro SOD enzymy, například pokud byl inaktivován pouze gen SOD2, dochází k odumírání myších plodů v matčině děloze (Coates et al., 2009).

Naproti tomu se ukázalo, že zvýšená exprese genů SOD je organismu prospěšná. Dala by se využívat například při potlačování růstu nádorů. Nádorové buňky mají totiž sníženou enzymatickou aktivitu proteinu SOD1 i SOD2. Pokud se tedy tyto geny exprimují ve zvýšené míře, vzniká tak více proteinů, a tvorba nádorů i metastáz se tím pádem snižuje (Oberley, 2001).

3.1.1 Lokalizace genů SOD

Geny pro lidské superoxid dismutázy jsou lokalizovány na q raménku chromozomu 21 (*SOD1*) (Rosen et al., 1993), q raménku chromozomu 6 (*SOD2*) a na p raménku chromozomu 4 (*SOD3*) (Coates et al., 2009). V souvislosti s výskytem trizomie chromozomu 21, která způsobuje Downův syndrom, byl gen *SOD1* u lidí blíže studován. Jak uvádí Zelko et al. (2002), u pacientů s Downovým syndromem bylo prokázáno zvýšené množství proteinu

SOD1, a to až o 50 %. Pokud se v jejich genomu vyskytují tři kopie chromozomu 21, projevuje se zde takzvaný efekt dávky genu a s tím spojená jeho zvýšená exprese, s čímž souvisí větší množství proteinu a více probíhajících enzymatických reakcí. Avšak role tohoto enzymu v patologii onemocnění Downova syndromu je stále nedostatečně objasněna.

Podrobnější charakteristiky SOD1 u psa budou popsány v následujících kapitolách.

3.2 Superoxid dismutáza 1 – SOD1

Superoxid dismutáza 1 je velmi stálý homodimerický metaloenzym, který ve svém aktivním centru obsahuje ion mědi a ion zinku (Stathopoulos et al., 2003). Pro správnou funkci enzymu je nutná schopnost měď z aktivního centra reverzibilně odstraňovat (McCord a Fridovich, 1969).

3.2.1 Enzymatická aktivita SOD1

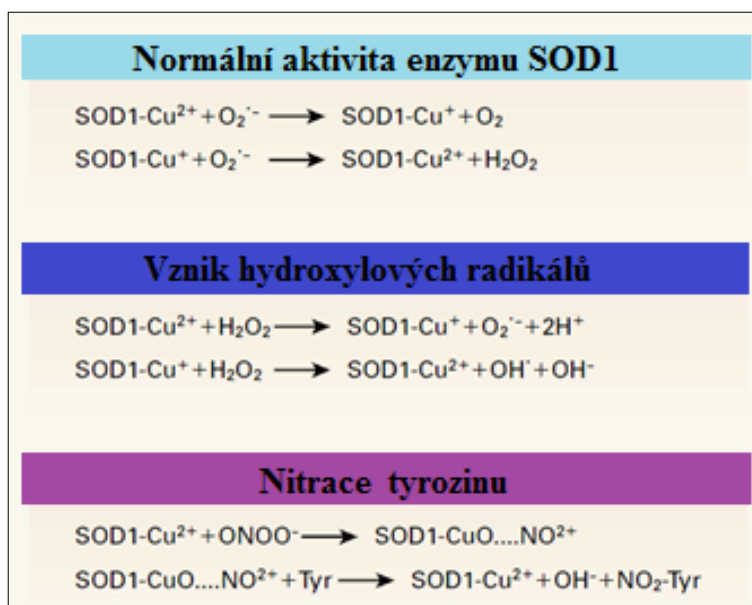
Protein SOD1 v organismu funguje jako enzym, ovšem zprvu mu enzymatická aktivita nebyla přisuzována. Jeho funkce byla objasněna teprve před 45 lety v práci McCorda a Fridoviche (1969). Tehdy izolovali SOD1 z bovinních erytrocytů a určili, že je identický s dříve popsaným lidským erytrocupreinem a bovinním hemocupreinem, o kterých se však dříve nevědělo, že fungují jako důležité enzymy.

Enzym SOD1 katalyzuje přeměnu superoxidových radikálů na peroxid vodíku a kyslík. Zabraňuje také vzniku peroxynitritu (ONOO^-), protože ten vzniká reakcí volných superoxidových radikálů a oxidu dusnatého (NO). Volné superoxidové radikály mají totiž vysokou afinitu a vysokou reakční rychlost pro napojení se na oxid dusnatý za vzniku peroxynitritu (Coates et al., 2009), což může vést k nitraci tyrozinových zbytků v proteinech (Rowland a Shneider, 2001). Peroxynitrit působí jako oxidační a nitrační činidlo a svými cytotoxickými účinky poškozuje biomolekuly v buňce, a to i DNA a bílkoviny. Pokud tedy SOD1 přeměňuje vznikající volné superoxidové radikály, přichází oxid dusnatý o svůj reakční substrát a ke vzniku toxického peroxynitritu nedojde.

Vlivem mutací v genu SOD1 může dojít ke změně struktury enzymu a tím i ke změně jeho funkce. V některých případech pak tento strukturně odlišný enzym umožňuje vznik peroxidů a tvorbu hydroxylových radikálů ($\text{OH}\cdot$), a může tak i katalyzovat již zmiňovanou nitraci tyrozinu (Rowland a Shneider, 2001), jak je znázorněno na obrázku 3.

Obrázek 3: Reakce probíhající za účasti enzymu SOD1.

(upraveno podle Rowland a Shneider, 2001)



Vysvětlivky: Antioxidační aktivita SOD1 je zobrazena na prvních dvou reakcích. Mutace v SOD1 může vést k produkci hydroxylových radikálů, jak je patrné ze třetí a čtvrté reakce. Na posledních dvou rovnicích je znázorněn případ, kdy dochází k nitraci tyrozinu.

Strukturně odlišný enzym SOD nejenže katalyzuje tyto zpětné reakce, ale může být také narušena jeho stabilita, a takto poškozené proteiny se pak hromadí v organismu a tvoří agregáty, což výrazně narušuje jejich původní oxidačně redukční funkce (Shaw a Valentine, 2007). Jinak se proteiny SOD1 za normálních okolností nacházejí v cytosolu, jádře a v mezimembránovém prostoru mitochondrií (Battistini et al., 2012).

3.2.2 Struktura a lokalizace genu SOD1

SOD1 je poměrně malý gen tvořený pěti krátkými exony, mezi které jsou vloženy čtyři introny. Tato struktura nevykazuje významné rozdíly napříč živočišnými druhy (Green et al., 2002; Battistini et al., 2012).

Na 5' konci byly popsány TATA a CCAAT boxy a také vysoce konzervativní oblasti s opakujícím se nukleotidovým motivem GC (Zelko et al., 2002).

Gen SOD1 se u skotu nachází na chromozomu 1, u myši na chromozomu 16 (Zelko et al., 2002) a u lidí, jak již bylo zmíněno, na chromozomu 21 (Rosen et al., 1993).

Aminokyselinové a nukleotidové sekvenční podobnosti SOD1 mezi různými živočišnými druhy v porovnání se psem jsou znázorněny na obrázku 4.

Obrázek 4: Sekvenční podobnosti SOD1 mezi psem a ostatními živočišnými druhy.

(upraveno podle Green et al., 2002)

	Skot	Člověk	Kůň	Prase	Krysa	Myš
Pes (nukleotidy)	93	84	90	85	84	84
Pes (aminokyseliny)	82	79	75	83	83	83

Vysvětlivky: Čísla uvádějí podobnost v procentech.

3.2.3 Gen SOD1 psa (*Canis lupus familiaris* L.)

Gen SOD1 psa domácího (*Canis lupus familiaris* L.) byl lokalizován na autozomálním chromozomu 31 (CFA31). Mapování genomu s cílem určit pozici genu SOD1 prováděli Awano et al. (2009) pomocí celogenomové asociační studie (GWAs) a popsali tak společný haplotyp, který dosahoval délky 0,76 Mb a obsahoval tři geny – SOD1, TIAM1 a SFRS15.

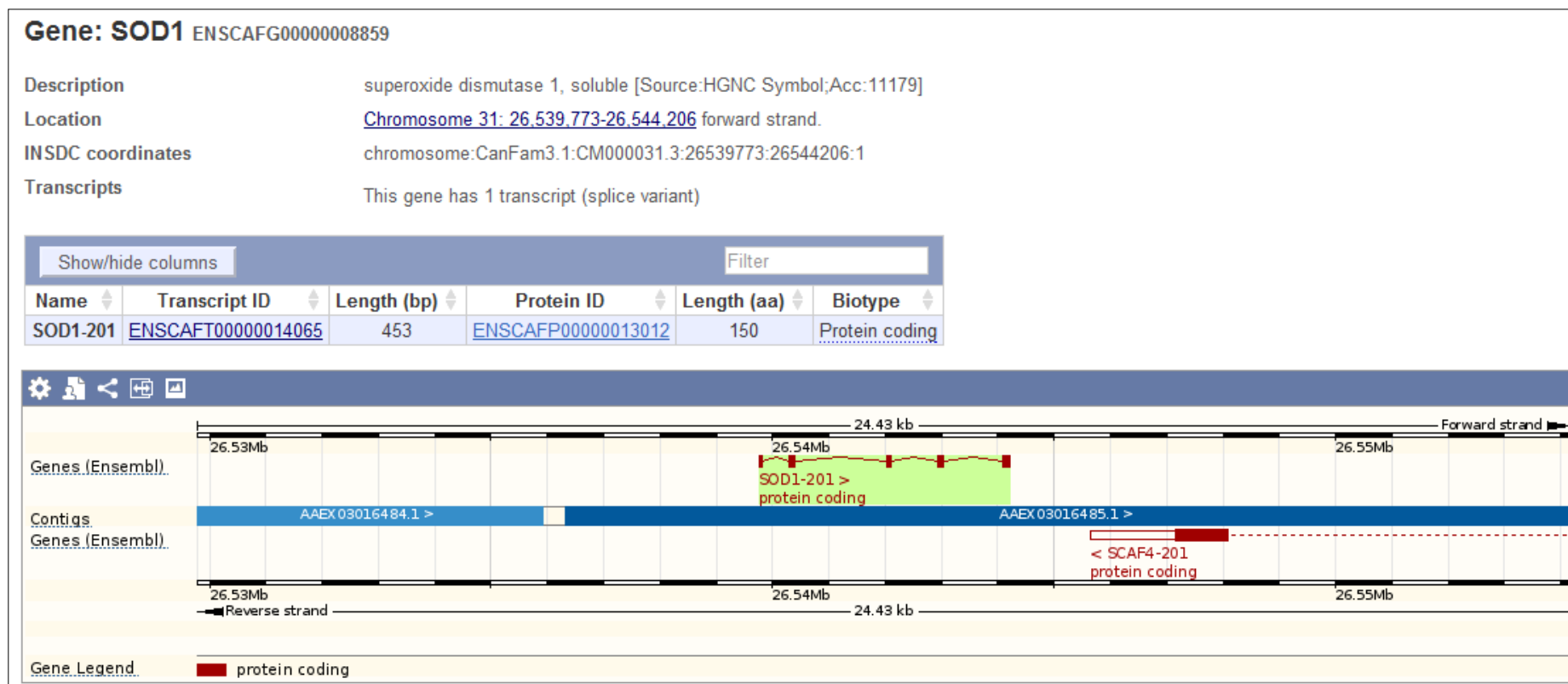
Výsledky této studie se shodují se staršími výzkumy, kde byla pozice genu určována na radiačně hybridním panelu (RH mapě) (Green et al., 2002). Gen SOD1 je tedy lokalizován na CFA31, blízko syntenní skupiny 13, kterou taktéž na RH mapě psiho genomu popsali Mellersh et al. (2000).

Počet párů bází kódující části psiho genu SOD1 nebyl ještě přesně určen, zdroje se v uváděném počtu liší, stejně tak jako v uváděné délce výsledné aminokyselinové sekvence. Green et al. (2002) tvrdí, že exony genu SOD1 dohromady obsahují 462 bp a že gen kóduje 153 aminokyselin (AA – amino acid). Stejný počet aminokyselin uvádí i internetová databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), avšak počet párů bází je zde rozdílný, a to 474 bp. Naproti tomu databáze Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) uvádí u psiho genu SOD1 453 bp a 150 vznikajících AA.

K přesné lokalizaci genu SOD1 přispěla kompletní sekvenace psiho genomu, kterou publikovali Lindblad-Toh et al. (2005). Tato sekvence je dostupná v několika bioinformatických databázích na internetu. Při řešení diplomové práce byly informace o psím genomu čerpány z datábase GenBank a z databáze Ensembl. Struktura genu SOD1 u psa je uvedena na obrázku 5 a charakterizace jeho jednotlivých částí je znázorněna na obrázku 6.

Obrázek 5: Struktura genu SOD1 u psa domácího.

(upraveno podle databáze Ensembl)



<http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00000008859;r=31:2653977326544206;t=ENSCAFT00000014065>

Obrázek 6: Charakteristika jednotlivých částí genu SOD1 u psa domácího.

(upraveno podle Green et al., 2002)

	A	B	C	D	E	F
	sekvence intronu 3'	sekvence exonu 5'	sekvence exonu 3'	sekvence intronu 5'	velikost exonu (bp)	číslo intronu: velikost (kb)
Exon 1	— ^c	ATGGAGATGA	CGTGCAGAAG	— ^c	72	1:— ^c
Exon 2	— ^c	GGAAGTGGGC	AATACACAAG	gtggggtggt *** *	94	2:2.5
Exon 3	gggcaaatag * **	GCTGTACTAG	ATCAAGAGAG	gtaagtgaca *****	70	3:1.0
Exon 4	tcactgttag * * * * *	GCATGTTGGA	CACCATGGTG	gtgagtttca *****	118	4:1.2
Exon 5	ctttttaaag ***** *	GTCCACGAGA	GATCGCCCAA	NA ^b	108	— ^c

Vysvětlivky: Každý řádek reprezentuje jeden exon. Sloupec A označuje počáteční sekvence intronu 3' tam, kde byla data vypovídající. Sloupec B zobrazuje prvních deset nukleotidů z každého exonu. Ve sloupci C je znázorněno posledních deset nukleotidů každého exonu. Ze sloupce D je patrna sekvence prvních deseti nukleotidů jednotlivých intronů. Sloupec E uvádí počet párů bází jednotlivých exonů a sloupec F velikost intronů v kilobázích. Hvězdičky označují konsensus sekvence pro sestřih. Symbol —^c značí skutečnost, že data nebyla dostupná.

3.3 Degenerativní myelopatie – DM

Degenerativní myelopatie (DM) byla poprvé popsána D. R. Averillem v roce 1973. V některých starších studiích je DM označována jako radikulomyelopatie (Griffiths a Duncan, 1975), myelopatie německých ovčáků (German Shepherd Dog myelopathy – Braund a Vandavelde, 1978) nebo progresivní myelopatie (Waxman et al., 1980).

Je to závažné progresivní neurologické onemocnění, postihující míchu a způsobující až úplnou neschopnost pohybu psa (Coates et al., 2009).

Nemoc se klinicky manifestuje až v pozdně dospělém věku psa, hranice pro objevení prvních příznaků však nebyla přesně určena. Barclay a Haines (1994) uvádějí počátky onemocnění ve věku od pěti do čtrnácti let psa, s průměrným věkem nástupu v devíti letech, což se shoduje se studií Kathmann et al. (2006). Coates et al. (2009) určil věk nástupu mezi sedmým a čtrnáctým rokem života a Awano et al. (2009) uvádí nástup prvních příznaků od osmého roku výše.

Degenerativní myelopatie je nemoc smrtelná, jelikož neexistuje účinná léčba. Uvádí se, že doba od rozpoznání prvních projevů do smrti psa se pohybuje okolo tří let. Nicméně majitelé většinou nechají provést eutanázii psa dříve, než nastanou poslední stádia nemoci, a to nejčastěji pokud už je pes paraplegický a nemůže se postavit na zadní nohy (Awano et al., 2009; Coates a Wininger, 2010).

3.3.1 Projevy DM

Projevy DM se liší podle rozsahu postižení, podle stupně prováděné rehabilitace a byl popsán i mírný vliv plemenné příslušnosti (Kathmann et al., 2006).

V počátečních stádiích lze pozorovat proprioceptivní ataxii (neschopnost koordinace pohybu) a mírnou paraparézu, kdy částečně ochrnou pánevní končetiny, ve kterých mohou být nedostatečné reflexy způsobené poruchou horních i dolních motorických neuronů (poruchy UMN – upper motor neuron, poruchy LMN – lower motor neuron) (Kathmann et al., 2006; Coates a Wininger, 2010). Kathmann et al. (2006) dále popisují případy hypermetrie v zadních končetinách, což je druh hyperkinézy, kdy je narušena souhra antagonistických svalů. Pes tak není schopen plně ovládat pánevní končetiny a při pohybu je pouze tahá za sebou, čímž se opotřebují drápy a může do nich proniknout infekce (Griffiths a Duncan, 1975).

Vlivem neschopnosti ovládat svaly v zadní polovině těla, dochází v pozdějších stádiích k inkontinenci i k neschopnosti ovládat defekaci. Postupně projevy přecházejí i na přední končetiny a objevuje se tetraparéza (Awano et al., 2009). Pes se již není schopen postavit a v podstatě se hýbat, s čímž souvisí úbytek svalové hmoty, ztráty hmotnosti a tvorba proleženin. V posledních stádiích dochází k degeneraci míchy v krčních míšních segmentech, a to způsobí ochabnutí polykacích svalů, neschopnosti pít a kousat potravu a ochabují i dýchací svaly, což vede ke smrti zvířete (Coates et al., 2009; Coates a Wininger, 2010).

Ve většině případů to zodpovědní majitelé psa trpícího degenerativní myelopatií nenechají zajít takto daleko a volí humánnější cestu, kterou je eutanázie psa u veterinárního lékaře v dřívějších stádiích nemoci (Coates et al., 2009). Vzhledem k tomu, že dosud neexistuje účinný lék, ani není jiné východisko.

3.3.2 Výskyt DM u psů

Ačkoli je degenerativní myelopatie nejčastěji zmiňována v souvislosti s německým ovčákem, postihuje mnohem více čistokrevných plemen i kříženců. Objevuje se spíše u velkých plemen psů, jak tvrdí Shelton et al. (2012), kteří ve své studii dále uvádějí domněnku, že častější výskyt u těchto plemen je způsoben tím, že mají delší periferní nervy, a tak i větší prostor pro manifestaci nemoci.

Kathmann et al. (2006) provedli studii o vlivu plemenné příslušnosti na propuknutí degenerativní myelopatie. Prokázali statisticky signifikantní plemennou predispozici

na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro německé ovčáky, kuvasze, hovawarty a bernské salašnické psy.

Nejvíce testovaným plemenem je již zmiňovaný německý ovčák (Averill, 1973; Braund a Vandeveld, 1978; Waxman et al., 1980). Nicméně DM postihuje mnoho dalších plemen, a to plemena belgický ovčák, velký knírač, barzoi, soft-coated wheaten terier, anglický mastif, německý boxer, chesapeake bay retriever, rhodeský ridgeback, kerry blue terier, irský setr, bernský salašnický pes a pravděpodobně se DM objevila i u plemene sibiřský husky (Kathmann et al., 2006; Miller et al., 2009; Awano et al., 2009; Shelton et al., 2012; Coates et al., 2009; Wininger et al., 2011; Bichsel et al., 1983).

Ani malá plemena psů však nejsou ušetřena výskytu degenerativní myelopatie. Jak prokázali March et al. (2009) a později i Shelton et al. (2012), postiženo je i plemeno welsh corgi pembroke. Coates et al. (2007) provedl také studii na tomto plemeni a kromě prokázání výskytu onemocnění u testovaných jedinců zmiňuje, že i když projevy a komplikace DM byly shodné jako u velkých plemen, nemoc u plemene welsh corgi měla delší trvání. Eutanázie byla prováděna průměrně až za 19 měsíců od projevení prvních příznaků, přičemž psi byli stále v mírnějších stádiích nemoci. Tuto hypotézu potvrzuje i starší práce Matthewse a Lahunty (1985), ve které zkoumali projevy degenerativní myelopatie na miniaturních pudlech a shodně uvádějí, že nemoc postupovala pomaleji než ve srovnání s velkými plemeny. Přesto dodávají, že výsledná paralýza postižených jedinců byla rozsáhlejší než je běžné v populaci velkých plemen psů.

Coates et al. (2009) se domnívají, že pomalejší projevy nemoci u malých plemen jsou způsobeny tím, že jejich majitelé je nenechají tak často chodit a namáhat se, pokud už paralýza končetin značně postoupila a jsou je ochotni (respektive schopni) nosit v náručí. Dále udávají, že při výskytu DM u malých plemen se proto zvyšuje věk při provedení eutanázie, protože ji majitelé z těchto uvedených důvodů často odkládají (Coates et al., 2009). Zde je ale důležité zvážit i etické problémy, zdali je tento způsob života vhodný a uspokojivý i pro psa.

Degenerativní myelopatie se projevuje nejen u výše popsaných plemen, ale i u jejich kříženců, protože je to nemoc podmíněná geneticky a přenáší se tak na potomstvo. Vzhledem k tomu, že je DM onemocnění, které se projevuje v tak pozdním věku psa, je to z hlediska chovu velice závažný problém. Pokud se vezme v úvahu, že průměrný věk, kdy jsou zaznamenány první příznaky, je zhruba 9 let, pes (respektive fena) už v té době může mít mnoho potomků a onemocnění se tak v populaci dále šíří. Proto jsou důležité genetické testy pro výskyt DM, aby se postižení jedinci odhalili co nejdříve a dále se v chovu nevyužívali.

Že však onemocnění není plně penetrující a ani u jedince homozygotního v mutovaném genu se nemusí projevit, bude vysvětleno v další kapitole diplomové práce.

Je potřeba brát také v potaz, že mezi významné faktory, které mohou ovlivnit výskyt nemoci, patří i hmotnost psa, jeho pracovní zatížení, výživa a celkový zdravotní a metabolický stav, protože, jak uvádí Wininger et al. (2011), patogeneze degenerativní myelopatie je velmi komplexní.

Na propuknutí nemoci ovšem nemá vliv pohlaví jedince, vyskytuje se jak u psů, tak i u fen (Kathmann et al., 2006; Awano et al., 2009).

3.3.3 Genetická podstata DM

Degenerativní myelopatie je spojována s mutací genu SOD1, jak objasnili Awano et al. (2009). Charakterizovali bodovou mutaci, která způsobuje tranzici dusíkaté báze guaninu za adenin na pozici 118 v exonu 2 (c.118G>A). Tato mutace způsobuje změnu aminokyselinové sekvence na pozici E40K, tedy nahrazení kyseliny glutamové lysinem. U člověka je podobná mutace na pozici E40G, která je spojována s lidskou amyotrofičnou laterální sklerózou (Deng et al., 1993) a vzhledem k tomu, že i v klinických projevech je toto onemocnění velice podobné degenerativní myelopatii, byl za kandidátní gen určen právě gen SOD1 (Awano et al., 2009).

Pro kontrolu lokalizace mutace způsobující DM, zmapovali Awano et al. (2009) 90 SNP (single nucleotide polymorphism – jednonukleotidový polymorfismus) v oblasti od 29,04 Mb do 30,97 Mb u pěti plemen psů. Bylo prokázáno, že se u všech testovaných psů, kteří trpěli degenerativní myelopatií, objevoval společný haplotyp 5-SNP, který obsahoval mutaci na pozici c118G>A. Přesto se ale tento haplotyp vyskytoval i u zdravých jedinců. Nicméně i tak se dá s určitostí říci, že je mutace v aminokyselinové sekvenci E40K spojena s degenerativní myelopatií (Awano et al., 2009).

Degenerativní myelopatie je autozomálně recesivní onemocnění s neúplnou penetrací. Znamená to, že se nemoc projeví u jedinců s recesivně homozygotní kombinací alel, kde je guanin nahrazen adeninem v pozici 118 (genotyp A/A) (Awano et al., 2009). Někde se tento genotyp označuje ne jako adenin/adenin, ale jako mutovaná kombinace alel abnormal/abnormal (taktéž A/A). V chovatelských kruzích se často uvádí označení DM/DM pro nemocného jedince. Nicméně jak prokazuje studie Awano et al. (2009), skutečnost, že je pes recesivní homozygot v tomto genu, ještě neznamená, že se u něj nemoc musí projevit. Vloha je, jak již bylo zmiňováno, neúplně penetrující a vše je závislé na věku psa, jeho

genetickém pozadí a dalších vnějších faktorech, které již byly popsány v předchozích kapitolách.

Jedinci, kteří mají zmutovanou pouze jednu alelu genu SOD1, jsou heterozygoti (G/A) a nemoc se u nich sice klinicky neprojeví, ale přenášejí vlohu k onemocnění skrze své potomky do populace (Awano et al., 2009). Je tedy důležité, aby bylo brzy odhaleno, že jsou přenašeči onemocnění (carrier), a dále se v chovu nevyužívali. Existuje však možnost je připravit s dominantními homozygoty (clear; free). Pro heterozygoty v genu SOD1 se také používá označení N/A jako normal/abnormal nebo N/DM (normal/degenerative myelopathy).

Psi, u kterých je velmi nepravděpodobný projev nemoci, jsou dominantní homozygoti s genotypem G/G, mající obě alely nemutované (Awano et al., 2009). Mohou se označovat také jako N/N (normal/normal).

Wininger et al. (2011) popsali novou mutaci, která je také spojována s výskytem DM. Je to transice adeninu za thymin na pozici 52. nukleotidu (c.52A>T), která způsobí změnu v aminokyselinové sekvenci na pozici 18, a to záměnu threoninu za serin (T18S).

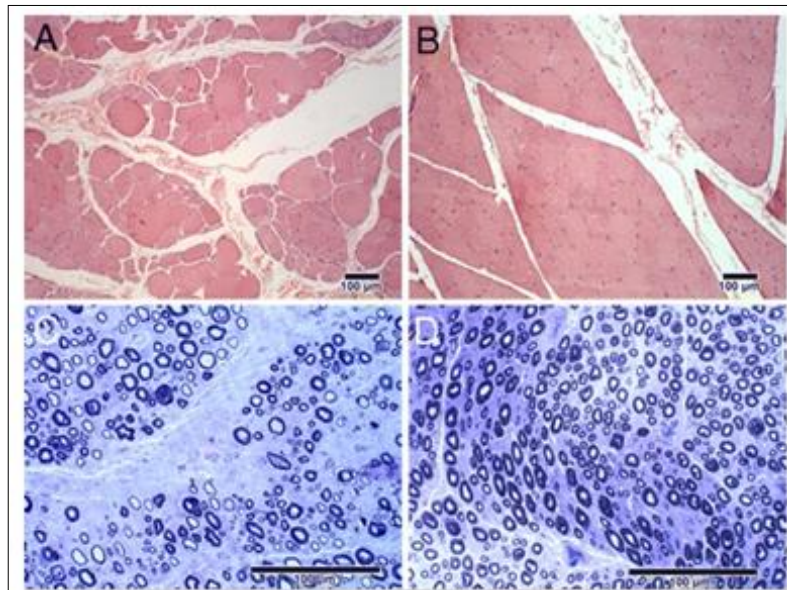
3.3.4 Diagnostika DM

Pro přímou a jednoznačnou diagnostiku degenerativní myelopatie *ante mortem* dnes neexistuje žádná odpovídající metoda. S určitostí lze DM prokázat až při histopatologickém rozboru míchy (Coates et al., 2009). I když jsou právě genetické testy velice nápomocné v diagnostice před utrácením zvířete, musí se brát v úvahu neúplná penetrance tohoto recesivně homozygotního onemocnění.

Nejvíce degenerativních změn míchy se dá pozorovat v páteřním sektoru T3 (dolní krční sektor) až po L3 (horní bederní sektor), což bylo prokázáno u 56 % (28 testovaných psů), jak uvádí Kathmann et al. (2006). Ze 44 % (u 22 psů) postihovaly degenerativní změny páteřní sektor L3 až po S3 (sektor křížové kosti).

Ve starších studiích (Averill, 1973; Griffiths a Duncan, 1975) je uvedeno, že degenerativní myelopatie se manifestuje na ascendentních (vzestupných) a descendentních (sestupných) míšních drahách, ale ne na periferních nervech. Ovšem novější objevy (Awano et al., 2009; Shelton et al., 2012) na základě histopatologických rozborů dokazují, že se dají degenerativní změny diagnostikovat nejenom na míše, ale i na motorických neuronech, axonech a ve svalových vláknech, jak je patrné z obrázku 7.

Obrázek 7: Porovnání histopatologických vzorků kosterního svalu a periferního nervu mezi zdravým psem a psem, který trpěl degenerativní myelopatií.
(upraveno podle Awano et al., 2009)



Vysvětlivky: Vzorky (A) a (B) jsou obarveny hematoxylinem a eosinem, vzorky (C) a (D) jsou barveny modrým toluidinem. (A) – vzorek svalu třináctiletého psa trpícího DM; velká variabilita velikosti myofibril, atrofické myofibrily, denervace svalu. (B) – stejný sval z kontrolního zdravého třináctiletého psa. (C) – periferní nerv ze stejného psa jako v případě (A); demyelinizace fibril, endoneurální fibróza. (D) – vzorek periferního nervu ze stejného zdravého psa jako v případě (B).

Dále je na histopatologických rozbořech, jak popisují Wininger et al. (2011), zřejmá vakuolizace myelinových pochev, degradované (i úplně zaniklé) axony i astrocyty. Míšní bílá hmota má díky kruhovým eozinofilním granulám houbovitý charakter (Barclay a Haines, 1994), který byl popsán i na axonech (March et al., 2009).

Před jednoznačným přijetím diagnózy degenerativní myelopatie je třeba vyloučit všechna ostatní onemocnění, která mohou mít podobné příznaky. Jakékoli poškození páteřního kanálu, ať už se jedná o výhřez ploténky, pohmoždění nebo rupturu, má za následek kompresi míchy se stejnými projevy jako při onemocnění DM (Coates et al., 2009). Pro tato přídatná vyšetření s cílem vyloučit jiné komplikace, se používá několik metod doporučených ve studii Kathmann et al. (2006). Je to především vyšetření páteře rentgenem. Dále také vyšetření mozkomíšního moku (vyšetření CSF – cerebrospinal fluid), myelografie, počítačová tomografie (CT – computed tomography) nebo magnetická rezonance (MRI – magnetic resonance imaging).

3.3.5 Léčba DM

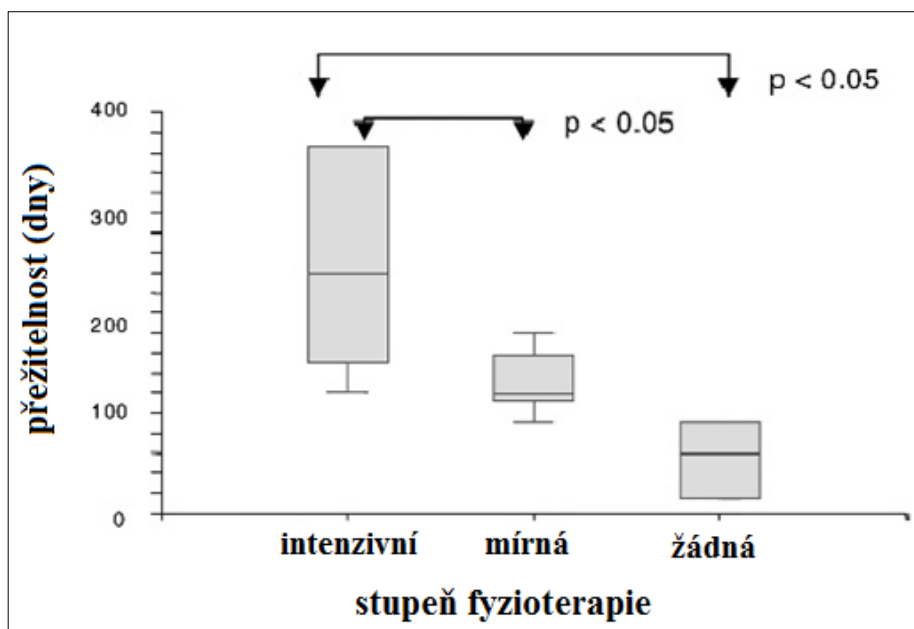
V současné době je toto progresivní neurodegenerativní onemocnění neléčitelné. Ovšem můžeme zmírnit projevy, zpomalit atrofii svalstva, a tím prodloužit a zlepšit život daného jedince.

Kathmann et al. (2006) doporučují provádět se psem fyzioterapii a hydroterapii, jejichž blahodárný vliv prokázal na skupině 50 psů trpících DM, kde porovnával délku jejich života (před nutným provedením eutanázie) za přítomnosti fyzioterapie a bez ní. Jedinci, kterým byla poskytnuta intenzivní fyzioterapie, přežívali déle, a to průměrně až o 255 dní. Toto porovnání je znázorněno na obrázku 8.

Projevy DM můžeme zmírnit i správnou, plnohodnotnou a kvalitní výživou. Doporučuje se přidávat do krmiva komplex vitamínů skupiny B a selen (Kathmann et al., 2006) a také vitamín E, jehož poměrně výrazný nedostatek u psů trpících DM dokumentuje Williams et al. (1985).

Obrázek 8: Porovnání závislosti stupně fyzioterapie na délce života psů trpících degenerativní myelopatií.

(upraveno podle Kathmann et al., 2006)



Vysvětlivky: U první skupiny (vlevo) byla fyzioterapie prováděná intenzivně. U druhé skupiny (uprostřed) v malém rozsahu a třetí skupina psů (vpravo) byla bez fyzioterapie.

3.3.6 Podobnost DM a amyotrofické laterální sklerózy – ALS

Degenerativní myelopatie je velice podobná progresivnímu neurodegenerativnímu onemocnění lidí, které se nazývá amyotrofická laterální skleróza (ALS – amyotrophic lateral sclerosis). Podobnost byla nalezena v projevech nemoci, na molekulární i genetické úrovni. Proto byli psi postižení DM zvoleni jako modelový organismus pro studium lidské ALS (Coates et al., 2009).

ALS se vyznačuje odumíráním mozkových a spinálních motorických neuronů v mozku a míše (Stathopoulos et al., 2003; Ambler, 2006). Ke svalům tak nemůže být přiveden signál z centrálního nervového systému, nejsou tedy namáhány a atrofují. Mohou se objevovat samovolné svalové záškuby a křeče. Pacienti s postižením míchy v krčních a hrudních páteřních segmentech mají problémy s artikulací a polykáním. Postupně ale paralýza, stejně jako u degenerativní myelopatie, postupuje i na ostatní části míchy a pacienti se nejsou schopni sami obsloužit (Battistini et al., 2012).

Zde přichází na řadu paliativní a hospicová péče. Lidé jsou totiž za několik let od stanovení diagnózy úplně závislí na pomoci ostatních, na umělé výživě a mechanické ventilaci, neboť jim atrofují i mezižeberní svaly. K postižení kognitivních funkcí ale při této nemoci nedochází a pacient si svoji situaci plně uvědomuje, což se pojí s řadou etických problémů (Sláma, 2006). Vzhledem k tomu, že se tato nemoc, stejně jako degenerativní myelopatie, nedá léčit, pacient umírá za tři až pět let od vypuknutí prvních příznaků (Stathopoulos et al., 2003; Shelton et al., 2012).

Při histopatologických rozborech lze také pozorovat mnohé podobnosti s DM. Je patrná atrofie svalových vláken, degenerace axonů až jejich úplná ztráta, degenerace astrocytů (astroglióza) a v buňkách se nacházejí proteinové agregáty (Shelton et al., 2012). Agregáty se tvoří i na motorických neuronech a na astrocytech (Kato et al., 2000).

Patogeneze ALS je velmi komplexní. Její vznik může být zapříčiněn oxidačním stresem, protizánětlivými cytokininy, zvýšenou apoptózou motorických neuronů či poruchou vápníkové rovnováhy v organismu, způsobené především dysfunkcí mitochondrií (Cleveland a Rothstein, 2001). To nasvědčuje tomu, že jsou za to opět zodpovědné mutace v genu SOD1, protože právě ty mají na mitochondrie toxický efekt (Carri et al., 1997).

Tuto složitou molekulární podstatu onemocnění dokládá i fakt, že existuje několik typů ALS, které mají mírně rozdílné projevy, takže by se amyotrofická laterální skleróza měla spíše označovat jako syndrom, jak navrhuje Kato (2008).

Nejčastěji se rozlišují dvě formy ALS, a to forma sporadická, která se vyskytuje nejvíce, a dále forma familiární (dědičná), která pokrývá pouze 5 – 10 % případů. U té byl však popsán dřívější nástup typických příznaků (Ambler, 2006; Awano et al., 2009).

Nicméně vše nasvědčuje tomu, že na vzniku ALS (její familiární formy) se nejvíce podílejí mutace v genu SOD1. Tuto spojitost poprvé objasnili Rosen et al. (1993). Popsali mutaci v SOD1, která ale způsobuje pouze 20 % případů z výskytu familiární formy ALS. Zbylých 80 % mutací se nachází buď na jiném místě genu SOD1, nebo v odlišných genech, u nichž zatím nebyla nalezena souvislost s výskytem ALS. Mutací SOD1 způsobujících ALS je dnes popsáno mnoho, v konkrétních číslech se ale zdroje různí. Shaw a Valentine (2007) uvádějí, že familiární formu ALS způsobuje více než 100 dnes již popsaných mutací v genu SOD1, Wininger et al. (2011) se domnívají, že již bylo popsáno více než 145 mutací a Battistini et al. (2012) popsali dokonce více než 150 mutací.

Rowland a Shneider (2001) uvádějí, že nejčastější mutací v genu SOD1 vyskytující se u pacientů trpících ALS je substituce alaninu valinem na pozici 4 (A4V).

Dangoumau et al. (2014) charakterizovali mutaci v exonu 2, tranzici na pozici 95 (c.95T>C), která způsobila záměnu valinu za alanin na pozici 31 (p.V31A). I když tuto mutaci měl pouze jeden pacient z 600 testovaných, byla u něj zjištěna velice pomalá forma ALS, jeho kondice se začala rapidně zhoršovat až po 11 letech od výskytu prvních příznaků.

3.3.7 Modelové organismy pro studium ALS

Vzhledem k tomu, že ALS je onemocnění lidí a pacienti na ni umírají až v posledních stádiích jejího projevu, v podstatě není možné získat tkáň na výzkum, které by byly v mírnějším stádiu postupu nemoci.

Protože byla shledána vysoká podobnost ALS s onemocněním DM u psů, byl právě pes zvolen jako modelový organismus pro výzkum ALS. U psů trpících degenerativní myelopatií je totiž možné provádět výzkumy a testy na tkáních pocházejících z rozličných stádií projevu nemoci, protože se majitelé takovýchto psů mohou kdykoli rozhodnout pro jejich eutanázii. Výzkum DM je tedy užitečný i pro zjišťování příčin a možných způsobů léčení lidské ALS (Morgan et al., 2013).

I když se zvířecí modely ukazují jako velice významné, neboť na nich lze studovat postup nemoci, je vždy nutné doplnit výsledky o poznatky z lidské histopatologie a autopsie, i když se často jedná až o finální stádia nemoci (Kato, 2008).

Pes jako modelový organismus je nejčastěji využíván ke studiu histopatologických vzorků, které jsou odebírány z jeho hrudní části míchy, protože ta je zodpovědná za finální stádia ALS. V těchto stádiích i u lidských pacientů atrofují dýchací svaly a pacient umírá (Morgan et al., 2013).

Psy jako modelové organismy pro studium ALS doporučuje i Coates et al. (2009). Uvádějí, že psi jsou lidem podobnější ve způsobu utváření nervového systému a jsou si také více podobní velikostně. Což se dá považovat za výhodu využití psa oproti dalšímu modelovému organismu – myši domácí (*Mus musculus*). Nehledě na to, že jsou si člověk a pes blíže i délkou trvání nemoci respektive délkou života (Coates et al., 2009).

3.4 Dynaminy – DNM

Dynaminy patří do skupiny proteinů, které váží guanosintrifosfát (GTP). V organismu se podílí na buněčné signalizaci a přenosu informací a také se významně zaslouhují o nitrobuněčný transport. Fungují jako enzym GTPáza (GTP fosfohydroláza), tím pádem hydrolyzují svůj navázaný GTP na GDP (guanosindifosfát), čímž zajistí odškrcení pučícího klatrinového váčku. Tyto váčky slouží jako transportní systém pro molekuly směřující z Golgiho aparátu ven z buňky a pro molekuly mířící do buněčného nitra. V tomto případě pak dynamin zajistí odškrcení váčku z plazmatické membrány (Alberts et al., 1998).

Dynaminů je několik druhů, nejzákladnější dělení představuje klasifikaci do tří skupin. Dynamin 1 (DNM1) se vyskytuje hlavně v presynaptických neuronech v mozku a v páteři, dynamin 2 (DNM2) je protein, který se nachází ve většině tkání organismu a dynamin 3 (DNM3) je lokalizován převážně ve varlatech, avšak vyskytuje se v menší míře i v ostatních tkáních, také v mozku, a to v postsynaptických neuronech (Praefcke a McMahon, 2004).

3.4.1 Lokalizace genů DNM

Gen pro dynamin 1 je u člověka lokalizován na chromozomu 9 (Obar et al., 1990) a nukleotidová databáze GenBank uvádí, že lidský gen DNM2 se vyskytuje na chromozomu 19 a že gen DNM3 je umístěn na chromozomu 1.

Díky kompletní sekvenaci psího genomu, které provedli Lindblad-Toh et al. (2005), byly lokalizovány geny DNM také u psa. Gen DNM1 se nachází na chromozomu 9, gen DNM2 na chromozomu 20 a gen DNM3 se vyskytuje na chromozomu 7.

3.5 Dynamin 1 – DNM1

Dynamin 1 slouží jako GTPáza s důležitou funkcí v centrální nervové soustavě (Praefcke a McMahon, 2004).

3.5.1 Enzymatická aktivita DNM1

Jako enzym je DNM1 nepostradatelný pouze při zvýšené neurologické stimulaci, kvůli zvýšené potřebě provádět endocytózu. Při velkém vzrušení je totiž centrální nervová soustava vystavena velké zátěži vzhledem k rychlému uvolňování velkého množství neurotransmiterů. Role DNM1 je nezbytná pro udržení synaptického přenosu mezi mozkem a míchou. Tím, jak enzym umožní uvolnění synaptického váčku, reguluje tak změny jeho velikosti a tvaru, v závislosti na stupni stimulace nervové soustavy. Jakmile ale stimul odezní, tato důležitá funkce enzymu DNM1 v organismu opět ustává (Ferguson et al., 2007; Heymann a Hinshaw, 2009).

V humánní medicíně byla enzymatická aktivita DNM1 podrobněji studována v souvislosti s výskytem Alzheimerovy choroby. Toto neurodegenerativní onemocnění je způsobené úbytkem nervových buněk a nervových spojů a byla také prokázána významně snížená exprese genu DNM1 v mozku pacientů, kteří zemřeli v důsledku této choroby (Yao et al., 2003).

3.5.2 Struktura a lokalizace genu DNM1

U člověka se gen DNM1, jak již bylo zmiňováno, nachází na chromozomu 9 (Obar et al., 1990), nicméně existují nukleotidové sekvence vykazující až 90 % podobnost s genem DNM1, které byly lokalizovány na chromozomu 15 a pohlavním chromozomu Y (Makrinou et al., 2004).

Databáze Ensembl uvádí u lidského genu DNM1 10 různých variant alternativního sestřihu, lišících se svoji délkou, od transkriptů necelých 500 bp dlouhých po transkripty o délce 3286 bp.

3.5.3 Gen DNM1 u psa (*Canis lupus familiaris* L.)

Databáze Ensembl uvádí u sekvence psího genu DNM1 dva alternativní sestřihy. Jedna varianta, označovaná v databázi jako DNM1-201, je 2683 bp dlouhá a překládá se

podle ní 595 AA. Tato sekvence se skládá z 18 exonů. Druhá varianta je uváděna pod označením DNM1-202, je dlouhá 2789 bp, kóduje 864 AA a obsahuje 23 exonů.

Ovšem uváděná délka transkriptů i aminokyselinových řetězců je ve vědeckých publikacích nejednotná. Například Patterson et al. (2008) uvádějí, že predikovaná délka aminokyselinové sekvence jednoho transkriptu je také 864 AA, nicméně délku kratší formy aminokyselinového řetězce po alternativním sestřihu uvádějí jako 845 AA. Patterson et al. (2008) byli první, kdo identifikoval pozici genu DNM1 na chromozomu 9 u psa (CFA9).

3.6 Výcvikový kolaps – EIC

Výcvikový kolaps (EIC - exercise-induced collapse; někdy také označovaný jako exercise intolerance and collapse) je geneticky podmíněný syndrom, který se projevuje u mladých psů při velké fyzické či mentální zátěži (Taylor et al., 2008).

3.6.1 Projevy EIC

Vzhledem k tomu, že je toto onemocnění způsobeno mutací v genu DNM1 (Patterson et al., 2008), jak bude popsáno v následujících kapitolách, vzniká tak podle mutované sekvence strukturně odlišný protein, který není schopen pokrýt nároky centrální nervové soustavy na zvýšený přísun neurotransmiterů při velké zátěži organismu psa. Kolaps se tedy nemusí vůbec projevit, pokud pes není zátěži vystavován.

Naproti tomu i postižení psi jsou schopni vydržet mírnou zátěž, ale jakmile je stimulace příliš silná, nervový systém psa již není schopen dostatečně reagovat na podněty a začne se projevovat celková slabost. Pokud vzrušení neustává, slabost přejde v samotný kolaps. Jak uvádí Taylor et al. (2008), k vyvolání kolapsu stačí zvýšená zátěž v časovém rozmezí 5 až 20 minut.

Jako první při nástupu kolapsu se projevuje slabost především zadní poloviny těla, pánevní končetiny nejsou schopny udržet váhu psa, ten začne napadat na jednu nebo obě nohy a může za sebou zadní polovinu těla tahat (Taylor et al., 2008). Není ovšem výjimkou případ, kdy se dostavuje tetraparéza a celková neschopnost koordinovat pohyby a pes se po dobu kolapsu přestane hýbat úplně (Patterson et al., 2008). Nicméně se usuzuje, že tyto příhody psa nebolí, neboť pokud nejsou jedinci při kolapsu naprosto dezorientovaní a nemohoucí, snaží se většina psů v běhu či jiné činnosti, která kolaps přivedla, pokračovat (Taylor et al., 2008).

Projevy výcvikového kolapsu mohou trvat okolo pěti minut, pak kolaps samovolně odeznívá. Ale jsou popsány případy několika psů, kteří během kolapsu zemřeli, takže se doporučuje při prvních náznacích slabosti psa v práci zastavit a snažit se ho uklidnit (Taylor et al., 2008). Pokud byl tedy pes zklidněn, měl by se vrátit k původního stavu bez veškerých známek poruch koordinace do 30 minut (Patterson et al., 2008).

3.6.2 Výskyt EIC u psů

Výcvikový kolaps je nejvíce diskutován v souvislosti s labradorskými retrievery (Taylor et al., 2008; Minor et al., 2011), postihuje ale i plemena jim příbuzná a vzhledem k tomu, že je to nemoc dědičná, objevuje se i jejich kříženců (Furrow et al., 2013). EIC byl popsán také u plemen chesapeake bay retriever, curly coated retriever, welsh corgi pembroke, border kolie a u jejich kříženců (Minor et al., 2011).

Nejčastěji je popisován výskyt u mladých labradorů v průměrném věku 14 měsíců, jinak je uváděno rozmezí pěti měsíců až tří let (Taylor et al., 2008). Takovýto věk může souviset se zařazením psa do náročného výcviku, pokud je lovecky veden. Byl totiž prokázán častý výskyt EIC u pracovních linií labradorských retrieverů, kteří jsou využíváni v lovecké disciplíně field-trial (Taylor et al., 2008; Minor et al., 2011). Minor et al. (2011) vypočítali frekvenci mutované alely DNMI ve skupině psů využívaných pro field-trial, a to v rozmezí od 17,9 % do 38 %. Avšak nejvíce jedinců s homozygotní kombinací mutovaných alel zaznamenali mezi labradory z výstavních linií a u lovecky vedených psů bylo nejvíce heterozygotů (Minor et al., 2011). To je ale velice nevýhodné, protože heterozygoti sice syndromem sami netrpí, ale představují rezervoáry mutované alely, kterou pak stále přenášejí na potomstvo. Jedinci úspěšní na výstavách nejsou většinou pracovní využívaní, proto se u nich kolaps nemusel objevit. S největší pravděpodobností se totiž jejich organismus nedostal do stavu tak zvýšené psychické ani mentální zátěže, potřebné pro vyvolání kolapsu.

3.6.3 Genetická podstata EIC

Kauzální mutaci pro rozvoj EIC popsali Patterson et al. (2008). Je to mutace v exonu 6 genu DNMI na pozici 767. nukleotidu. Dochází k záměně guaninu za thymin (G767T), která způsobí změnu aminokyselinové sekvence, kde dojde k nahrazení argininu leucinem v pozici 256 (R256L).

Onemocnění má autozomálně recesivní dědičnost. To znamená, že se projeví pouze u recesivních homozygotů, kteří mají obě alely mutované (genotyp T/T). Tato kombinace alel

se také může označovat jako E/E (Taylor et al., 2008; Minor et al., 2011). U dominantních homozygotů (genotyp G/G či N/N) se výcvikový kolaps neprojeví a heterozygoti s jednou mutovanou alelou (G/T či N/E) jím sice také netrpí, avšak tuto alelu mohou stále přenášet na potomky. Proto se doporučuje jedince před zařazením do chovu testovat, zda nejsou nositeli mutované alely (Taylor et al., 2008).

3.6.4 Diagnostika EIC

Výcvikový kolaps se manifestuje charakteristickými projevy, popsány v předchozích kapitolách. Houpavá chůze, napadání na zadní nohy a celková slabost při velkém vzrušení (stresu) mohou být prvními náznaky, že pes trpí EIC.

U psů zažívajících kolaps při field-trialech bylo popsáno zvýšení tělesné teploty během průběhu kolapsu na 41,7 °C (z klidových 39 °C). To ale nemusí být způsobeno přímo samotným kolapsem, protože i když je klinicky zdravý pes vystaven takové fyzické a psychické zátěži, jako jsou psi na field-trialu, dochází u něj také k výraznému zvýšení tělesné teploty (Taylor et al., 2008).

Pro přijetí správné diagnózy EIC by se měly provádět genetické testy zmiňované výše. Ovšem každý pes s podezřením na EIC by měl být nejdříve vyšetřen na častěji se vyskytující a především léčitelná (regulovatelná) onemocnění, jako jsou kardiovaskulární choroby, dysplazie kyčelních kloubů, anémie, respirační problémy či diabetes (Taylor et al., 2008).

3.6.5 Léčba EIC

Léčba EIC jako taková neexistuje, pouze se doporučuje nevystavovat psa nadměrné zátěži a vzrušení, zejména pokud se jedná o labradorského retrievera či jiná zmiňovaná plemena s predispozicí nebo pokud se u psa již kolaps projevil. Neznamena to však, že by se se psy nemělo cvičit. Protože jak uvádí Taylor et al. (2008), aktivity psa jako obyčejný běh, plavání, agility nebo flyball by takovýto kolaps neměly přivodit. Avšak při náročném loveckém výcviku je pes ve velké psychické zátěži, vzrušení a stresu a bohužel není výjimkou, že psi jsou při práci korigováni elektronickými výcvikovými obojky, což už tak dost excitovanému stavu centrální nervové soustavy ke zklidnění rozhodně nepřispívá.

Psům, kteří trpí EIC, se mohou do stravy přidávat podpůrné přípravky, jako je L-carnitin, koenzym Q10 a riboflavin, jak doporučují Taylor et al. (2008).

3.7 Sekvenování nové generace

Technologie čtení genomů pomocí metod sekvenování nové generace (NGS – New Generation Sequencing) zajistily ve světě genetiky obrovský pokrok. Snižují náklady na sekvenaci i celkový potřebný čas od přípravy vzorků po vyhodnocení jejich kompletní sekvence a umožňují také detailnější studium genomů z kosterních pozůstatků předků, lepší charakterizaci ekologické diverzity a identifikaci dosud neznámých původců onemocnění (Mardis, 2008). Tento významný technologický vzestup umožnil rozvoj personální genomiky a kompletních analýz individuálních lidských genomů, detailní analýzy transkripce RNA, malých RNA a podrobné studium genové exprese (Ansorge, 2009).

Do sekvenačních metod nové generace patří takzvané metody druhé generace, kam se řadí metoda 454/Roche, která byla využita při řešení diplomové práce a bude popsána v následující kapitole. Dále je sem řazena metoda Illumina/Solexa, systém Life Technologies SOLiD™, Helicos Heliscope™ systém a Pacific Biosciences SMRT sekvenace (single-molecule real-time sequencing). Sekvenace však vyžadují delší čas běhu, a to mezi osmi hodinami až deseti dny (Mardis, 2008), ale počet výsledných čtení a počet rozpoznaných bází je mnohem vyšší než při běžné starší metodě sekvenace Sangerovou dideoxy metodou (Sanger et al., 1977; Mardis, 2008). U metody 454/Roche se uvádí několik stovek tisíc jednotlivých čtení a například při použití metody Illumina/Solexa a Applied Biosystems SOLiD™ se počet čtení může navýšit až na desítky milionů (Mardis, 2008).

Ovšem z tolika analýz je generováno obrovské množství dat, jak uvádí Ansorge (2009), v jednom běhu se přečte sekvence dlouhá v řádu gigabází, takže se stále pracuje na softwarech a algoritmech, které by data lépe zpracovaly.

Mezi sekvenační metody nové generace se řadí také metody z takzvané třetí generace a z generace čtvrté. Sekvenování třetí generace se jinak nazývá sekvenací jednotlivých molekul DNA, označovanou jako SMS (single-molecule sequencing) (Schadt et al., 2010). Sekvenační metoda čtvrté generace je metoda pomocí sekvenace *in situ* (Larsson et al., 2010).

3.8 Pyrosekvenování (metoda 454/Roche)

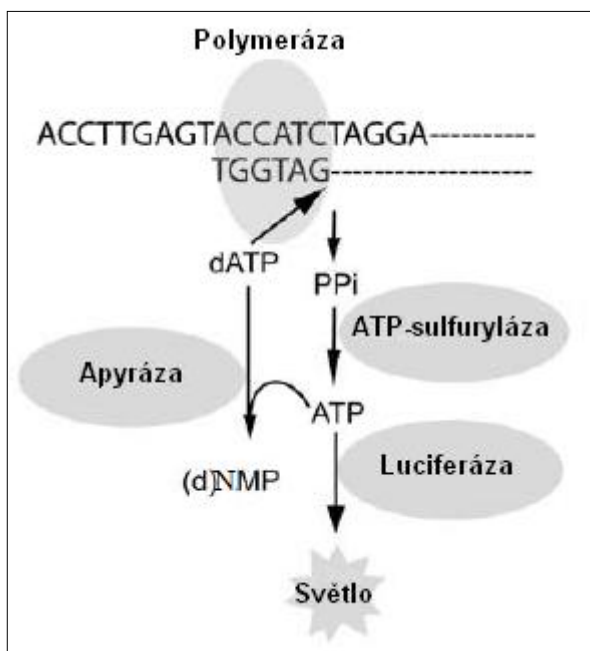
Pyrosekvenace je jedna z prvních sekvenačních metod nové generace, která začala být používána jako vylepšení klasické sekvenace Sangerovou dideoxy terminační metodou.

Je také založena na sekvenaci využívající syntézu komplementárního vlákna (SBS – sequencing-by-synthesis), avšak liší se způsobem detekce zabudovaných nukleotidů a také postupem provedení.

Při zabudování nukleotidu do nově vznikajícího řetězce DNA dojde k uvolnění pyrofosfátu (PPi) (Ronaghi et al., 1996), a metoda tak pro sledování a vyhodnocení reakcí využívá bioluminiscence, protože uvolněný PPi je potom v několika enzymatických krocích konvertován na světelný signál (Ahmadian et al., 2006). Jednoduché schéma pyrosekvenace je znázorněno na obrázku 9. Podrobné vyobrazení celého průběhu pyrosekvenace je zobrazeno v příloze 1.

Obrázek 9: Princip pyrosekvenační reakce.

(upraveno podle Agah et al., 2004)



Vysvětlivky: DNA polymeráza zabuduje nukleotidy (dNTP, zde na příkladu dATP) do nově vznikajícího řetězce. Tím je uvolněn anorganický fosfát (PPi), který je enzymem ATP sulfurylázou konvertován na ATP (adenosintrifosfát), jenž poskytuje dostatek energie k vyzáření světla prostřednictvím enzymu luciferázy. Nukleotidy jsou následně rozkládány apyrázou na jednodušší složky (nukleotidmonofosfáty, zde (d)NMP).

Oproti klasickým starším metodám sekvenace DNA je pyrosekvenace výhodnější v tom, že zde není potřeba používat značené primery, značené nukleotidy a ani se vzorky nemusí hodnotit na gelové elektroforéze (Ronaghi, 2001). Další výhodou je fakt, že pyrosekvenátor umožňuje sekvenaci většího množství nukleotidů a také lze zahájit sekvenaci mnohem většího počtu vzorků najednou (oproti starším metodám), čímž se urychlí i celkový

čas a mohou zde najednou probíhat sekvenace fragmentů DNA, pocházejících od rozdílných jedinců (Mardis, 2008).

Pyrosekvenace má ovšem i několik nevýhod. Dříve byl nepříznivě hodnocen krok s odmyváním nezabudovaných nukleotidů od templátu DNA. Pak se ale začal k reakční směsi přidávat enzym apyráza, který tyto nukleotidy přímo degraduje a likviduje také přebytečný adenosintrifosfát (ATP) mezi každým cyklem (Ronaghi et al., 1998). Také se musí zajistit, aby první čtyři osekvenované nukleotidy byly TCGA, kvůli správné kalibraci signálu. I přesto se ale špatně interpretují homopolymerní oblasti obsahující více než šest stejných nukleotidů za sebou, protože dojde k vyzáření znásobeného světelného signálu. Tím pádem se v těchto oblastech mohou vyskytovat chyby při detekci delecí a inzercí (Ansorge, 2009).

Naproti tomu se velice zřídka objevují chyby čtení způsobené substitucí, protože zabudování každé další báze je vysoce specifické díky regulovanému přísunu nových nukleotidů. Tyto chyby ve čtení způsobené pozitivními nebo negativními posuny čtecího rámce lze částečně vyřešit přidáním SSB (single strand binding) proteinů (Mardis, 2008). SSB proteiny se totiž naváží na DNA, která se díky vazbě stabilizuje, a zabrání se tak vzniku nežádoucích sekundárních struktur na jednořetězcovém vlákně. Jak uvádí Ahmadian et al. (2006), vazba SSB proteinů má proto pozitivní vliv na přesnost sekvenace a mnohonásobně zvyšuje délku jednotlivých čtení.

Dnes se využívají pyrosekvenátory firmy Roche (454 Life Sciences), a to sekvenátor Roche GS-20, který byl zaveden jako první pro komerční účely (Rothberg a Leamon, 2008). Dále byl vyvinut sekvenátor Roche GS FLX a později jeho upravená verze Roche GS FLX Junior (McGinn a Gut, 2012).

Pyrosekvenování se skládá z několika základních kroků. Prvním krokem je příprava DNA knihovny, následuje emulzní PCR (emPCR) a nakonec vlastní sekvenace. Jednotlivé kroky jsou blíže popsány v následujících kapitolách.

3.8.1 Příprava DNA knihovny

Pro přípravu knihovny je zapotřebí dlouhou genomovou dvouvláknovou DNA (dsDNA – double stranded DNA) rozštěpit na krátké fragmenty a oddělit od sebe jednotlivá vlákna. To se provádí procesem nebulizace, což je promývání vzorku dusíkem, který způsobí náhodné zlomy dsDNA molekul na fragmenty o délce 400 až 600 bází. Poté se k 5' a 3' konci vláken DNA musí přidat 454 sekvenční adaptory, které jsou dlouhé okolo 30 bp. Tyto adaptory zajistí přichycení ke speciální agarózové mikrokuličce, na které probíhají reakce

a která také usnadňuje pozdější manipulaci s fragmenty DNA, jejich purifikaci, kvantifikaci i vlastní sekvenaci (Rothberg a Leamon, 2008). Adapters také obsahují také MID sekvence (multiple identify sequence), jež umožňují identifikaci jednotlivých vzorků (Roche, 2012b).

Jakmile je DNA rozdělena na menší fragmenty, smíchají se se směsí mikrokuliček o průměru 28 μm . Mikrokuličky nesou specifické oligonukleotidy, které jsou komplementární k 454 sekvenčním adapterům. Takto se kuličky spojí s jednotlivými DNA fragmenty. Avšak napojení je náhodné, nejde přesně určit, kam a na jakou kuličku se DNA naváže, proto musí následovat proces odstranění přebytečných kuliček, které neobsahují žádný navázaný fragment či jich mají na sobě navázáno více (Mardis, 2008).

3.8.2 Emulzní PCR – emPCR

Pro správný průběh emPCR (polymerase chain reaction) je tedy potřeba zajistit, aby se amplifikovaly pouze specifické fragmenty jednořetězcové DNA (ssDNA – single stranded DNA) napojené na jednu kuličku a aby byly malé fragmenty DNA před zahájením emPCR odmyty.

Dále se ve zkumavkách vytvoří homogenní směs, která obsahuje reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci a vše je ponořeno ve speciálním oleji. Tímto způsobem se vytvoří emulze voda-olej, ve které probíhá emPCR, díky které se daný fragment DNA amplifikuje. Každá mikrokulička tedy poté slouží jako samostatný mikroreaktor. Paralelně tak dochází k amplifikaci na všech kuličkách a po skončení reakcí je na každé kuličce navázáno okolo 10^7 kopií původního fragmentu DNA. Soubor všech těchto kuliček slouží jako DNA knihovna, která je dále využívána při sekvenaci (Mardis, 2008; Ansorge, 2009).

3.8.3 Vlastní pyrosekvenace

Po emPCR a denuraci fragmentů DNA je každá kulička obsahující jeden fragment DNA umístěna do samostatné jamky na speciální pikotitrační destičku (PTP – PicoTiterPlate), kde probíhá sekvenace (Ansorge, 2009). Každá jamka je hluboká 55 μm , aby se do ní vešla přesně jedna kulička nesoucí DNA společně s dalšími sekvenačními komponenty. Ty se do jamek na destičku rozdělují pomocí centrifugace (Roche, 2012c).

Za pikotitrační destičkou je umístěna CCD kamera (the charge-coupled device), která umožní zachycení světleného signálu emitovaných fotonů z každého jednotlivé jamky, kde probíhá sekvenační reakce (Margulies et al., 2005).

Aby mohla sekvenace proběhnout, musí se ke vzorkům DNA do jednotlivých jamek přidat reakční směs obsahující enzymy důležité pro její správný průběh. Směs se skládá z DNA polymerázy, ATP sulfurylázy a luciferázy, které jsou také imobilizované na mikrokuličkách, nicméně ty jsou menší než kuličky s DNA (Margulies et al., 2005).

Polymeráza používaná pro pyrosekvenaci je nejčastěji Klenowův fragment DNA polymeráza I izolovaná z bakterie *Escherichia coli*. Enzym ATP sulfuryláza se izoluje z rekombinantní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a enzym luciferáza je nejčastěji původem ze světlušky *Photinus pyralis* (Ronaghi, 2001). Tato luciferáza produkuje světlo v rozmezí vlnové délky od 550 do 590 nm (Ahmadian et al., 2006).

Reakční směs může také obsahovat enzym apyrázu, který odbourává nezabudované nukleotidy a přebytečné ATP. Tento systém využívající apyrázu se nazývá pyrosekvenační systém čtyř enzymů (Ronaghi et al., 1998). Kromě těchto enzymů je v reakci přítomen speciální substrát adenosin fosfosulfát (APS) a D-luciferin (Ahmadian et al., 2006). Také se doporučuje přidavek výše zmiňovaných SSB proteinů (Ahmadian et al., 2006; Mardis, 2008).

Samozřejmě se k reakci musí ještě dodat i jednotlivé nukleotidy, aby se mohl syntetizovat komplementární řetězec DNA. Ty se přidávají jednotlivě v cyklech a ve stanoveném pořadí. Jakmile se zabuduje správný nukleotid do nového řetězce, syntéza se pozastaví a DNA polymeráza čeká na další nukleotid (Metzker, 2010).

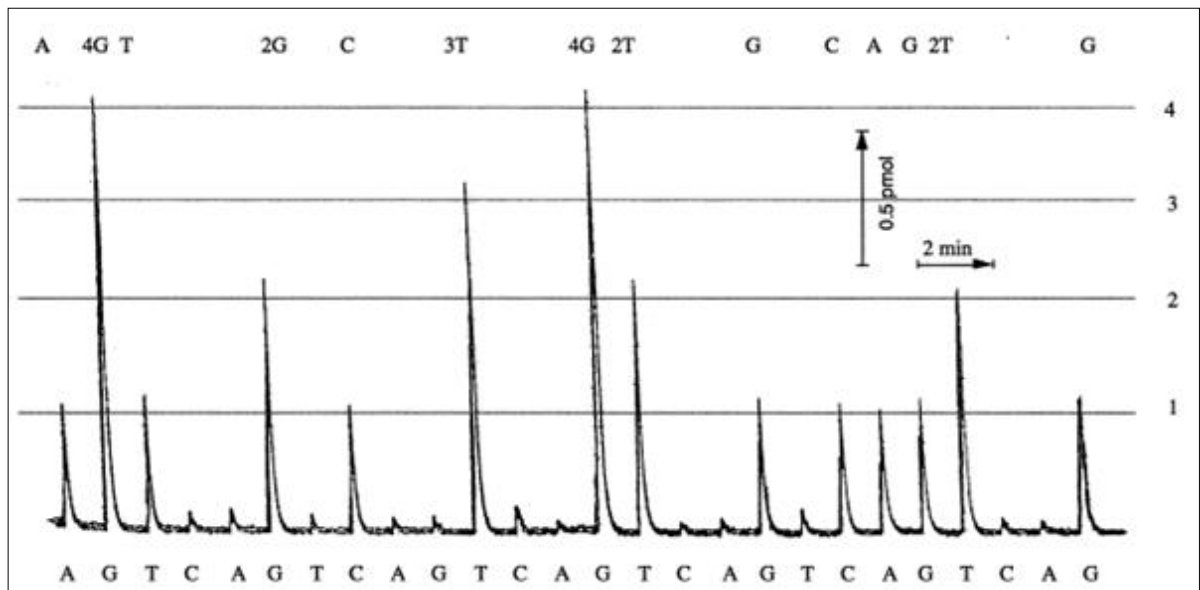
Polymeráza tímto přidáváním nukleotidů zajistí elongaci vlákna DNA, sulfuryláza a luciferáza indukují, přes několik enzymatických kroků popsaných v další kapitole, vyzáření fotonů a světelný signál je pak zachycen CCD kamerou. Na každý zabudovaný nukleotid, který poskytne jedna kulička, obsahující asi 10 milionů kopií původního DNA vlákna, se vyzáří až 10 tisíc fotonů (Margulies et al., 2005).

Pořadí veškerých zabudovaných nukleotidů se následně hodnotí na flowgramu, ze kterého je patrná sekvence vlákna DNA (Metzker, 2010). Samotnou kinetiku enzymů účastnících se reakce lze sledovat z dalšího grafického zobrazení, a to z pyrogramu. Aktivita DNA polymerázy a ATP sulfurylázy se dá určit ze sklonu vzestupné křivky, výška křivky udává aktivitu luciferázy a ze sklonu sestupného zakřivení lze odvodit účinnost odstraňování nukleotidů (Ronaghi, 2001). Část pyrogramu je uvedena na obrázku 10.

Všechny tyto enzymatické reakce probíhají velice rychle, jak uvádí Ronaghi (2001), přeměna PPi na ATP trvá asi 1,5 sekundy a vyzáření světelného signálu díky luciferáze proběhne během dalších 0,2 sekund.

Obrázek 10: Výstup z pyrosekvenace – pyrogram.

(upraveno podle Ronaghi, 2001)

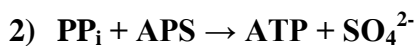


3.8.4 Schéma reakcí probíhajících při pyrosekvenování

Jako první reakce musí proběhnout polymerace DNA, aby se prodloužil původní řetězec. Při zabudování každého nukleotidu (dNTP, kde N je kterákoli báze – A, T, C nebo G) dojde k uvolnění pyrofosfátu (PP_i):

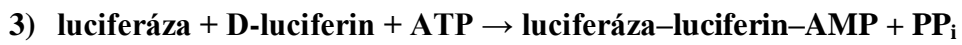


Uvolněný PP_i slouží jako reakční substrát pro enzym ATP sulfurylázu, která produkuje adenosintrifosfát (ATP) a sulfát (SO₄²⁻):

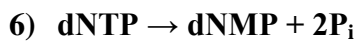
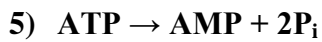


Vznikající ATP poskytuje dostatek energie na to, aby enzym luciferáza zoxidoval luciferin a došlo tak k vyzáření světelného signálu. Vyzářené světlo je přímo úměrné počtu zabudovaných nukleotidů (Ronaghi, 2001).

Také dojde mimo jiné ke vzniku adenosinmonofosfátu (AMP) a oxidu uhličitého (CO₂). Tyto dvě reakce proběhnou pouze tehdy, dojde-li k zabudování správného nukleotidu:



Následně musí dojít k odbourání nezabudovaných nukleotidů a přebytečného ATP pomocí enzymu apyrázy. ATP se degraduje na AMP a deoxynukleotidtrifosfáty se mění na deoxynukleotidmonofosfáty (dNMP) za současného uvolnění anorganického fosfátu (P_i).



(Ahmadian et al., 2006)

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Výběr hodnocených jedinců pro analýzy DNA

Diplomová práce je zaměřena na studium kauzálních mutací genu SOD1, způsobujících degenerativní myelopatii (DM), a mutací genu DNMT1, která zapříčiňuje syndrom výcvikového kolapsu (EIC). Na základě studia vědecké literatury byl vybrán soubor psích plemen, u kterých se zmiňované nemoci vyskytují, nicméně byla testována i plemena, u kterých zatím výskyt popsán nebyl.

Pro usnadnění orientace mezi jednotlivými vzorky a také vzhledem k zachování anonymity psů, respektive majitelů, kteří dovolili poskytnout DNA svých psů pro testování, se jednotlivé vzorky označily zkratkou plemene a pořadovým číslem.

4.1.1 Plemena psů a zástupci vlka eurasijského použita pro pyrosekvenaci

Do experimentů bylo zahrnuto 22 psů (*Canis lupus familiaris* L.) a 2 zástupci vlka eurasijského (*Canis lupus lupus* L.). Z plemen psů bylo sekvenováno 18 jedinců plemene československý vlčák a 1 pes plemene labradorský retriever. U plemene československý vlčák byli sekvenováni jedinci, kteří s hlediska kauzální mutace genu SOD1 byli nemutovaní homozygoti, mutovaní homozygoti a heterozygoti. Labradorský retriever byl z hlediska kauzální mutace pro genu DNMT1 heterozygot.

Při pyrosekvenaci byly přečteny nejen geny SOD1 a DNMT1, ale i kandidátní geny způsobující kryptorchismus (HOXA10, INSL3, INHA a TIMP1), které budou popsány v jiné diplomové práci na stejném školícím pracovišti. Proto i zde jsou zařazeny vzorky od tří kryptorchidních psů, a to jeden zástupce plemene border kolie, dalším sekvenovaným plemenem byl border teriér a jako poslední kryptorchidní jedinec byl pes plemene pudl.

Celkem tedy probíhala sekvenace DNA pocházející od 24 jedinců.

4.1.2 Plemena psů použita pro detekci kauzálních mutací genů SOD1 a DNMT1 pomocí PCR-RFLP

Výběr plemen pro aplikaci molekulárních markerů byl zvolen s ohledem na plemenné predispozice ke studovaným onemocněním.

DM se vyskytuje nejčastěji u německých ovčáků, a protože československý vlčák vznikl křížením tohoto plemene s eurasijským vlkem (*Canis lupus lupus* L.), lze tedy i u něj

očekávat výskyt daného onemocnění. Do analýz genu SOD1 bylo zahrnuto celkem 1002 jedinců plemene československý vlčák.

EIC je naproti tomu charakteristické pro labradorské retrievery. Proto bylo do analýz zahrnuto 98 zástupců tohoto plemene.

Současně byla analyzována dvě další plemena – border kolie a bearded kolie, u kterých nejsou z vědeckých publikací známé informace o predispozicích ani k jedné z chorob. Byla hodnoceno 104 jedinců plemene border kolie a 116 jedinců plemene bearded kolie.

4.2 Izolace genomické DNA

4.2.1 Odběr buněk bukálních sliznic

Vzorky genomické DNA pocházejí z buněk bukální sliznice jednotlivých psů (či vlků). Buňky byly odebrány neinvazivní metodou stíráním povrchu bukální sliznice pomocí sterilního cytologického kartáčku (Lotus Global Co., Ltd.). Ten byl následně důkladně vysušen, vložen do čisté papírové obálky a uložen do mrazicího boxu, kde byl ponechán při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, než byla provedena samotná izolace DNA.

4.2.2 Vlastní izolace DNA

K izolaci genomické DNA byl použit kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel). Izolace byla provedena dle manuálu výrobce.

4.2.3 Vyhodnocení kvality a kvantity izolované DNA

Pro posouzení vysokomolekularity izolované DNA byla použita metoda elektroforetické separace v cele SubCell (BioRad), při konstantním napětí 120 V po dobu 60 minut. Pro separaci byl využit 1 % agarózový gel s přídavkem 1 x TBE pufru, jehož složení je uvedeno v příloze 2. Pro digitalizaci výsledných elektroforeogramů byl použit přístroj GelDoc (BioRad) a program QuantityOne (BioRad).

Výtěžnost DNA byla zjišťována UV-spektrofotometrickou metodou pomocí automatického přístroje NanoPhotometer (Implen). Tento mikroobjemový UV-spektrofotometr prověří každý vzorek při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm

a následně vyhodnotí poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230. Z poměru jednotlivých absorbancí se získají výsledky o čistotě či o případné kontaminaci DNA organickými látkami.

Všechny vzorky extrahované DNA byly naředěny na konstantní koncentraci 5 ng . μl^{-1} 1x TE pufrem, jehož složení je uvedeno v příloze 2.

4.3 Získání amplikonů studovaných genů pomocí long-range PCR

4.3.1 Navržení primerů pro amplifikaci genu SOD1

Pro navržení primerů byl použit program Primer3 Input v.0.4.0 (Rozen a Skaletsky, 2000) a bylo využito sekvence genu SOD1, publikované v databázi Ensembl pod označením ENSCAFG00000008859.

K amplifikaci celého genu SOD1 bylo třeba navrhnout více párů primerů s ohledem na jeho velikost a strukturu. Pomocí primerů uvedených v tabulce 1 byly amplifikovány dva fragmenty. První fragment je dále pro lepší přehlednost označován jako fragment A a druhý fragment je označován jako fragment B.

Tabulka 1: Navržené primery pro amplifikaci fragmentů genu SOD1.

Gen	Fragment	Primer	Sekvence primeru 5' - 3'
SOD1	A (4816 bp)	F	CCCCTCTAATGGGAGGAGAGTGGAGAA
		R	TGCGGGCTTGAATGAGAATTGAAGAAA
	B (7989 bp)	F	CACCCAGGCGCCCTTCTTCTGCTTTA
		R	GACCGGGACAGGCACAGAGACTTGGA

4.3.2 Navržení primerů pro amplifikaci fragmentu genu DNMI

Vzhledem k velikosti a struktuře genu DNMI byla k amplifikaci vybrána pouze oblast lemující exon 6, ve kterém se vyskytuje kauzální mutace způsobující EIC u psů (Patterson et al., 2008). Byl tedy navržen jeden pár primerů pomocí programu Primer3 Input v.0.4.0 (Rozen a Skaletsky, 2000). Dále bylo využito sekvence genu DNMI, která je volně přístupná z databáze Ensembl pod označením ENSCAFG00000020082. Při použití těchto dvou primerů vznikl výsledný fragment dlouhý 3814 bp. Jejich sekvence jsou znázorněny v tabulce 2.

Tabulka 2: Navržené primery pro amplifikaci fragmentu genu DNMI.

Gen	Primer	Sekvence primeru 5' - 3'
DNM1	F	CTCTCAAGGTTGCCAAGGAGGTGGA
	R	GTCTGGGGTAAAGAGCCCCGTTCTG

4.3.3 Podmínky amplifikace fragmentů genů SOD1

Složení reakční směsi pro long-range PCR je uvedeno v tabulce 3. Teplotní a časové podmínky této amplifikace jsou znázorněny v tabulce 4. Amplifikace probíhala v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad).

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro long-range PCR amplifikaci fragmentu genu SOD1.

Komponenty	Koncentrace
DNA	*
long PCR buffer	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2 mM
primer F	0,4 μM
primer R	0,4 μM
long-range PCR enzyme mix (Thermo Scientific)	2 U

Vysvětlivky: (*) – pro amplifikaci fragmentu A genu SOD1 bylo použito 30 ng DNA; pro amplifikaci fragmentu B genu SOD1 bylo použito 60 ng DNA.

Tabulka 4: Teplotní a časový profil amplifikace fragmentů genu SOD1.

Proces	Teplota [°C]	Délka cyklu [min]	Počet cyklů
počáteční denaturace	94	4	1
denaturace	94	0,5	35
annealing + elongace	68	*	

Vysvětlivky: (*) – u fragmentu A probíhaly tyto kroky 4 minuty; u fragmentu B probíhaly tyto kroky 7 minut.

4.3.4 Podmínky amplifikace fragmentu genů DNMI

Složení reakční směsi pro long-range PCR amplifikaci fragmentu genu DNMI je znázorněno v tabulce 5 a teplotní a časový profil reakcí v tabulce 6. K amplifikaci byl použit termocykler C1000TM Thermal Cycler (BioRad).

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro long-range PCR amplifikaci fragmentu genu DNMI.

Komponenty	Koncentrace
DNA	30 ng
long PCR buffer	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2 mM
primer F	0,4 μM
primer R	0,4 μM
long-range PCR enzyme mix (Thermo Scientific)	2 U

Tabulka 6: Teplotní a časový profil amplifikace fragmentu genu DNMI.

Proces	Teplota [°C]	Délka cyklu [min]	Počet cyklů
počáteční denaturace	94	3	1
denaturace	94	0,5	10
annealing + elongace	68	4	
denaturace	94	0,5	24
annealing + elongace	68	4 + 2 sekundy/cyklus	
finální elongace	68	10	1

4.4 Pyrosekvenace genů SOD1 a DNMI

Pro pyrosekvenaci byl použit sekvenátor GS Junior System (GS Junior Titanium Series) firmy Roche (454 Life Sciences Corporation). Sekvenováno bylo šest genů – SOD1, DNMI, INSL3, HOXA10, INHA a TIMP1. Celkem bylo sekvenováno 24 genotypů.

4.4.1 Příprava DNA knihovny

Příprava DNA knihovny se skládá z několika za sebou navazujících kroků, které jsou blíže popsány v následujících oddílech.

Fragmentace DNA

Pro přípravu knihovny je nutné nejdříve DNA rozštěpit na kratší fragmenty o délce asi 400 až 600 bp. Fragmentace byla provedena nebulizací pomocí dusíku. Úspěšnost nebulizace byla ověřena pomocí gelové elektroforézy prostřednictvím zařízení FlashGel System (Lonza). Postupovalo se přesně podle jednotlivých kroků popsaných v manuálu dodávaném výrobcem (Roche, 2012b).

Úprava 5' a 3' konců fragmentů DNA

Vzhledem k tomu, že se DNA nebulizací náhodně rozštěpila na fragmenty s různě utvářenými 5' a 3' konci (tupé i lepidé), musely se fragmenty poté speciálně upravit, aby na ně byly správně napojeny adaptory potřebné pro pozdější manipulaci se vzorky DNA. Úprava byla provedena kitem End Repair mix (Roche), jehož složení a podrobný postup úpravy konců je popsán v manuálu (Roche, 2012b). Reakce probíhaly v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad) za použití doporučeného End Repair programu 20 minut při 25 °C, následovaného 20-ti minutovým cyklem při 72 °C. Poté se vzorky v termocykleru ochladily na teplotu 4 °C (Roche, 2012b).

Ligace adapterů

Pro pyrosekvenaci byla zvolena metoda značení a manipulace se vzorky DNA pomocí adapterů. Adaptory byly připojeny k tupým koncům jednotlivých fragmentů pomocí DNA ligázy. Poté byly vzorky 5 sekund vortexovány, 2 sekundy centrifugovány a inkubovány 10 minut při 25 °C v termocykleru.

Odstranění přebytečných fragmentů DNA

Před emPCR muselo být provedeno odstranění malých fragmentů DNA pomocí speciálních kuliček AMPure beads (Roche). Tento krok probíhal přesně podle manuálu (Roche, 2012b).

Kvantifikace DNA knihovny

Kvantifikace DNA knihovny proběhla pomocí TBS 380 Fluorometru (Turner Biosystems). Pro kvantifikaci byla vytvořena kalibrační křivka s využitím kitu Quant-iTTM PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Life Technologies). Bylo postupováno podle kroků popsaných v manuálu (Roche, 2012b). Na základě kvantifikace byly vzorky naředěny v poměru 1 : 1, to znamená takovým způsobem, že na každou jednu amplifikační kuličku připadá jedna molekula DNA.

4.4.2 Emulzní PCR

Pro správný průběh emPCR bylo zapotřebí vytvořit homogenní směs obsahující následující komponenty – reakční směs Live Amp Mix (Roche), emulzní olej GS Junior Titanium emPCR Oil (Roche) a vytvořenou DNA knihovnu. Příprava vzorků a přesné složení roztoků je podrobně popsáno v manuálu (Roche, 2012a). Teplotní a časové podmínky reakce jsou znázorněny v tabulce 7.

Tabulka 7: Teplotní a časový profil emPCR.

Proces	Teplota [°C]	Délka cyklu [min]	Počet cyklů
počáteční denaturace	94	4	1
denaturace	94	0,5	50
annealing	58	4,5	
elongace	68	0,5	
závěrečný cyklus	10	–	–

Enrichment mikrokuliček s DNA

Pro správný průběh pyrosekvenace musí být ve zkumavkách přítomny mikrokuličky nesoucí miliony kopií amplifikovaného fragmentu DNA a zbylé kuličky bez fragmentů DNA musí být odmyty. K odmytí vedla řada kroků, při nichž byl použit isopropanol a speciální pufr, jejichž složení a podrobný postup promývání je uveden v manuálu (Roche, 2012a).

4.4.3 Příprava na pyrosekvenaci a vlastní pyrosekvenace

Pro přípravu pyrosekvenační reakce byly použity dva kity, a to GS Junior Titanium Sequencing Kit (Roche) v kombinaci s druhým kitem GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit (Roche). Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky PicoTiterPlate (PTP) byly pomocí centrifugace postupně rozlévány roztoky s rozdílnými reakčními komponenty společně s mikrokuličkami s navázanou DNA. Tím bylo docíleno obsazení každé jednotlivé jamky čtyřmi vrstvami různých mikrokuliček včetně jedné mikrokuličky obsahující DNA. Konkrétní kroky přípravy PTP destičky jsou uvedeny v manuálu (Roche, 2012c), kde je také popsáno složení jednotlivých roztoků. Ve finálním kroku se PTP umístila do nosiče PicoTiterPlate Cartridge (Roche), kde probíhala vlastní sekvenace. Snímání světelného signálu z jednotlivých jamek bylo zajištěno pomocí CCD kamery, umístěné na spodní straně PTP destičky.

4.5 Zpracování dat získaných pomocí pyrosekvenace

Po úspěšně dokončené pyrosekvenaci byla získaná data zpracována pomocí programu GS Reference Mapper software (Roche). Tento program vyhodnocuje sekvence testované DNA na základě porovnání s referenční sekvencí jednotlivých genů. Výsledkem jsou tabulky

jednotlivých polymorfních míst, jimiž se dané vzorky odlišují od referenční sekvence. Jako polymorfismus program vyhodnotí jednotlivé SNP i různě dlouhé inserce a delece.

4.5.1 Filtrování dat

Každé polymorfní místo bylo na základě MID sekvence přiřazeno daným jedincům, od nichž DNA pocházela. Jednotlivá polymorfní místa byla dále charakterizována pomocí několika údajů zahrnujících pozici v sekvenci, typ mutace, celkový počet čtení polymorfního místa a procento čtených molekul s daným typem změny oproti referenční sekvenci.

Polymorfní místo je definované tak, že udává konkrétní místo v referenční sekvenci s výskytem dané mutace. Jako referenční sekvence byla pro pyrosekvenaci genu SOD1 použita část sekvence uvedená v databázi Ensembl pod identifikačním číslem ENSCAFG00000008859 a rovněž pro gen DNMI byla použita jako referenční sekvence část tohoto genu uvedená pod označením ENSCAFG00000020082 v databázi Ensembl.

Pokud byla frekvence výskytu polymorfismu rovna 100 %, lze usuzovat, že je daný jedinec homozygot, protože se tento polymorfismus vyskytuje na obou alelách příslušného genu. Pokud byla frekvence 50 %, byl jedinec označen na heterozygota, protože měl tím pádem mutovanou pouze jednu alelu. Ovšem ne u všech jedinců bylo vyhodnocení takto přesné. Objevovaly se i frekvence nižší než 50 %, které byly vyhodnocovány taktéž jako heterozygoti a naopak při frekvencích mezi 50 % a 100 % byli jedinci hodnoceni jako homozygoti.

U některých polymorfismů byly zjištěny velice nízké frekvence jejich výskytu. Tyto hodnoty, které byly menší než 10 %, byly z výstupové datové tabulky manuálně odstraněny (filtrovány). Příčina jejich vzniku mohla spočívat v chimérickém založení některých genů nebo v teoreticky možné chybovosti pyrosekvenace.

4.6 Haplotypy genů SOD1 a DNMI a jejich bioinformatické vyhodnocení

4.6.1 Definice haplotypů

Výstupem z programu GS Reference Mapper (Roche) jsou informace o lokalizacích jednotlivých polymorfismů vzhledem k referenční sekvenci. Jedinci, u kterých není

polymorfismus zobrazen, vykazují v daném místě zcela identickou sekvenci, jakou měla sekvence referenční. Z výstupu tohoto programu vyplývá, že je schopen identifikovat homozygotní, respektive heterozygotní kombinace detekovaných polymorfismů. Vzhledem k tomu, že pro vyhodnocení podobností mezi sekvencemi byl použit program MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013), bylo nutné ze získaných sekvencí vytvořit haplotypy.

Haplotyp jsem definovala jako sekvenci, která nese všechny mutace u daného jedince bez ohledu na to, zdali se tyto mutace vyskytovaly v homozygotních nebo heterozygotních kombinacích. Jinými slovy lze říci, že haplotypy používané v diplomové práci neodpovídají konkrétním alelickým kombinacím jednotlivých jedinců, ale představují sekvenci genu hypotetického jedince, který by měl všechny detekované mutace v homozygotní sestavě. Důvodem takto vytvořených haplotypů je skutečnost, že program MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) nedokáže vyhodnocovat heterozygotní kombinace.

U jednotlivých haplotypů exonových částí genů SOD1 a DNMI byla pomocí programu BioEdit 7.0.5.2 (Hall, 1999) simulována translace s cílem stanovit pořadí aminokyselin kódované těmito haplotypy.

4.6.2 Vyhodnocení podobností mezi haplotypy genů SOD1 a DNMI na základě kladogramů

Sekvence haplotypů byly podrobeny kladogramové studii pomocí programu MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Tento program vyžaduje před vlastní analýzou provedení mnohočetného srovnávání – multiple alignment. Tento alignment byl proveden pomocí programu BioEdit (Hall, 1999), který v sobě zahrnuje algoritmus ClustalW (Thompson et al., 1994). Pro porovnání vzorků vedoucí k nalezení homologických sekvencí byla použita funkce Full Multiple Alignment a Bootstrap NJ Tree. Vlastní porovnání bylo provedeno při 1 000 000 bootstrapů.

Takto zpracovaná data byla následně analyzována programem MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Pro tvorbu kladogramů byla použita metoda maximální věrohodnosti (ML – Maximum Likelihood). Tato metoda umožňuje vyhodnocovat různé mutační rychlosti, proto byl pro každý kladogram vybírán neoptimalnější model pomocí vypočtené hodnoty BIC (Bayesian Information Criterion) (Nei a Kumar, 2000). Kladogramy byly sestaveny na základě 2 000 bootstrapů. V tabulce 8 jsou uvedeny modely, které byly použity při hodnocení sekvenčních polymorfismů. Některé skupiny haplotypů (oblasti genů), uvedené

v tabulce 8, nemohly být programem vyhodnoceny. Kladogramy mohou být sestaveny pouze při výskytu alespoň čtyř haplotypů, což u několika skupin nebylo splněno.

Tabulka 8: Modely metody ML použité pro hodnocení variability studovaných haplotypů.

Gen	Oblast genu	Statistický model	Autoři modelu
SOD1	3'downstream sekvence	T92	Tamura (1992)
	exon 2 + 3 + 4 + 5	nelze hodnotit pro malý počet haplotypů	
	intron 2-3	HKY	Hasegawa et al. (1985)
	intron 3-4	T92	Tamura (1992)
	intron 4-5	T92	Tamura (1992)
	AA sekvence	nelze hodnotit pro malý počet haplotypů	
DNM1	exony 6 + 7	JC	Jukes a Cantor (1969)
	intron 5-6	nelze hodnotit pro malý počet haplotypů	
	intron 6-7	nelze hodnotit pro malý počet haplotypů	
	intron 7-8	JC	Jukes a Cantor (1969)
	intron 8-9	nelze hodnotit pro malý počet haplotypů	
	intron 9-10	nelze hodnotit pro malý počet haplotypů	
	intron 10-11	JC	Jukes a Cantor (1969)
	AA sekvence	nelze hodnotit pro malý počet haplotypů	

4.7 Detekce kauzální mutace genu SOD1 vedoucí k DM u psů pomocí PCR-RFLP

4.7.1 Navržení PCR-RFLP markeru mutace genu SOD1

Pro vlastní navržení markeru mutace v genu SOD1, která způsobuje degenerativní myelopatii, bylo využito studie Awano et al. (2009). Autoři této studie uvádějí, že genetická podstata onemocnění spočívá v tranzici guaninu za adenin na pozici 118. nukleotidu (c.118G>A) v exonu 2 genu SOD1. Pro experimenty v diplomové práci bylo využito sekvencí primerů, které popsali Awano et al. (2009) a jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Primery použité pro amplifikaci PCR-RFLP markeru genu SOD1.

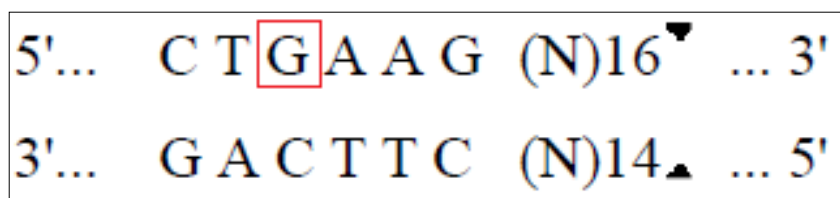
Gen	Primer	Sekvence primeru 5' - 3'
SOD1	F	AGTGGGCCTGTTGTGGTATCA
	R	CTCCAAACTGATGGACGTGGAAT

Pro určení místa nasedání primerů bylo využito databáze GenBank a sekvence mRNA genu SOD1, kterou aktualizovali Crisp et al. (2013) a v databázi je uvedena pod označením NM_001003035.1.

4.7.2 Výběr enzymu pro restriční štěpení PCR fragmentu genu SOD1

Pro specifické restriční štěpení, které by odlišilo mutovanou a nemutovanou alelu genu SOD1, byl zvolen enzym *Eco57I*, a to pomocí programu Webcutter 2.0, který je volně přístupný na internetové adrese <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>. Tento enzym má charakteristické restriční místo, které je znázorněno na obrázku 11.

Obrázek 11: Charakteristické restriční místo enzymu *Eco57I*.



Enzym *Eco57I* tedy štěpí sekvenci DNA 16 nukleotidů za rozpoznávaným palindromem. PCR produkt má velikost 79 bp před štěpením a po štěpení by měly být u nemutovaných alel detekovatelné dva fragmenty o velikosti 17 bp a 62 bp.

Marker vykazuje kodominantní charakter, takže u heterozygotů by se měly vyskytovat tři fragmenty o velikosti 17 bp, 62 bp a 79 bp. Naproti tomu mutovanou alelu enzym *Eco57I* nebude štěpit vůbec, protože tato alela neobsahuje palindrom, který enzym rozpoznává. V pozici třetího nukleotidu palindromu se totiž u takovýchto alel vyskytuje mutovaný adenin (A) namísto guaninu (G), který je na vyobrazení restričního místa zvýrazněn červeným rámečkem.

4.7.3 Amplifikace fragmentů genu SOD1 pomocí PCR-RFLP

Pro amplifikaci byla použita již zmiňovaná dvojice primerů, jak je publikovali Awano et al. (2009). Reakce probíhala v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad). Její složení je uvedeno v tabulce 10 a teplotní a časové podmínky jsou shrnuty v tabulce 11.

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro amplifikaci PCR-RFLP markeru genu SOD1.

Komponenty reakce	Koncentrace
DNA	20 ng . 12,5 μl^{-1}
Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
KCl	50 mM
primer F	0,4 μM
primer R	0,4 μM
dNTP	200 μM
BSA	5 ng . 12,5 μl^{-1}
enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
<i>Taq</i> polymeráza (Roche)	0,5 U . 12,5 μl^{-1}

Tabulka 11: Teplotní a časový profil amplifikace PCR-RFLP markeru genu SOD1.

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Délka cyklu [min]	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	3	1
denaturace	95	0,5	30
annealing	60	40 sekund	
elongace	72	40 sekund	
závěrečná elongace	72	7	1

4.7.4 Restrikční štěpení PCR fragmentu genu SOD1

Restrikční štěpení probíhalo v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 12. Teplotní a časové podmínky reakcí byly stanoveny na 37 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 7 hodin.

Tabulka 12: Složení reakční směsi pro restrikční štěpení fragmentu genu SOD1.

Komponenty reakce	Množství
PCR produkt	5,15 μl
10 x Puf _r G (Thermo Scientific)	1,2 μl
0,5 mM SAM (Thermo Scientific)	0,24 μl
<i>Eco57I</i> (<i>AcuI</i>) (Thermo Scientific)	0,5 μl
ddH ₂ O	4,91 μl

Pro identifikaci výsledných fragmentů byla použita agarózová elektroforéza. Separace jednotlivých fragmentů probíhala v cele SubCell (BioRad) při konstantním napětí 120 V po dobu 40-ti minut při laboratorní teplotě. Jako separační médium byl využit 5 % agarózový gel s přidavkem 1 x TBE pufru, jehož složení je uvedeno v příloze 2.

Fragmenty DNA byly kvůli zviditelnění obarveny ethidiumbromidem a výsledné elektroforeogramy byly zobrazeny přístrojem GelDoc (BioRad) a zaznamenány pomocí programu QuantityOne (BioRad).

4.8 Detekce kauzální mutace genu DNMI vedoucí k EIC u psů pomocí PCR-RFLP

4.8.1 Navržení PCR-RFLP markeru mutace genu DNMI

Pro navržení PCR-RFLP markeru mutace genu DNMI způsobující výcvikový kolaps (EIC) u psů byly využity informace ze studie Patterson et al. (2008), kde je uvedena přesná lokalizace genu na chromozomu 9. Dále byla pro navržení markeru využita databáze GenBank, kde byla nalezena sekvence genu DNMI pod označením EU707921.

Sekvence nukleotidů, lemující okolí místo kauzální mutace, byla použita pro navržení primerů, který by daný úsek ohraničovaly. Pro navržení takovýchto primerů byl použit program Primer3 Input v.0.4.0 (Rozen a Skaletsky, 2000). Charakteristiky navržených primerů jsou uvedeny na obrázku 12. Jak je patrné z tohoto obrázku, výsledný produkt amplifikace je velký 295 bp.

Sekvence jednotlivých primerů jsou pro přehlednost uvedeny ještě i v následující tabulce 13.

Tabulka 13: Navržené primery pro amplifikaci PCR-RFLP markeru genu DNMI.

Gen	Primer	Sekvence primeru 5' - 3'
DNMI	F	CTTCTTCACCCCACCCTGT
	R	CCTGTTGGTCACCTTCACAA

Enzym *SmlI* bude štěpit mutovanou alelu (T) na dva fragmenty o velikosti 136 bp a 159 bp. U nemutované alely (G) restriční štěpení probíhat nebude, protože neobsahuje specifický palindrom. Naproti tomu u heterozygotů budou po restričním štěpení vznikat tři fragmenty o velikosti 136 bp, 159 bp a 295 bp.

4.8.3 Amplifikace fragmentu genu *DNM1* pomocí PCR-RFLP

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad). Složení amplifikační reakce je popsáno v tabulce 14 a teplotní a časové podmínky jsou charakterizovány v tabulce 15.

Tabulka 14: Složení reakční směsi pro amplifikaci PCR-RFLP markeru genu *DNM1*.

Komponenty reakce	Koncentrace
DNA	20 ng . 12,5 μl^{-1}
Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
KCl	50 mM
primer F	0,2 μM
primer R	0,2 μM
dNTP	200 μM
BSA	5 ng . 12,5 μl^{-1}
enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
<i>Taq</i> polymeráza (Roche)	0,5 U . 12,5 μl^{-1}

Tabulka 15: Teplotní a časový profil amplifikace PCR-RFLP markeru genu *DNM1*.

Proces	Teplota [°C]	Délka cyklu [min]	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	3	1
denaturace	95	0,5	35
annealing	57	40 sekund	
elongace	72	50 sekund	
závěrečná elongace	72	7	1

4.8.4 Restrikční štěpení PCR fragmentu genu DNMI

Restrikční štěpení probíhalo v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad). Teplotní a časové podmínky reakcí byly stanoveny na 55 °C po dobu 16 hodin. Složení reakční směsi pro restrikční štěpení je uvedeno v tabulce 16.

Tabulka 16: Složení reakční směsi pro restrikční štěpení fragmentu genu DNMI.

Komponenty reakce	Množství
PCR produkt	5,15 µl
10 x Pufř Tango (Thermo Scientific)	1,0 µl
<i>SmlI</i> (<i>SmoI</i>) (Thermo Scientific)	0,5 µl
ddH ₂ O	6,0 µl

Pro detekci polymorfismů musela být poté provedena gelová elektroforéza. Separace jednotlivých fragmentů probíhala v cele SubCell (BioRad) při konstantním napětí 120 V po dobu 40 minut. Pro separaci byl použit 4 % agarózový gel v 1 x TBE pufřu, jehož složení je uvedeno v příloze 2.

Fragmenty DNA byly vizualizovány pomocí ethidiumbromidu a elektroforeogramy zaznamenány přístrojem GelDoc (BioRad) s pomocí programu QuantityOne (BioRad).

4.9 Vyhodnocení frekvencí mutovaných a nemutovaných alel genů SOD1 a DNMI z pohledu populační genetiky

Vzhledem k tomu, že oba použité PCR-RFLP markery vykazovaly kodominantní charakter, bylo možné u každého hodnoceného jedince odlišit dominantní a recesivní homozygoty i heterozygoty. Tyto údaje byly vyhodnoceny z hlediska populační genetiky.

4.9.1 Pozorovaná heterozygotnost – H_o

Pozorovaná heterozygotnost je definována jako podíl mezi počtem heterozygotních jedinců v daném markeru z celkového počtu hodnocených jedinců (Paule, 1992). Pro výpočet pozorované heterozygotnosti byl použit vzorec podle Gillet et al. (2005):

$$H_o = \sum_{i < j} p_{ij}$$

4.9.2 Očekávaná heterozygotnost – H_E

Očekávaná heterozygotnost je definována jako hodnota, která odpovídá podílu očekávaných heterozygotů v populaci, jež vykazuje rovnováhu podle Hardy-Weinbergova zákona (Nei, 1972). Pro výpočet očekávané heterozygotnosti byl použit následující vzorec:

$$H_E = 1 - \sum p_i^2$$

4.9.3 Stupeň inbreedingu – F_{IS}

Diplomová práce byla zaměřena na hodnocení alelických frekvencí u plemen psů chovaných člověkem. Lze tudíž předpokládat, že zásah člověka při výběru chovných párů může teoreticky navodit inbreeding v populaci. Z hlediska dvou studovaných genů SOD1 a DNM1 byl koeficient inbreedingu vypočítán podle vzorce, který uvádí Dorak (2004):

$$F_{IS} = \frac{H_E - H_o}{H_E}$$

4.9.4 Simulace dopadu úplné selekce proti homozygotním jedincům nesoucím mutované alely genů SOD1 a DNM1

Vzhledem k tomu, že získané očekávané a pozorované heterozygotnosti nasvědčovaly, že populace byly v rovnováze podle Hardy-Weinbergova zákona, byla provedena matematická simulace snižování frekvence mutované recesivní alely v důsledku 5, 10, 15 a 20 generací úplné selekce vůči jedincům s homozygotní kombinací alel. Pro výpočet byl použit následující vzorec, kde hodnota q_0 odpovídala frekvenci mutované alely ve výchozí generaci populace a hodnota q_n odpovídala frekvenci mutované alely po 5, 10, 15 a 20 generacích (n) úplné selekce:

$$q_n = \frac{q_0}{1 + nq_0}$$

5. VÝSLEDKY

5.1 Variabilita sekvencí genů SOD1 a DNMI stanovená na základě pyrosekvenace

Program GS Reference Mapper (Roche) zpracovává výsledky pyrosekvenace tabulkovou formou.

U genu SOD1 byla pyrosekvenační analýza zaměřena na celý gen mimo exon 1 a intron 1-2. Důvodem, proč byla sekvenována pouze tato část genu, je skutečnost, že sekvence exonu 1, kterou na základě cDNA charakterizovali Green et al. (2002), nebyla doposud lokalizována v celkové sekvenci genomu psa.

U genu DNMI byla pyrosekvenace zaměřena na exony 6 až 10 a na introny, které je oddělují. Důvodem v tomto případě byla skutečnost, že délka celého genu DNMI je rovna 57 930 bp a takovýto úsek DNA nebylo možné celý amplifikovat použitou long-range polymerázou. Sekvenovaná část genu DNMI byla vybrána s ohledem na exon 6, ve kterém se nachází kauzální mutace onemocnění EIC u psů.

5.1.1 Polymorfismy nalezené v pyrosekvenované části genu SOD1

V následujících čtyřech částech tabulky 18 je uveden přehled detekovaných polymorfismů, které byly získány díky programu GS Reference Mapper (Roche) na základě porovnání s referenční sekvencí. Ta byla vytvořena ze sekvence genu SOD1 uvedené v databázi Ensembl pod označením ENSCAFG00000008859.

Pro usnadnění orientace mezi jednotlivými vzorky bylo každému genotypu přiřazeno specifické označení. Jednotlivá označení jsou vysvětlena v následující tabulce číslo 17.

Tabulka 17: Označení jednotlivých vzorků DNA použitých při pyrosekvenaci.

Plemeno	Označení	Popis
border kolie	BOC-KR4	kryptorchismus
border terier	BRT-KR1	kryptorchismus
československý vlčák	ČVS1, ČVS2, ČVS3, ČVS4, ČVS6, ČVS10, ČVS11, ČVS12, ČVS13, ČVS14, ČVS15, ČVS16, ČVS17, ČVS18, ČVS20, ČVS21, ČVS23, ČVS24	-
labradorský retriever	LAB3	-
puďl	P-KR3	kryptorchismus
vlk eurasijský	Canis lupus lupus 27/II, Canis lupus lupus 168/1	-

Tabulka 18 (část 1/4): Detekované polymorfismy v různých částech genu SOD1.

Označení vzorku	Lokalizace polymorfismu		Část sekvence	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení vzorku	Frekvence výskytu polymorfismu [%]
	Začáteční pozice	Koncová pozice					
ČSV10	1067	1067	exon 2	G	A	10	100
ČSV11	1067	1067	exon 2	G	A	6	33
ČSV12	1067	1067	exon 2	G	A	7	100
ČSV14	1067	1067	exon 2	G	A	20	30
ČSV15	1067	1067	exon 2	G	A	9	100
ČSV18	1067	1067	exon 2	G	A	13	100
ČSV23	1067	1067	exon 2	G	A	5	100
ČSV24	1067	1067	exon 2	G	A	2	100
ČSV3	1067	1067	exon 2	G	A	3	100
ČSV4	1067	1067	exon 2	G	A	3	100
ČSV6	1067	1067	exon 2	G	A	8	50
ČSV1	1215	1215	intron 2-3	A	T	7	86
ČSV10	1215	1215	intron 2-3	A	T	9	56
ČSV15	1215	1215	intron 2-3	A	T	15	53
ČSV6	1328	1328	intron 2-3	T	G	7	100
ČSV1	1427	1427	intron 2-3	A	G	6	33
ČSV16	1427	1427	intron 2-3	A	G	8	37
ČSV23	1427	1427	intron 2-3	A	G	9	33
ČSV1	1430	1430	intron 2-3	A	T	6	33

Tabulka 18 (část 2/4): Detekované polymorfismy v různých částech genu SOD1.

Označení vzorku	Lokalizace polymorfismu		Část sekvence	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení vzorku	Frekvence výskytu polymorfismu [%]
	Začáteční pozice	Koncová pozice					
ČSV16	1430	1430	intron 2-3	A	T	8	37
ČSV23	1430	1430	intron 2-3	A	T	9	33
ČSV13	1620	1620	intron 2-3	G	-	2	100
ČSV15	2007	2007	intron 2-3	T	G	23	48
ČSV14	2014	2014	intron 2-3	T	-	35	26
LAB3	2038	2038	intron 2-3	A	C	21	100
ČSV1	2039	2039	intron 2-3	A	T	3	67
Canis lupus lupus 27/II	2039	2039	intron 2-3	A	T	5	80
ČSV1	2180	2180	intron 2-3	A	T	4	75
Canis lupus lupus 168/1	2180	2180	intron 2-3	A	T	11	45
ČSV4	2732	2732	intron 2-3	T	G	7	71
ČSV12	2746	2746	intron 2-3	T	-	9	56
ČSV23	3040	3040	intron 3-4	G	C	6	33
BOC-KR4	3212	3212	intron 3-4	T	C	17	12
BRT-KR1	3589	3589	intron 3-4	T	-	2	100
BOC-KR4	3837	3837	intron 4-5	T	C	12	17
BOC-KR4	3937	3937	intron 4-5	A	C	12	17
ČSV1	4029	4029	intron 4-5	C	G	5	60
ČSV11	4029	4029	intron 4-5	C	G	7	29

Tabulka 18 (část 3/4): Detekované polymorfismy v různých částech genu SOD1.

Označení vzorku	Lokalizace polymorfismu		Část sekvence	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení vzorku	Frekvence výskytu polymorfismu [%]
	Začáteční pozice	Koncová pozice					
ČSV14	4029	4029	intron 4-5	C	G	28	46
ČSV6	4029	4029	intron 4-5	C	G	6	100
BOC-KR4	4029	4029	intron 4-5	C	G	9	56
ČSV21	4201	4202	intron 4-5	AG	-	23	43
LAB3	4388	4388	intron 4-5	A	G	19	16
ČSV6	4475	4475	intron 4-5	-	C	2	100
ČSV14	4497	4498	intron 4-5	TT	-	18	17
ČSV15	4497	4498	intron 4-5	TT	A	17	18
ČSV15	4497	4498	intron 4-5	TT	-	17	29
ČSV24	4497	4497	intron 4-5	T	A	2	100
ČSV3	4498	4498	intron 4-5	T	A	9	22
ČSV3	4498	4498	intron 4-5	T	-	9	56
ČSV17	5819	5819	3' downstream sekvence	A	G	3	67
ČSV11	6690	6690	3' downstream sekvence	A	T	4	75
ČSV15	6702	6702	3' downstream sekvence	A	-	11	27
Canis lupus lupus 168/1	7143	7143	3' downstream sekvence	A	-	11	82
ČSV15	7613	7613	3' downstream sekvence	A	C	6	67
ČSV10	7614	7614	3' downstream sekvence	-	C	3	100
ČSV15	7614	7614	3' downstream sekvence	A	-	6	67

Tabulka 18 (část 4/4): Detekované polymorfismy v různých částech genu SOD1.

Označení vzorku	Lokalizace polymorfismu		Část sekvence	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení vzorku	Frekvence výskytu polymorfismu [%]
Canis lupus lupus 168/1	7614	7614	3' downstream sekvence	A	-	10	40
ČSV4	7616	7616	3' downstream sekvence	A	-	2	100
Canis lupus lupus 27/II	7934	7934	3' downstream sekvence	C	T	2	100

5.1.2 Polymorfismy nalezené v pyrosekvenované části genu DNMI

V následujících šesti částech tabulky 19 je uveden přehled detekovaných polymorfismů, které byly získány díky programu GS Reference Mapper (Roche) na základě porovnání s referenční sekvencí. Ta byla vytvořena z části sekvence genu DNMI uvedené v databázi Ensembl pod označením ENSCAFG00000020082.

Sekvenovány byly stejné vzorky DNA jako u genu SOD1, popsané v předchozí kapitole. Označení jednotlivých vzorků je vysvětleno v tabulce 17.

Tabulka 19 (část 1/6): Detekované polymorfismy v různých částech genu DNMI.

Označení vzorku	Lokalizace polymorfismu		Část sekvence	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení vzorku	Frekvence výskytu polymorfismu [%]
	Začáteční pozice	Koncová pozice					
BRT-KR1	3339	3339	intron 5-6	G	A	2	100
ČSV1	3339	3339	intron 5-6	G	A	2	100
ČSV14	3339	3339	intron 5-6	G	A	8	100
ČSV15	3339	3339	intron 5-6	G	A	7	100
ČSV16	3339	3339	intron 5-6	G	A	2	100
ČSV17	3339	3339	intron 5-6	G	A	2	100
ČSV18	3339	3339	intron 5-6	G	A	2	100
ČSV23	3339	3339	intron 5-6	G	A	2	100
ČSV3	3339	3339	intron 5-6	G	A	2	100
ČSV4	3339	3339	intron 5-6	G	A	3	100
ČSV6	3339	3339	intron 5-6	G	A	2	100
LAB3	3339	3339	intron 5-6	G	A	5	100
Canis lupus lupus 168/1	3339	3339	intron 5-6	G	A	3	100
Canis lupus lupus 27/II	3339	3339	intron 5-6	G	A	4	75
BRT-KR1	3438	3438	exon 6	T	C	2	100
ČSV11	3468	3468	exon 6	C	T	4	50
Canis lupus lupus 168/1	3468	3468	exon 6	C	T	9	56
Canis lupus lupus 168/1	3533	3533	intron 6-7	C	A	12	33
LAB3	3692	3692	exon 7	G	T	3	67

Tabulka 19 (část 2/6): Detekované polymorfismy v různých částech genu DNMI.

Označení vzorku	Lokalizace polymorfismu		Část sekvence	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení vzorku	Frekvence výskytu polymorfismu [%]
	Začáteční pozice	Koncová pozice					
ČSV10	3705	3705	exon 7	C	G	5	40
ČSV15	3705	3705	exon 7	C	G	4	50
ČSV3	3705	3705	exon 7	C	G	3	100
ČSV6	3705	3705	exon 7	C	G	4	50
ČSV10	3786	3786	intron 7-8	A	G	8	25
Canis lupus lupus 168/1	3932	3936	intron 7-8	AGAGC	-	13	46
Canis lupus lupus 168/1	4018	4018	intron 7-8	T	A	11	18
ČSV15	4294	4294	intron 7-8	T	C	5	80
ČSV16	4294	4294	intron 7-8	T	C	2	100
ČSV24	4507	4507	intron 7-8	A	-	2	100
Canis lupus lupus 168/1	4529	4529	intron 7-8	G	A	18	61
ČSV2	4645	4645	intron 7-8	C	-	2	100
ČSV16	4672	4672	intron 7-8	A	-	5	100
ČSV11	4706	4706	intron 7-8	A	G	2	100
ČSV14	4706	4706	intron 7-8	A	G	9	67
ČSV16	4706	4706	intron 7-8	A	G	4	100
ČSV21	4706	4706	intron 7-8	A	G	4	100
ČSV6	4706	4706	intron 7-8	A	G	6	83
Canis lupus lupus 168/1	4706	4706	intron 7-8	A	-	10	40

Tabulka 19 (část 3/6): Detekované polymorfismy v různých částech genu DNMI.

Označení vzorku	Lokalizace polymorfismu		Část sekvence	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení vzorku	Frekvence výskytu polymorfismu [%]
	Začáteční pozice	Koncová pozice					
ČSV14	4708	4718	intron 7-8	AAAGAAA GAAA	-	9	22
Canis lupus lupus 168/1	4718	4718	intron 7-8	A	-	10	80
Canis lupus lupus 168/1	4719	4722	intron 7-8	GAAA	-	10	20
ČSV14	4767	4768	intron 7-8	AA	-	7	43
ČSV4	4767	4768	intron 7-8	AA	-	4	75
ČSV6	4767	4768	intron 7-8	AA	-	5	100
ČSV14	4768	4777	intron 7-8	AGAAAGA AAG	-	7	57
ČSV15	4768	4768	intron 7-8	A	-	2	100
ČSV14	4777	4782	intron 7-8	GAAAAA	-	8	50
ČSV10	5233	5233	intron 8-9	T	C	16	62
ČSV11	5233	5233	intron 8-9	T	C	7	100
ČSV12	5233	5233	intron 8-9	T	C	2	100
ČSV15	5233	5233	intron 8-9	T	C	8	50
ČSV16	5233	5233	intron 8-9	T	C	7	43
ČSV4	5233	5233	intron 8-9	T	C	6	67
ČSV6	5233	5233	intron 8-9	T	C	7	29
Canis lupus lupus 168/1	5233	5233	intron 8-9	T	C	20	100
BRT-KR1	5492	5492	intron 9-10	C	G	2	100
ČSV1	5492	5492	intron 9-10	C	G	2	100

Tabulka 19 (část 4/6): Detekované polymorfismy v různých částech genu DNMI.

Označení vzorku	Lokalizace polymorfismu		Část sekvence	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení vzorku	Frekvence výskytu polymorfismu [%]
	Začáteční pozice	Koncová pozice					
ČSV10	5492	5492	intron 9-10	C	G	9	100
ČSV11	5492	5492	intron 9-10	C	G	3	100
ČSV12	5492	5492	intron 9-10	C	G	2	100
ČSV13	5492	5492	intron 9-10	C	G	2	100
ČSV14	5492	5492	intron 9-10	C	G	15	100
ČSV15	5492	5492	intron 9-10	C	G	9	100
ČSV16	5492	5492	intron 9-10	C	G	4	100
ČSV18	5492	5492	intron 9-10	C	G	5	100
ČSV2	5492	5492	intron 9-10	C	G	3	100
ČSV20	5492	5492	intron 9-10	C	G	2	100
ČSV21	5492	5492	intron 9-10	C	G	11	100
ČSV23	5492	5492	intron 9-10	C	G	7	100
ČSV24	5492	5492	intron 9-10	C	G	9	100
ČSV6	5492	5492	intron 9-10	C	G	5	100
P-KR3	5492	5492	intron 9-10	C	G	8	50
BOC-KR4	5492	5492	intron 9-10	C	G	11	100
LAB3	5492	5492	intron 9-10	C	G	10	100
Canis lupus lupus 168/1	5492	5492	intron 9-10	C	G	23	96
Canis lupus lupus 27/II	5492	5492	intron 9-10	C	G	12	100

Tabulka 19 (část 5/6): Detekované polymorfismy v různých částech genu DNMI.

Označení vzorku	Lokalizace polymorfismu		Část sekvence	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení vzorku	Frekvence výskytu polymorfismu [%]
	Začáteční pozice	Koncová pozice					
ČSV10	5694	5694	intron 10-11	T	C	9	67
ČSV11	5694	5694	intron 10-11	T	C	2	100
ČSV12	5694	5694	intron 10-11	T	C	4	75
ČSV15	5694	5694	intron 10-11	T	C	11	55
P-KR3	5694	5694	intron 10-11	T	C	8	37
BOC-KR4	5694	5694	intron 10-11	T	C	12	67
Canis lupus lupus 168/1	5694	5694	intron 10-11	T	C	16	100
Canis lupus lupus 27/II	5694	5694	intron 10-11	T	C	11	64
BRT-KR1	5698	5698	intron 10-11	G	-	2	100
ČSV1	5698	5698	intron 10-11	G	-	3	100
P-KR3	5744	5744	intron 10-11	A	T	7	86
ČSV10	5746	5746	intron 10-11	-	CA	9	33
ČSV14	5746	5746	intron 10-11	-	CA	8	25
ČSV15	5746	5746	intron 10-11	-	CA	5	40
ČSV21	5746	5746	intron 10-11	-	CA	7	43
ČSV24	5746	5746	intron 10-11	-	CA	3	67
BOC-KR4	5746	5746	intron 10-11	-	CA	8	37
Canis lupus lupus 168/1	5746	5746	intron 10-11	-	CA	7	57
ČSV10	5747	5750	intron 10-11	GGGA	CAGG	9	33

Tabulka 19 (část 6/6): Detekované polymorfismy v různých částech genu DNMI.

Označení vzorku	Lokalizace polymorfismu		Část sekvence	Nukleotid v referenční sekvenci	Nukleotid v sekvenovaném vzorku	Počet čtení vzorku	Frekvence výskytu polymorfismu [%]
	Začáteční pozice	Koncová pozice					
ČSV14	5750	5751	intron 10-11	AG	-	9	22
ČSV15	5750	5751	intron 10-11	AG	-	5	40
ČSV21	5750	5751	intron 10-11	AG	-	7	43
BOC-KR4	5750	5751	intron 10-11	AG	-	8	37
ČSV10	5752	5752	intron 10-11	T	-	10	40
ČSV14	6004	6004	intron 10-11	T	C	7	29
ČSV13	6414	6414	intron 10-11	-	T	2	100
ČSV1	6498	6498	intron 10-11	G	A	3	67

5.2 Haplotypy vyplývající z pyrosekvenace genů SOD1 a DNMI

V metodické části diplomové práce je uvedeno, že haplotypy byly navrženy na základě polymorfních sekvencí získaných z pyrosekvenace 24 genotypů. Haplotyp tudíž představuje hypotetického jedince, který by měl všechny detekované mutace v homozygotní sestavě. Pokud o dvou nebo více jedincích řekneme, že mají shodný haplotyp, znamená to, že se u nich vyskytovala zcela identická kombinace nalezených polymorfismů.

5.2.1 Haplotypy genu SOD1

V následující tabulce číslo 20 je uveden přehled genotypů, které odpovídají jednotlivým haplotypům. Zkratky jednotlivých genotypů jsou vysvětleny v tabulce 17 a referenční sekvence jednotlivých genů jsou zde označeny zkratkou ref.seq..

Tabulka 20 (část 1/2): Přehled pyrosekvenovaných genotypů SOD1 odpovídajících jednotlivým haplotypům.

Gen	Část sekvence	Haplotyp	Genotyp
SOD1	intron 2-3	1	ČSV6
		2	ČSV4
		3	ČSV23, ČSV26
		4	ČSV14
		5	LAB3
		6	Canis lupus lupus 27/II
		7	Canis lupus lupus 168/1
		8	ČSV12
		9	ČSV13
		10	ČSV3, ČSV21, ČSV17, ČSV24, ČSV11, ČSV2, ČSV18, ČSV20, BRT-KR1, P-KR3, BOC-KR4, ref.seq.
		11	ČSV1
		12	ČSV15
		13	ČSV10
	intron 3-4	1	ČSV23
		2	BOC-KR4
		3	BRT-KR1
4		ČSV1, ČSV2, ČSV3, ČSV4, ČSV6, ČSV10, ČSV11, ČSV12, ČSV13, ČSV14, ČSV15, ČSV16, ČSV17, ČSV18, ČSV20, ČSV21, ČSV24, LAB3, P-KR3, Canis lupus lupus 27/II, Canis lupus lupus 168/1	

Tabulka 20 (část 2/2): Přehled pyrosekvenovaných genotypů SOD1 odpovídajících jednotlivým haplotypům.

Gen	Část sekvence	Haplotyp	Genotyp
SOD1	intron 4-5	1	BOC-KR4
		2	ČSV6
		3	ČSV14
		4	ČSV1, ČSV11
		5	ČSV21
		6	LAB3
		7	ČSV3
		8	ČSV24
		9	ČSV15
		10	ČSV4, ČSV10, ČSV12, ČSV13, ČSV17, ČSV23, ČSV16, ČSV2, ČSV18, ČSV20, BRT-KR1, P-KR3, Canis lupus lupus 27/II, Canis lupus lupus 168/1, ref.seq.
	3'downstream sekvence	1	ČSV17
		2	ČSV11
		3	ČSV15
		4	Canis lupus lupus 168/1
		5	ČSV10
		6	ČSV4
		7	Canis lupus lupus 27/II
		8	ČSV3, ČSV14, ČSV6, ČSV21, ČSV12, ČSV13, ČSV24, ČSV1, ČSV23, ČSV16, ČSV2, ČSV18, ČSV20, BRT-KR1, P-KR3, BOC-KR4, LAB3, ref.seq.

5.2.2 Haplotypy genu DNMI

V tabulce 21 je uveden přehled genotypů, které odpovídají jednotlivým haplotypům. Zkratky jednotlivých genotypů jsou vysvětleny v tabulce 17.

Tabulka 21 (část 1/2): Přehled pyrosekvenovaných genotypů DNMI odpovídajících jednotlivým haplotypům.

Gen	Část sekvence	Haplotyp	Genotyp
DNMI	exon 6 + 7	1	BRT-KR1
		2	ČSV11, Canis lupus lupus 168/1
		3	LAB3
		4	ČSV10, ČSV6, ČSV3, ČSV15
		5	ČSV14, ČSV24, ČSV1, ČSV4, ČSV16, ČSV2, ČSV12, ČSV20, ČSV23, ČSV13, ČSV17, ČSV18, ČSV21, P-KR3, BOC-KR4, Canis lupus lupus 27/II, ref.seq.

Tabulka 21 (část 2/2): Přehled pyrosekvenovaných genotypů DNMI odpovídajících jednotlivým haplotypům.

Gen	Část sekvence	Haplotyp	Genotyp
DNM1	intron 7-8	1	ČSV10
		2	Canis lupus lupus 168/1
		3	ČSV15
		4	ČSV16
		5	ČSV12, ČSV18, ČSV20, ČSV23, ČSV3, ČSV17, ČSV13, ČSV2, ČSV1, ČSV24, BRT-KR1, P-KR3, BOC-KR4, ref.seq.
		6	ČSV4
		7	ČSV14
		8	ČSV6
		9	ČSV21, ČSV11
	intron 10-11	1	ČSV13
		2	ČSV2, ČSV4, ČSV6, ČSV16, ČSV20, ČSV23, ČSV3, ČSV17, ČSV18, LAB3, ref.seq.
		3	ČSV1
		4	BRT-KR1
		5	ČSV21
		6	ČSV14
		7	ČSV24
		8	ČSV15, BOC-KR4
		9	Canis lupus lupus 168/1
		10	P-KR3
		11	ČSV10
		12	ČSV11, ČSV12, Canis lupus lupus 27/II

5.2.3 Charakterizace aminokyselin kódovaných haplotypy genů SOD1 a DNMI

Z hlediska dědičnosti a fenotypového projevu se předpokládá, že kauzální mutace obou studovaných genů vykazují recesivní charakter. To znamená, že fenotypový projev onemocnění DM a EIC se projeví u recesivních homozygotů, kteří mají obě dvě alely mutované. Z těchto důvodů byly sekvence exonových částí genu SOD1 a DNMI vyhodnoceny programem BioEdit (Hall, 1999), který provedl simulaci translace. Byly tak získány aminokyselinové sekvence, které odpovídají jedincům s odlišnými haplotypy v exonových částech studovaných genů.

Výsledky této analýzy znázorňují obrázky 14 a 15. Program BioEdit (Hall, 1999) zaznamenává aminokyseliny pomocí mezinárodního kódu IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry – www.iupac.org). Program BioEdit (Hall, 1999) provádí

mnohonásobné srovnávání (alignment) sekvencí na principu vyhledávání oblastí s identickým nebo velmi podobným pořadím aminokyselin.

Na následujících obrázcích 14 a 15 jsou shodné aminokyseliny označeny tečkou. Aminokyselina, která způsobuje variabilitu mezi porovnávanými polypeptidy, je označena písmenným symbolem UIPAC.

5.3 Hodnocení variability pyrosekvenovaných částí genu SOD1 a DNMI pomocí kladogramů

V následujících kapitolách jsou uvedeny a popsány kladogramy u takových částí genů SOD1 a DNMI, kde byl splněn limit minimálního počtu čtyř haplotypů, které umožnily programu MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) provést bootstrapy nutné pro vytvoření stromu.

5.3.1 Kladogramy zpracované na základě sekvencí částí genu SOD1

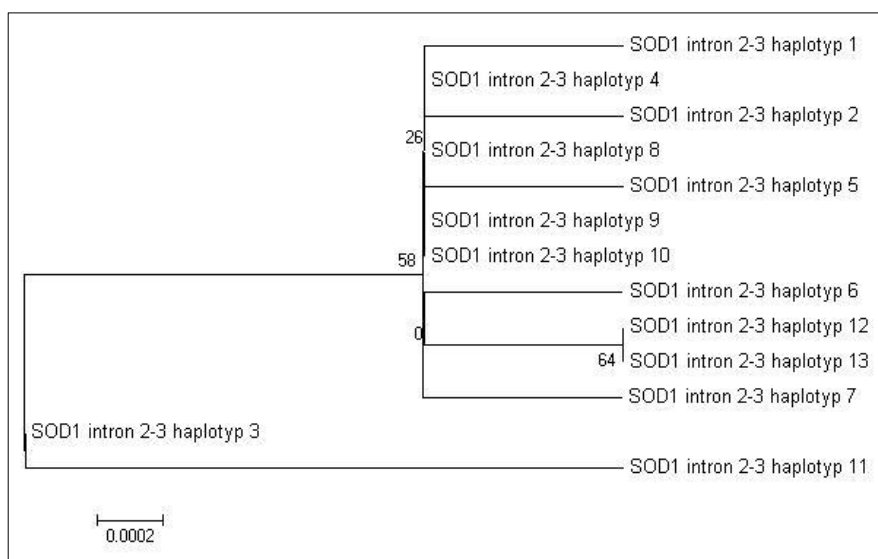
U genu SOD1 byly blíže charakterizovány čtyři části, které budou nyní popsány. Kladogramy znázorňují evoluční podobnosti mezi jednotlivými sekvencemi a vypovídají o jejich možném společném původu. Byly tvořeny pomocí programu MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013), který na základě originálního stromu vyčleňoval dané počty větví. Uvedené kladogramy byly tvořeny pomocí metody maximální věrohodnosti (ML), lišilo se pouze použitím jednotlivých modelů, které jsou uvedeny v tabulce 8.

SOD1 intron 2-3

Kladogram uvedený na obrázku 16 byl vytvořen pomocí metody ML, kde pro vlastní konstrukci stromu byl použit model podle Hasegawa et al. (1985). Tento kladogram vykazuje nejvyšší hodnotu logaritmu pravděpodobnosti -2315,42.

Obrázek 16: Kladogram znázorňující sekvenční podobnosti haplotypů intronu 2-3 genu SOD1.

(výstup z programu MEGA 6.0; Tamura et al., 2013)



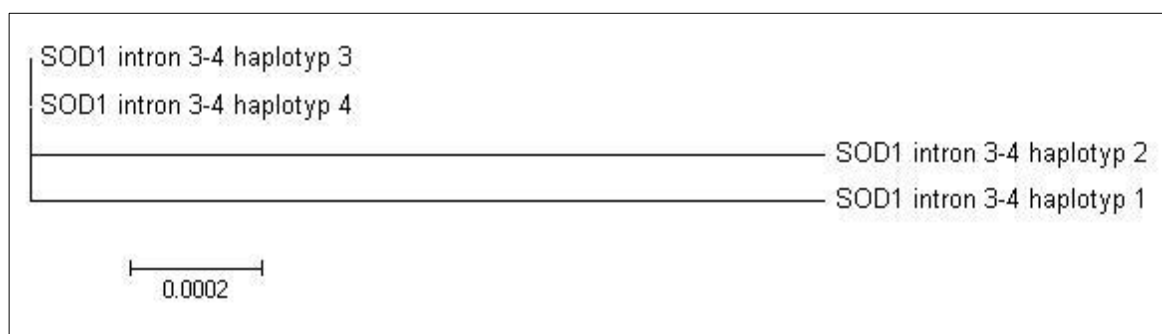
Tento strom znázorňuje skutečnost, že se z haplotypu 3 vyvinuly dvě evoluční větve, kdy se v jedné z nich jako samostatný unikátní vzor vyčlenil haplotyp 11 a ve druhé jsou obsaženy haplotypy zbývající. Ty se ovšem dále dělí na několik sekvenčně bližších skupin, přičemž haplotypy 12 a 13 jsou nejvzdálenější, navzájem jsou si ale sekvenčně podobné.

SOD1 intron 3-4

Pro znázornění kladogramu intronu 3-4 genu SOD1 byl použit model se třemi parametry podle Tamura (1992). Kladogram odpovídá stromu, kde byla stanovena nejvyšší hodnota logaritmu pravděpodobnosti na -1141,55. Strom je uveden na obrázku 17.

Obrázek 17: Kladogram znázorňující sekvenční podobnosti haplotypů intronu 3-4 genu SOD1.

(výstup z programu MEGA 6.0; Tamura et al., 2013)



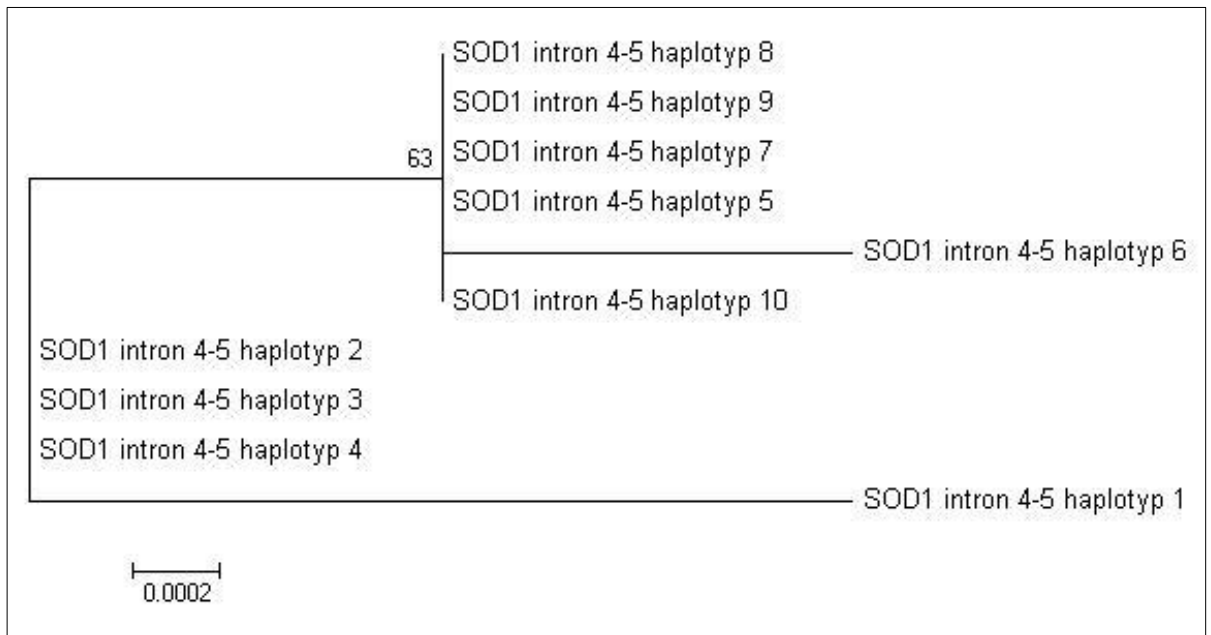
Program MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) vyčlenil tři samostatné větve. Haplotyp 1 a 2 jsou evolučně vzdálené od zbylých dvou haplotypů, mezi kterými byla nalezena větší podobnost. Z kladogramu dále vyplývá, že se haplotypy 1 a 2 vyvinuly z původních haplotypů 3 a 4.

SOD1 intron 4-5

K sestavení kladogramu intronu 4-5 genu SOD1 byl využit tří parametrový model podle Tamura (1992). Kladogram vykazuje nejvyšší hodnotu logaritmu pravděpodobnosti -1440,16 a je znázorněn na obrázku 18.

Obrázek 18: Kladogram znázorňující sekvenční podobnosti haplotypů intronu 4-5 genu SOD1.

(výstup z programu MEGA 6.0; Tamura et al., 2013)



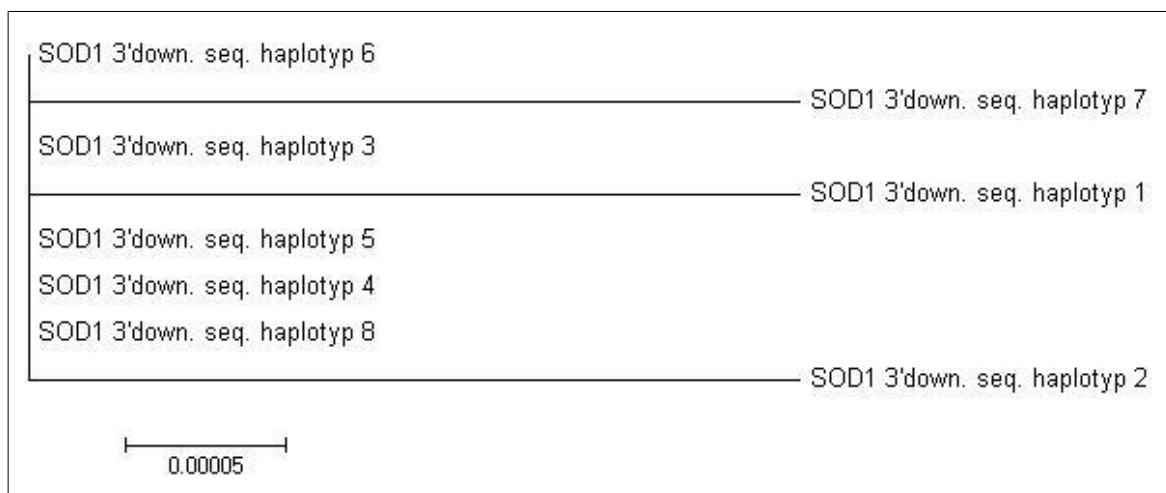
Zde se ze sekvenčně podobných haplotypů 2, 3 a 4 vyčlenily dvě větve: jedna obsahující haplotyp 1 a druhá, která se dále člení na tři skupiny. Haplotyp 6 je sekvenčně nejvzdálenější od původních větví. Obsahuje tedy nejvíce polymorfismů oproti haplotypům 2, 3 a 4.

3'downstream sekvence

Na obrázku 19 je znázorněn kladogram, který byl sestaven pomocí modelu se třemi parametry podle Tamura (1992). Tento kladogram odpovídá stromu s nejvyšší hodnotou logaritmu pravděpodobnosti -5679,31.

Obrázek 19: Kladogram znázorňující sekvenční podobnosti haplotypů 3'downstream sekvence za genem SOD1.

(výstup z programu MEGA 6.0; Tamura et al., 2013)



Program MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) samostatně vyčlenil tři haplotypy, a to haplotyp 1, 2 a 7. Zbylé haplotypy byly vyhodnoceny jako sekvenčně podobné, nevyskytovaly se mezi nimi tedy výrazné rozdíly v jednotlivých polymorfismech.

5.3.2 Kladogramy zpracované na základě sekvencí částí genu DNMI

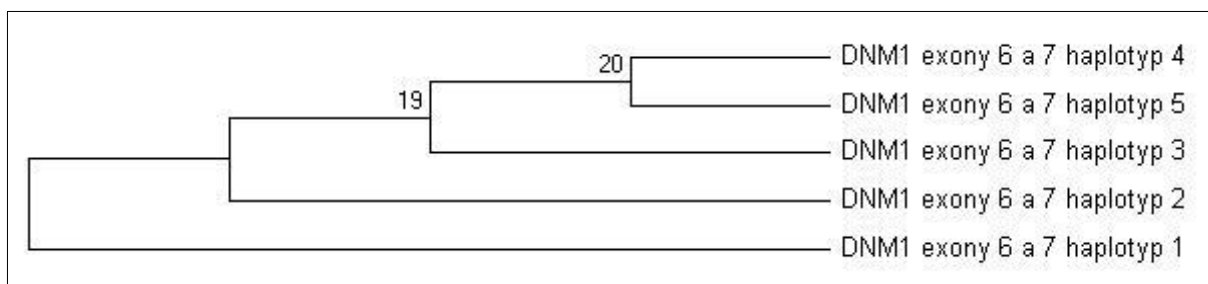
Kladogramy byly vytvořeny programem MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013), který na základě originálního stromu vyčleňoval daný počet evolučně rozdílných větví. Uvedené kladogramy byly sestaveny pomocí metody maximální věrohodnosti (ML), lišilo se pouze použitím jednotlivých modelů, uvedených v tabulce 8.

DNM1 exon 6 + 7

Pro konstrukci kladogramu byl použit model podle Jukes a Cantor (1969). Nejvyšší hodnota logaritmu pravděpodobnosti je rovna nule. To znamená, že je 100 % pravděpodobné, že při daném evolučním modelu tento strom mohl dát vzniknout uváděným datům. Tento kladogram je znázorněn na obrázku 20.

Obrázek 20: Kladogram znázorňující sekvenční podobnosti haplotypů exonu 6 a exonu 7 genu DNM1.

(výstup z programu MEGA 6.0; Tamura et al., 2013)



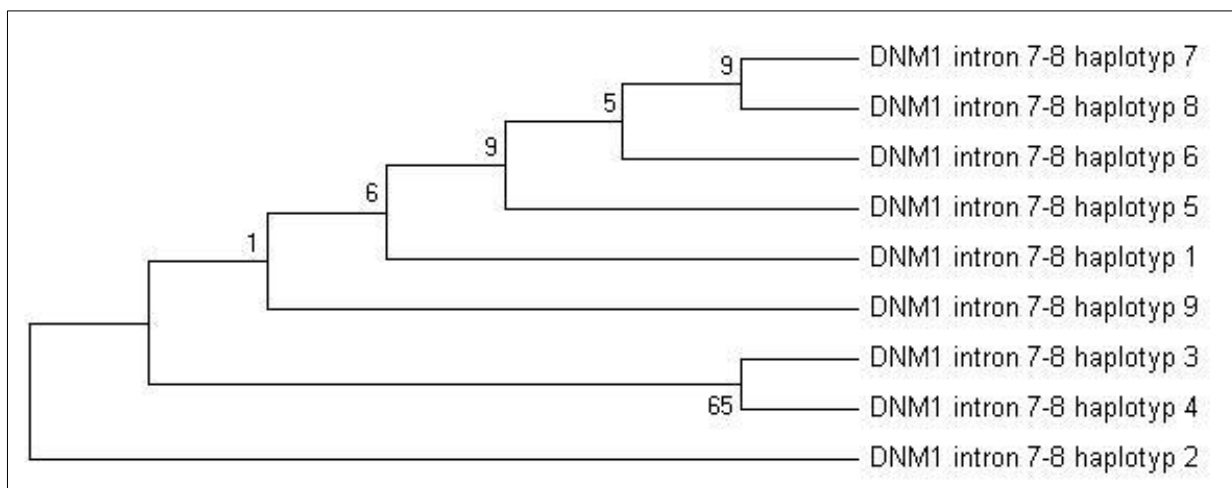
Program zprvu vyčlenil dvě samostatné větve, kde se haplotyp 1 nejvíce odlišuje od všech ostatních. Z druhé větve byl dále vydělen haplotyp 2 a následně se větev opět rozdělila na dvě ramena. Haplotyp 3 byl rozlišen jako sekvenčně unikátní a u haplotypů 4 a 5 byla zjištěna sekvenční podobnost, nicméně vykazují největší sekvenční vzdálenost od haplotypu 1.

DNM1 intron 7-8

Evoluční podobnosti haplotypů intronu 7-8 genu DNM1 byly zkoumány pomocí modelu podle Jukes a Cantor (1969). Byl sestaven kladogram, který vykazuje nejvyšší hodnotu logaritmu pravděpodobnosti rovnou nule. Je znázorněn na obrázku 21.

Obrázek 21: Kladogram znázorňující sekvenční podobnosti haplotypů intronu 7-8 genu DNM1.

(výstup z programu MEGA 6.0; Tamura et al., 2013)



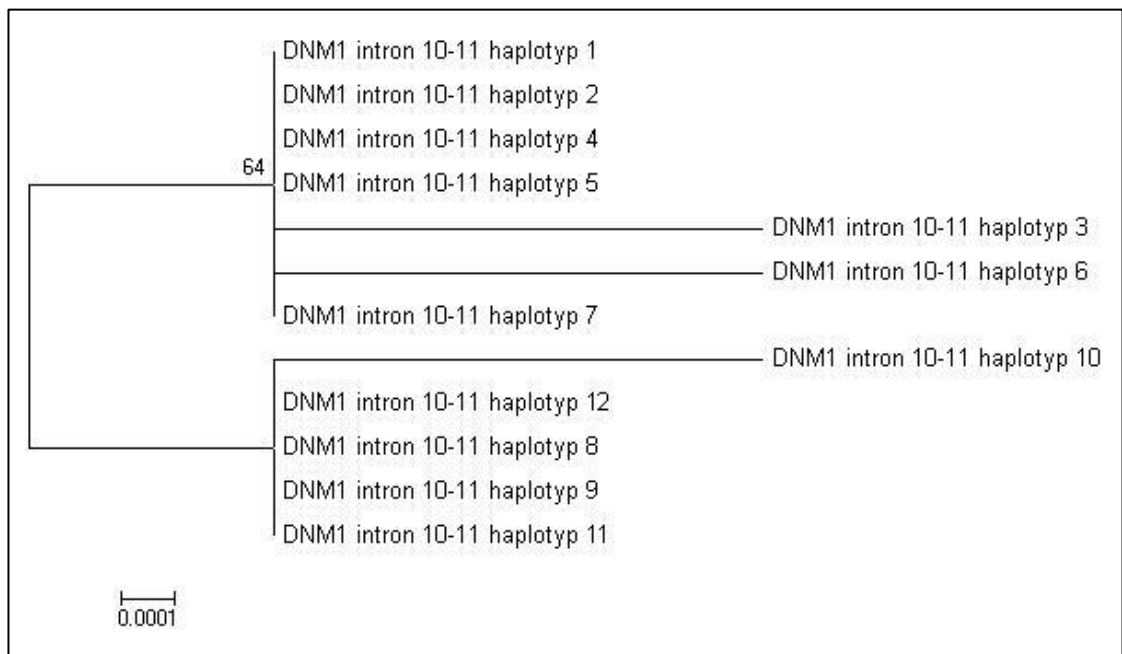
Na základě originálního stromu byly programem MEGA6 (Tamura et al., 2013) odlišeny dvě původní větve. Samostatně se vyčlenil haplotyp 2 a druhá větev se dále dělila na sekvenčně příbuzné haplotypy 3 a 4 a na další větev, která obsahuje haplotypy zbývající. Evolučně nejvzdálenější od původní větve jsou haplotypy 7 a 8.

DNM1 intron 10-11

Pro konstrukci kladogramu byl použit model podle Jukes a Cantor (1969). Tento strom vykazoval nejvyšší hodnotu logaritmu pravděpodobnosti rovnou nule. Kladogram je znázorněn na obrázku 22.

Obrázek 22: Kladogram znázorňující sekvenční podobnosti haplotypů intronu 10-11 genu DNM1.

(výstup z programu MEGA 6.0; Tamura et al., 2013)



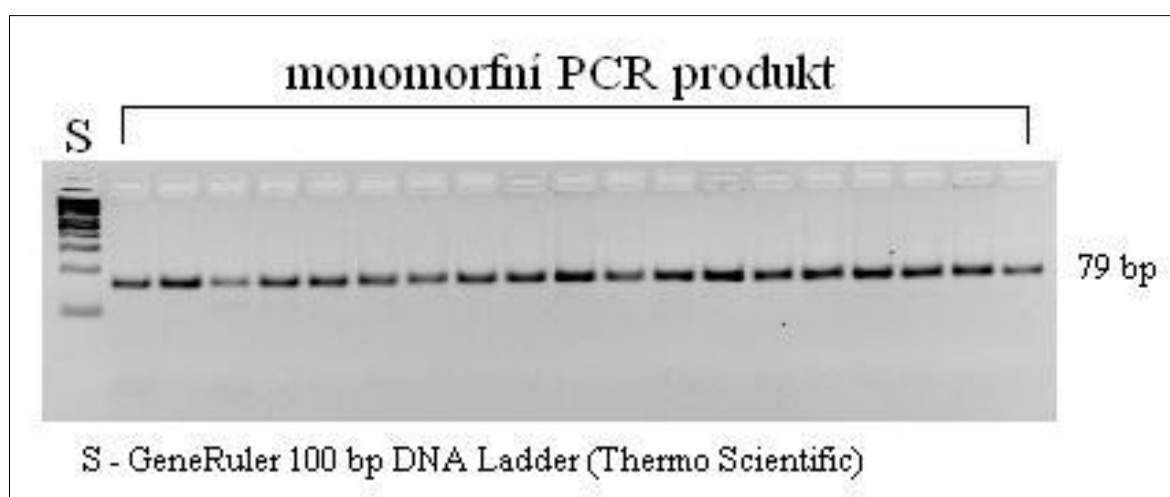
Na základě originálního stromu byly vyčleněny dvě evoluční větve. Z jedné se samostatně oddělil haplotyp 10 a zbývající haplotypy 8, 9, 11 a 12 jsou si sekvenčně blízké. Druhá větev v sobě zahrnuje haplotypy 3 a 6, které mezi sebou vykazují sekvenční podobnost, a zbylé haplotypy nevykazující výrazné evoluční rozdíly.

5.4 Kauzální mutace genu SOD1 způsobující DM

5.4.1 Detekované alely PCR-RFLP markeru genu SOD1

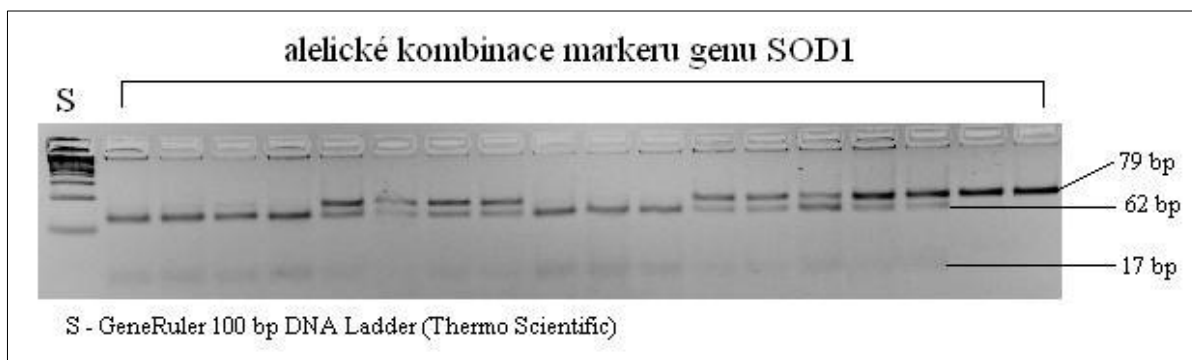
Gelovou elektroforézou bylo ověřeno, že použitá dvojice primerů (F – 5' AGTGGGCCTGTTGTGGTATCA 3'; R – 5' CTCCAAACTGATGGACGTGGAAT 3'; Awano et al., 2009) amplifikuje předpokládaný fragmentu o velikosti 79 bp. Tento produkt byl monomorfní, což znamená, že u všech jedinců bez ohledu na plemeno vznikl pouze jeden amplikon s požadovanou velikostí. Vzorový elektroforeogram, ze kterého je patrna velikost fragmentu před štěpením, je uveden na obrázku 23.

Obrázek 23: Elektroforeogram PCR-RFLP markeru genu SOD1 před restričním štěpením.



PCR-RFLP marker, který fungoval na principu specifického štěpení enzymem *Eco57I* vykazoval předpokládanou specifičnost, která korelovala s výsledky pyrosekvenace. To znamená, že u jedinců s oběma nemutovanými alelami (G/G) docházelo ke štěpení amplikonů na dva fragmenty o velikosti 16 bp a 72 bp. Jedinci, kteří byli nositelé obou mutovaných alel (A/A), byli charakterističtí tím, že u PCR amplikonu nedocházelo ke štěpení. Jedinci, kteří byli z hlediska této mutace heterozygoti (G/A), měli v elektroforetickém profilu jeden původní fragment 79 bp a dva produkty restričního štěpení 17 bp a 62 bp. Vzorový elektroforeogram je uveden na obrázku 24.

Obrázek 24: Elektroforeogram PCR-RFLP markeru genu SOD1 po restričním štěpení.



5.4.2 Frekvence výskytu mutovaných alel genu SOD1 v modelových populacích psů a jejich hodnocení z hlediska populační genetiky

V této části diplomové práce byla testována plemena border kolie, bearded kolie, labradorský retriever a československý vlčák. U těchto plemen zatím nebyl v literárních zdrojích popsán výskyt kauzální mutace genu SOD1, která zde byla studována. Při hodnocení jejich genotypů pomocí PCR-RFLP markeru dané mutace nebyla ani u jednoho jedince plemen border kolie, bearded kolie a labradorských retrieverů detekována mutovaná alela.

Ze studovaných plemen se mutovaná alela genu SOD1 vyskytovala pouze u plemene československý vlčák (ČSV). V následujících tabulkách 22 a 23 je uveden přehled výskytu mutovaných a nemutovaných alel genu SOD1 u československého vlčáka. Vzhledem k tomu, že se jedná u mutaci typu substituce, je mutace charakterizována přímo sekvenčním polymorfismem. Nemutovaná alela je označena jako G, mutovaná jako A.

Tabulka 22: Skutečné četnosti a relativní frekvence výskytu kauzální mutace genu SOD1.

Genotyp	Skutečná četnost výskytu	Frekvence výskytu
G/G	559 jedinců	0,5579
G/A	384 jedinců	0,3832
A/A	59 jedinců	0,0589

Tabulka 23: Alelické frekvence markeru genu SOD1.

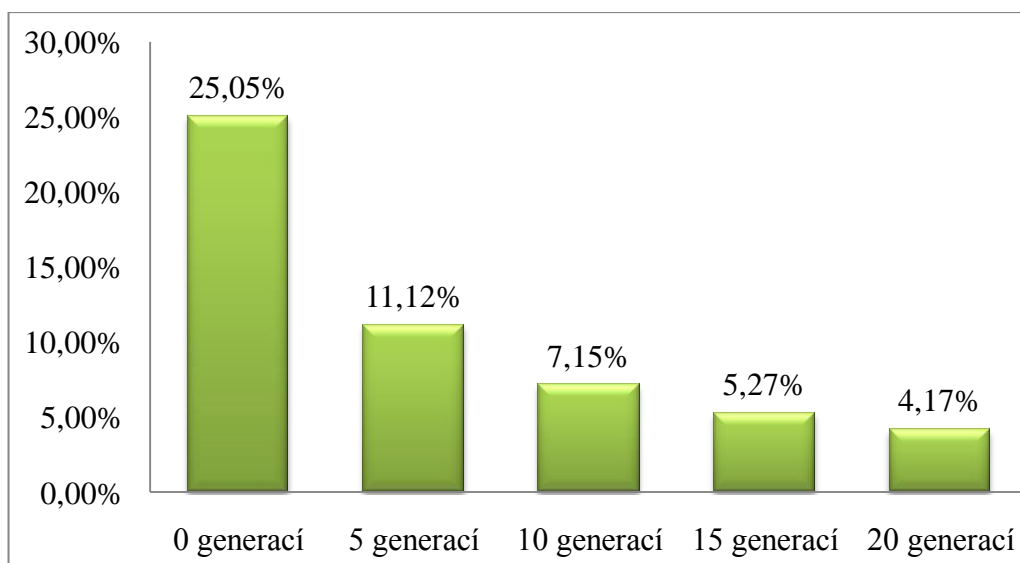
Alela	Charakter dědičnosti	Frekvence výskytu
G – nemutovaná	dominantní	0,7495
A – mutovaná	recesivní	0,2505

Z alelických frekvencí a genotypových frekvencí byly stanoveny hodnoty heterozygotnosti modelové populace československého vlčáka. Pozorovaná heterozygotnost (H_O) byla rovna 0,3755. Očekávaná heterozygotnost (H_E) při platnosti rovnováhy podle Hardy-Weinbergova zákona je rovna 0,3832. Rozdíly mezi H_E a H_O jsou minimální, a proto můžeme nazvat populaci ČSV z hlediska distribuce alel a genotypů markerů genů SOD1 za rovnovážnou podle Hardy-Weinbergova zákona.

Hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti byly použity pro výpočet hodnoty stupně inbreedingu (F_{IS}), který pro tento marker v populaci československého vlčáka dosáhl hodnoty 0,02, což je hodnota velmi nízká. Proto lze prohlásit, že tato modelová populace nebyla inbrední.

Dále byla testována modelová situace, jak by se změnila frekvence mutované alely, kdyby pro ní byla vedena úplná selekce. Tento případ měl testovat, jestli je vhodné takovou selekci vést, a to především z chovatelského hlediska. Vzhledem k tomu, že v České republice (ani v jiných státech) není testování zástupců československého vlčáka pro zjištění mutace genu SOD1 vedoucí k DM povinné před zařazením do reprodukce, není tak vůbec regulován výskyt tohoto onemocnění. Pokud by ovšem byla prováděna úplná selekce proti recesivním homozygotům, frekvence mutované alely by se v populaci výrazně snížila, dokonce až o necelých 21 %, jak je patrné z grafu 1. Je důležité zdůraznit, že tento stav je vyjádřen pro panmiktickou populaci. Pokud by tedy byla úplná selekce prováděna v řízeném chovu, frekvence recesivní alely by klesla ještě více a její snižování by bylo rychlejší.

Graf 1: Dopad úplné selekce proti recesivním homozygotům (A/A) na výskyt mutované alely genu SOD1 v populaci československého vlčáka.

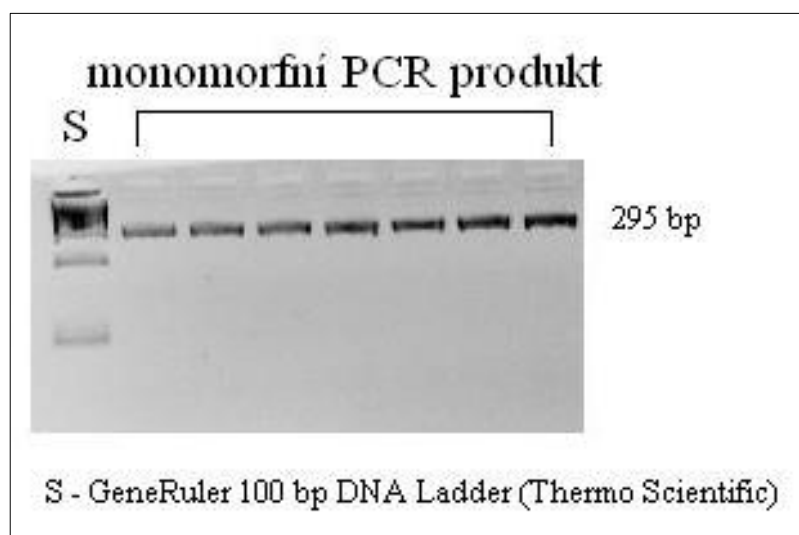


5.5 Kauzální mutace genu DNMI způsobující EIC

5.5.1 Detekované alely PCR-RFLP markeru genu DNMI

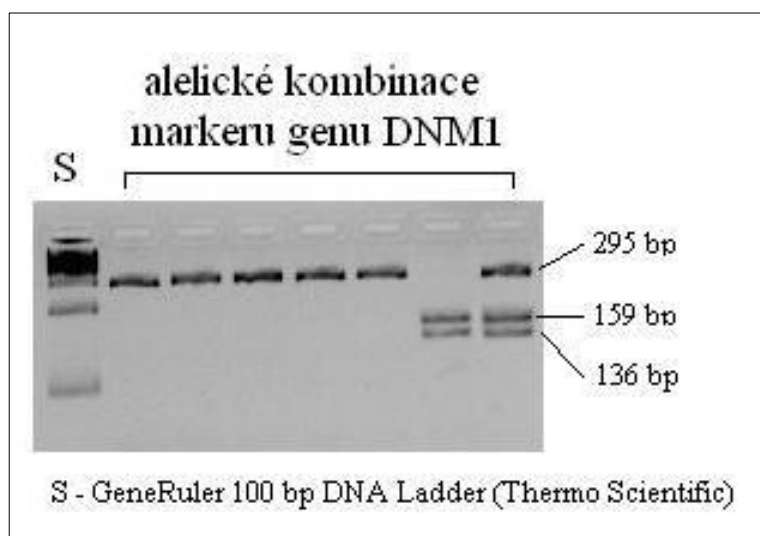
Gelovou elektroforézou bylo ověřeno, že použitá dvojice navržených primerů (F – 5' CTTCTTCACCCCACCCTGT 3'; R – 5' CCTGTTGGTCACCTTCACAA 3') amplifikuje předpokládaný fragmentu o velikosti 295 bp. U všech jedinců (bez ohledu na plemeno) vznikl opět pouze jeden fragment předpokládané velikosti. Vzorový elektroforeogram, na kterém je znázorněna i velikost fragmentu před restričním štěpením, je uveden na obrázku 25.

Obrázek 25: Elektroforeogram PCR-RFLP markeru genu DNMI před restričním štěpením.



Restriční štěpení bylo provedeno pomocí enzymu *SmlI* a předpokládané výsledky se shodovaly s výsledky pyrosekvenace. Tedy u jedinců s oběma nemutovanými alelami (G/G) restriční štěpení neprobíhalo a na gelu byl detekován pouze jeden původní fragment o velikosti 295 bp. U jedinců s oběma alelami mutovanými (T/T) docházelo ke štěpení amplikonů na dva fragmenty o velikosti 136 bp a 159 bp. Naproti tomu u heterozygotů (G/T) byly detekovány tři fragmenty o velikostech 136 bp, 159 bp a 295 bp. Vzorový elektroforeogram je uveden na obrázku 26.

Obrázek 26: Elektroforeogram PCR-RFLP markeru genu DNMI po restriktivním štěpení.



5.5.2 Frekvence výskytu mutovaných alel genu DNMI v modelových populacích psů a jejich hodnocení z hlediska populační genetiky

V diplomové práci byla taktéž testována plemena border kolie, bearded kolie, labradorský retriever a československý vlčák, avšak mutace genu DNMI způsobující EIC byla potvrzena pouze u plemene labradorský retriever. V následujících tabulkách 24 a 25 je uveden přehled výskytu mutovaných a nemutovaných alel genu DNMI u labradorského retrievera. Vzhledem k tomu, že se opět jedná u mutaci typu substituce, je mutace charakterizována přímo sekvenčním polymorfismem. Nemutovaná alela je označena jako G, mutovaná jako T.

Tabulka 24: Skutečné četnosti a relativní frekvence výskytu kauzální mutace genu DNMI.

Genotyp	Skutečná četnost výskytu	Frekvence výskytu
G/G	62 jedinců	0,6327
G/T	32 jedinců	0,3265
T/T	4 jedinců	0,0408

Tabulka 25: Alelické frekvence markeru genu DNMI.

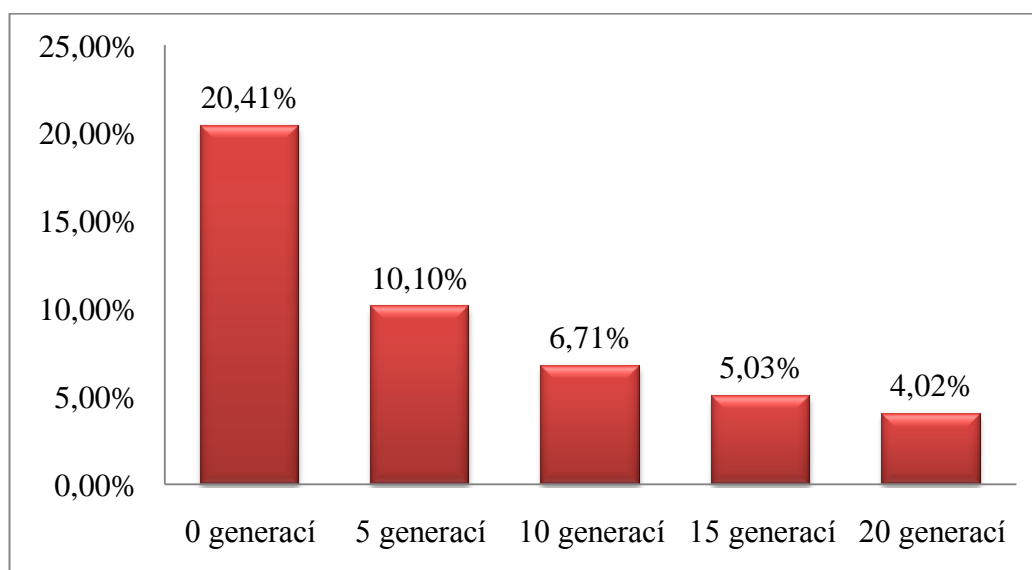
Alela	Charakter dědičnosti	Frekvence výskytu
G – nemutovaná	dominantní	0,7959
T – mutovaná	recesivní	0,2041

Z těchto vypočítaných alelických a genotypových frekvencí byly stanoveny hodnoty heterozygotnosti modelové populace labradorského retrievera. Pozorovaná heterozygotnost (H_O) byla vypočítána na 0,3248 a očekávaná heterozygotnost (H_E) při platnosti Hardy-Weinbergova zákona, se rovná 0,3265. Jak je patrné, rozdíly mezi H_E a H_O jsou minimální, proto můžeme nazvat populaci labradorů z hlediska distribuce alel a genotypů markerů genu DNMI za rovnovážnou podle Hardy-Weinbergova zákona.

Hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti byly použity pro výpočet hodnoty stupně inbreedingu (F_{IS}), který se v populaci labradorských retrieverů rovnal 0,0052. To je hodnota v podstatě zanedbatelná.

Také byl testován případ vlivu úplné selekce proti recesivní alele. Situace měla simulovat stav, kdy by chovatelé vyřazovali z chovu recesivní homozygoty v mutované alele T po dobu 5, 10, 15 a 20 generací. Výrazný pokles frekvence recesivní alely je znázorněn na grafu 2. Frekvence klesla z původních 20,41 % až na 4,02 %.

Graf 2: Dopad úplné selekce proti recesivním homozygotům (T/T) na výskyt mutované alely genu DNMI v populaci labradorských retrieverů.



6. DISKUZE

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na studium dvou genů, které způsobují závažné a neléčitelné onemocnění psů (*Canis lupus familiaris* L.).

Prvním studovaným genem byl SOD1, který byl zvolen jako kandidátní gen pro rozvoj degenerativní myelopatie (DM) u psů (Awano et al., 2009). Toto neurodegenerativní onemocnění může způsobit úplnou ztrátu pohyblivosti psa (Coates et al., 2009). Příčinou je mutace v exonu 2 genu SOD1 na pozici 118. nukleotidu, spočívající v substituci kyseliny glutamové v aminokyselinové sekvenci za lysin (Awano et al., 2009). Podobné onemocnění bylo popsáno i u člověka, avšak u lidí je kyselina glutamová v proteinu nahrazena glycinem. Mutace v genu SOD1 způsobující tuto záměnu je spojována s lidskou amyotrofičnou laterální sklerózou (ALS) (Deng et al., 1993). Toto onemocnění má podobné projevy i průběh jako DM a vzhledem k tomu, že je to nemoc také neléčitelná, pacient (stejně jako pes) na ni umírá do tří až pěti let (Shelton et al., 2012; Coates a Wininger, 2010). Proto byl pro výzkum v diplomové práci zvolen právě gen SOD1, neboť je to kandidátní gen těchto onemocnění, který se vyskytuje v genomu psa i člověka, a poznatky o jeho polymorfismech jsou tedy aplikovatelné ve veterinární i humánní medicíně.

Druhý gen, který jsem zahrнула do experimentů, je gen DNMT1. Mutace v exonu 6 na pozici 767. nukleotidu způsobuje u psů syndrom výcvikového kolapsu (EIC), jak popsali Patterson et al. (2008). Vlivem této mutace dojde k substituci argininu leucinem v pozici 256. aminokyseliny proteinového produktu vznikajícího podle tohoto genu.

6.1 Volba modelových plemen zahrnutých do experimentů

6.1.1 Volba modelových plemen pro studium kauzální mutace genu SOD1

Kauzální mutace SOD1 způsobující DM u psů byla popsána v roce 2009 ve studii Awano et al. (2009), avšak toto onemocnění jako takové bylo poprvé charakterizováno již v roce 1973 ve studii D. R. Averilla (1973). Nejprve byla DM spojována pouze s německým ovčákem (Braun a Vandeveld, 1978; Waxman et al., 1980), nicméně postupem času začala být popisována u mnoha dalších plemen psů (Kathmann et al., 2006; Miller et al., 2009; Wininger et al., 2011).

Do experimentů v diplomové práci pro studium mutací genu SOD1 byla zahrnuta následující plemena – československý vlčák, labradorský retriever, border kolie, bearded kolie, border terier, pudl a vlk eurasijský.

Předpokládala jsem, že se u československého vlčáka dá výskyt DM očekávat, neboť toto plemeno vzniklo křížením německých ovčáků s eurasijským vlkem. I když ve vědecké literatuře DM u československého vlčáka zatím nebyla popsána, zvýšený zájem majitelů a chovatelů tohoto plemene o otestování populace psů byl pro jeho zařazení do experimentů dostatečným podnětem. Do testování bylo zahrnuto celkem 1002 jedinců tohoto plemene.

Dalším testovaným plemenem byl labradorský retriever, který byl do experimentů zařazen hlavně kvůli popisovanému výskytu EIC a s tím spojené mutace v genu DNMI. Nicméně i DM již byla popsána u jednoho plemene retrieverů, a to u chesapeake bay retrieverů (Coates et al., 2009). Do analýz bylo zahrnuto celkem 98 labradorských retrieverů.

Plemena border kolie a border terier byla do experimentů zařazena s ohledem na jinou diplomovou práci, řešenou na stejném školícím pracovišti. U těchto plemen nebyl zatím popsán výskyt DM a ani zde nebyl detekován žádný jedinec s danou mutací způsobující toho onemocnění. Stejně tak pudl byl vybrán pro jinou diplomovou práci pro studium kryptorchismu, ale byl u něj již výskyt DM dokumentován, jak uvádějí Matthews a Lahunta (1985).

6.1.2 Volba modelových plemen pro studium kauzální mutace genu DNMI

Soubor psů a vlků, který se využíval pro analýzy genu SOD1 byl použit i pro sekvenaci genu DNMI. Sekvenovány byly tedy vzorky od stejných jedinců jako v předchozím případě.

Výskyt EIC je popisován u labradorů (Taylor et al., 2008; Minor et al., 2011), u plemen jim příbuzných a u jejich kříženců (Furrow et al., 2013). I zde byl potvrzen výskyt EIC u labradorského retrievera, který byl zařazen do pyrosekvenačních analýz. U žádného dalšího plemene psů, které byly v diplomové práci testovány, nebyl v literatuře popsán výskyt EIC.

6.2 Analýzy studovaných genů pomocí pyrosekvenace

6.2.1 Analýzy genu SOD1 pomocí pyrosekvenace

Sekvenován byl celý gen SOD1 s výjimkou exonu 1 a části intronu 1-2. Sekvence těchto úseků totiž ještě nebyla přesně určena. Green et al. (2002) sice na základě cDNA sekvenci exonu 1 charakterizovali, nicméně ta zatím nebyla v celkové sekvenci psího genomu lokalizována. Ačkoli jsem v experimentech navrhovala primery, které by danou neosekvenovanou oblast ohraničovaly, amplifikace těchto úseků se nezdařila. I když byla použita long-range polymeráza, neznámý úsek může být velice dlouhý nebo primery mohly nasedat nespécificky. Exon 1 genu SOD1 nebyl tedy přesně identifikován, a proto jeho sekvence uváděná například v databázi Ensembl je pouze predikovaná.

Kauzální mutaci G→A v exonu 2 genu SOD1 jsem pomocí pyrosekvenace odhalila pouze u 11 zástupců československého vlčáka. Tato mutace způsobuje změnu aminokyselinové sekvence na pozici 40, a to záměnu kyseliny glutamové za lysin (Awano et al., 2009). Tato substituce byla detekována, ale vzhledem tomu, že byla sekvenována pouze část genu od začátku exonu 2, byla mutace v aminokyselinové sekvenci vyhodnocena na pozici 16. Simulace translace byla provedena pomocí programu BioEdit (Hall, 1999). Sekvence proteinu se shodují s aminokyselinovou sekvencí uváděnou ve studii Green et al. (2002).

Další mutace v tomto genu byly zaznamenány v intronových částech. Byla sekvenována také intergenová oblast za 3' koncem genu (3' downstream sekvence). Z vědecké literatury je ale známo mnoho mutací v exonech genu SOD1. Popisovány jsou ve spojitosti s výskytem ALS u člověka (Rowland a Shneider, 2001; Wininger et al., 2011; Battistini et al., 2012). Například v exonu 2 u lidského genu SOD1 byla v letošním roce charakterizována mutace, způsobující novou odlišnou formu ALS (Dangoumau et al., 2014). Naproti tomu Rosen et al. (1993) uvádějí, že až 80 % případů vzniku ALS je podmíněno mutacemi v jiných genech, než je SOD1, které doposud nebyly identifikovány jako kandidátní v souvislosti s tímto onemocněním.

Při pyrosekvenaci nebyla zjištěna mutace na pozici 52. nukleotidu, jak ji popsali Wininger et al. (2011). Tato mutace způsobuje záměnu threoninu za serin v aminokyselinové sekvenci na pozici 18 a byla zatím popsána pouze u bernského salašnického psa. Zda-li je mutace charakteristická pouze pro toto plemeno či plemena jemu příbuzná, nemohu

na základě výsledků svých experimentů určit, protože do nich takováto plemena nebyla zařazena.

6.2.2 Analýzy genu DNMI pomocí pyrosekvence

Kvůli velikosti genu DNMI byla sekvenována pouze jeho část, a to exony 6 až 10 a introny, které je oddělují. Sekvenován byl i intron 10-11. Naprostá většina mutací byla detekována právě v intronech a neměla vliv na změnu sekvence proteinu.

Kauzální mutace genu DNMI pro vznik EIC byla potvrzena pouze u labradorského retrievera. Avšak program GS Reference Mapper (Roche) přiřadil tomuto vzorku danou mutaci G/T na pozici 3692, která ovšem odpovídá exonu 7 podle sekvence genu DNMI v databázi Ensembl. U tohoto labradora byl znám fenotypový projev a pes skutečně výcvikovým kolapsem trpěl. Daná mutace se má ale nacházet v exonu 6, jak popsali Patterson et al. (2008). Tato nesrovnalost je způsobena skutečností, že u genu DNMI jsou v databázi Ensembl popisovány dvě alternativy transkriptů lišící se počtem kódovaných aminokyselin. Vzhledem k tomu, že v diplomové práci byl sekvenován gen DNMI po intron 10-11, bylo nutné orientovat se podle delšího transkriptu, protože kratší fragment této délky nedosahoval.

V exonu 6, jak ho určil GS Reference Mapper (Roche), se vyskytovaly další dvě mutace u tří jedinců a v exonu 7 byla detekována jedna mutace u čtyř jedinců. Ani jeden z těchto polymorfismů neovlivnil aminokyselinové složení proteinu, pouze kromě zmiňované kauzální mutace u labradora, kde došlo k nahrazení argininu leucinem v pozici 59. aminokyseliny. Je třeba brát v potaz, že toto číslování je pouze orientační a nevypovídá o skutečné pozici mutace, protože byly sekvenovány pouze exony 6 a 7 a do aminokyselin se tedy překládaly pouze jejich triplety.

6.3 Analýzy studovaných genů pomocí kladogramů

Kladogramy vypovídají o možném společném původu jednotlivých větví, které program MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) vyčlení na základě originálního stromu. Pro vyhodnocení podobnosti mezi sekvencemi bylo nutné vytvořit jednotlivé haplotypy, které následně mohly být analyzovány. Zdůrazňuji, že haplotyp neodpovídá konkrétním alelickým kombinacím u jednotlivých jedinců, ale představuje sekvenci hypotetického jedince, který by měl všechny studované mutace v homozygotní sestavě.

Vzhledem k relativně nízkému počtu mutací, které byly detekované v jednotlivých částech genů SOD1 a DNMI pomocí pyrosekvence, nebylo možné u všech vzorků sestavit dostatečný počet haplotypů nutný ke tvorbě kladogramu. Nebylo ani možné sestavit kladogram pro haplotypy aminokyselinových sekvencí, neboť většina mutací byla detekována v intronech a neovlivnila složení proteinu. U genu SOD1 tak vznikly pouze dvě varianty proteinů, a to nemutovaná varianta s haplotypem referenční sekvence a druhá mutovaná varianta, která odpovídala haplotypům jedinců s kauzální mutací pro DM. Stejně tomu bylo i u genu DNMI, kde však druhý haplotyp odpovídal jedincům s kauzální mutací pro EIC.

Do kladogramů jsou haplotypy rozdělovány na základě sdílených sekvencí respektive na porovnávání jednotlivých polymorfismů. Geny SOD1 a DNMI tak byly rozdělovány na základě jednotlivých SNP a několika delecí a inzercí, které se objevovaly v intronech (kromě již zmiňované mutace v exonu 2 u SOD1 a v exonu 6 a 7 u DNMI). Čím více samostatně stojí jednotlivé větve kladogramu, tím obsahují více polymorfismů oproti ostatním sekvencím. Což může také souviset s délkou studované sekvence, protože počet možných mutací je přímo úměrný rostoucí délce sekvence DNA.

Nicméně kladogramy se využívají při hodnocení fylogenetického vývoje jednotlivých sekvencí, což ovšem nebylo hlavním zájmem této diplomové práce.

6.4 Analýzy studovaných genů pomocí PCR-RFLP

6.4.1 Analýzy genu SOD1 pomocí PCR-RFLP

Mutace genu SOD1 způsobující DM u psů byla hodnocena také pomocí PCR-RFLP. Pro amplifikaci fragmentů byly použity primery, jejichž sekvence uvádí Awano et al. (2009). V této studii však nebyl navrhnut molekulární marker, který by mutaci spolehlivě detekoval. Proto jsem na základě sekvence mRNA genu SOD1, kterou aktualizovali Crisp et al. (2013) a která je uvedena v databázi GenBank pod označením NM_001003035.1, určila místa nasedání primerů a zjistila, že výsledný produkt amplifikace bude mít velikost 79 bp. U všech plemen se amplifikoval stejně dlouhý fragment, což nasvědčuje tomu, že v místě nasedání primerů pro gen SOD1 neexistují mezi jednotlivými plemeny psů výrazné sekvenční rozdíly.

Následně byl zvolen vhodný restriční enzym (*Eco57I*), který umožnil detekci mutované a nemutované alely. Byla potvrzena hypotéza, že mutovanou alelu enzym štěpit nebude, a na elektroforeogramu tak bude detekovatelný pouze jeden fragment 79 bp dlouhý.

Nemutovanou alelu naproti tomu enzym rozštěpí na dva fragmenty o velikosti 17 bp a 62 bp. U heterozygotů budou po elektroforéze na gelu patrný tři fragmenty o velikostech 17 bp, 62 bp a 79 bp. Při těchto experimentech musel být použit 5 % agarórový gel, protože rozdíl mezi jednotlivými alelami je pouze 17 bp.

6.4.2 Analýzy genu DNMI pomocí PCR-RFLP

Kauzální mutaci pro vznik EIC u psů lokalizovali Patterson et al. (2008) v exonu 6 genu DNMI na chromozomu 9. Pro amplifikaci fragmentu DNA, který by obsahoval místo předpokládané mutace, byly navrženy dva primery. Pro jejich konstrukci jsem využila databáze GenBank a sekvence genu DNMI, která je uvedena pod označením EU707921. Primery byly navrženy tak, aby místo kauzální mutace leželo zhruba uprostřed ampliconu, jehož předpokládaná velikost měla být 295 bp. Tuto skutečnost jsem následně experimentálně ověřila na gelové elektroforéze.

Dále byl vybrán specifický restriční enzym (*SmlI*), který by byl schopen odlišit mutovanou a nemutovanou alelu. Enzym *SmlI* použili také Taylor et al. (2008) pro štěpení PCR ampliconu, který byl 337 bp dlouhý. Použili primery, které byly umístěny do lemujících intronů, aby se amplifikoval celý exon 6 s danou mutací.

Po restričním štěpení byl potvrzen předpoklad, že enzym *SmlI* bude štěpit mutovanou alelu na dva fragmenty o velikostech 136 bp a 159 bp. U nemutované alely štěpení neproběhlo, jak bylo očekáváno. Naproti tomu u heterozygotů se na elektroforeogramu vyskytovaly tři fragmenty s velikostmi 136 bp, 159 bp a 295 bp.

6.5 Analýzy studovaných genů pomocí metod populační genetiky

6.5.1 Analýzy genu SOD1 pomocí metod populační genetiky

Z hlediska populační genetiky byla testována modelová populace 1002 jedinců plemene československého vlčáka (ČSV). V této skupině se dominantní homozygoti, heterozygoti a recesivní homozygoti vyskytovali v poměru 559:384:59 jedinců. Za takovýchto podmínek byla stanovena frekvence recesivní (mutované) alely na 25,05 %. Dále byla testována modelová situace, kdy byla simulována úplná selekce proti této recesivní

alele po dobu 5, 10, 15 a 20 generací. Chovatelská selekce proti výskytu degenerativní myelopatie u československého vlčáka zatím neprobíhala, respektive v rámci chovatelských klubů není povinné testování psů za účelem detekce přítomnosti mutované alely.

Podle fenotypových projevů lze DM diagnostikovat až v pozdně dospělém věku psa (Barclay a Haines, 1994; Kathmann et al., 2006; Coates et al., 2009) a jedinec v této době již může mít mnoho potomků, a mutovaná alela se tak v populaci stále rozšiřuje a udržuje. Pokud by se ovšem prováděly genetické testy na přítomnost dané mutace, takovýto jedinec by se odlišil mnohem dříve a mohlo by se tak regulovat jeho využívání v chovu.

Proto jsem simulovala vliv úplné selekce proti recesivní alele a prokázala, že při jejím provádění by frekvence recesivní alely za 20 generací klesla z původních 25,05 % na 4,17 %. Pokud bychom počítali délku jedné generace na dva až tři roky, takovýto stav by v populaci nastal za 40 až 60 let. Je ovšem otázkou, zda-li jsou chovatelé schopni takovouto selekci provádět. V modelové populaci plemene ČSV bylo zjištěno 38,32 % heterozygotů (G/A), což představuje relativně velkou základnu a mutovaná alela je tak jejich prostřednictvím v populaci stále udržována. I kdyby se eliminoval počet recesivních homozygotů, musely by se správně sestavovat chovné páry. Při spojení dvou heterozygotů je totiž 25 % pravděpodobnost, že opět vznikne jedinec, který je recesivní homozygot a tudíž by trpěl DM.

Podobnou studii prováděli Awano et al. (2009), avšak modelovou populaci utvořili z více plemen psů – německý boxer, welsh corgi pembroke, německý ovčák, chesapeake bay retriever a rhodeský ridgeback. Recesivní kombinaci alel (A/A) detekovali u 96 % psů trpících DM, zatímco u ostatních jedinců kterým DM nebyla diagnostikována se obě mutované alely vyskytovaly pouze ve 34 % případů.

Modelová populace studovaná v této diplomové práci byla z hlediska distribuce alel prohlášena za rovnovážnou podle Hardy-Weinbergova zákona a ani koeficient inbreedingu nedosahoval hodnot, kdy by se dalo prohlásit, že je populace inbrední. Důvodem nízkého koeficientu inbreedingu (0,02) může být skutečnost, že vzorky DNA pocházely od jedinců nejen z České republiky, ale i ze Slovenska, Itálie, Polska, Německa a několika dalších evropských států.

6.5.2 Analýzy genu DNMI pomocí metod populační genetiky

Bylo hodnoceno 98 jedinců plemene labradorský retriever, u kterého studie dokazují výskyt EIC (Taylor et al., 2008; Minor et al., 2011). Vyhodnotila jsem, že z těchto 98 testovaných psů bylo 62 jedinců (63,27 %) s nemutovaným genotypem G/G, 32 jedinců

(32,65 %) s jednou mutovanou alelou G/T a 4 jedinci (4,08 %) měli genotyp T/T, tudíž obě alely mutované.

Podobné hodnocení uvádějí ve studii Furrow et al. (2013), nicméně testovali labradory, u kterých se již výcvikový kolaps někdy objevil. V této diplomové práci byl soubor hodnocených psů vybírán bez ohledu na výskyt kolapsu. Psi byli vybráni náhodně z různých výcvikových středisek a od chovatelů, kteří svolili k testování DNA svých psů. Furrow et al. (2013) určil frekvenci nemutovaného genotypu u 26 jedinců (23,85 %), heterozygotů bylo v populaci labradorů 9 (8,26 %) a nejvíce bylo jedinců s oběma alelami mutovanými, a to 74 psů (67,89 %).

Frekvence jednotlivých genotypů byla ve studii Minor et al. (2011) testována i napříč populací labradorů z hlediska jejich využití člověkem. Psi byli rozděleni do skupin na psy z výstavních linií, lovecky upotřebitelné jedince, na psy služební (či asistenční) a na jedince, kteří nejsou v zátěži, pouze jsou chováni jako domácí mazlíčci. Frekvence heterozygotů se pohybovala v jednotlivých skupinách mezi 17,9 % a 38 % a frekvence recesivních homozygotů mezi 1,8 % a 4,8 %. Celkovou relativní frekvenci výskytu heterozygotů stanovili Minor et al. (2011) na 34,5 %, což se v podstatě shoduje s výsledky této diplomové práce, kde byla frekvence určena na 32,65 %. Korelují spolu i vypočítané relativní frekvence výskytu recesivních homozygotů.

Dále byla v diplomové práci hodnocena simulovaná situace, jak by populace labradorských retrieverů vypadala z hlediska frekvence recesivní alely po 5, 10, 15 a 20 generacích úplné selekce proti této alely. Frekvence výrazně klesla, a to až o 16,39 % za 20 generací. Takovéto snížení frekvence by mohlo trvat zhruba 50 let, když by se na jednu generaci počítaly dva až tři roky. Tomu by však muselo předcházet otestování psů na přítomnost kauzální mutace genu DNMT1 pro rozvoj EIC, aby se mohly tvořit chovné páry, které by mutovanou alelu nešířily a aby nebylo prováděno křížení, při kterém by docházelo ke vzniku recesivních homozygotů.

Modelová populace labradorských retrieverů studovaná v této diplomové práci byla z hlediska distribuce alel prohlášena za rovnovážnou na základě Hardy-Weinbergova zákona a i koeficient inbreedingu byl vyhodnocen jako velice nízký (0,00521).

7. ZÁVĚR

Diplomová práce představuje pilotní experimenty Katedry genetiky a šlechtění na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze v oblasti aplikace 454/Roche sekvenace psiho genomu. Vědecké hypotézy, které byly vysloveny v úvodní části diplomové práce, byly potvrzeny. Při jejím řešení byly získány výsledky, které jsou shrnuty v následujících bodech:

- 1) Podařilo se získat celkem 1320 vzorků DNA psích plemen – československý vlčák, labradorský retriever, bearded kolie, border kolie, border terier a pudl.
- 2) Byl navržen metodický postup amplifikace velkých fragmentů genů SOD1 a DNMI, který je založen na aplikaci Long PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific).
- 3) Specifita navržených primerů a následné amplifikace byla ověřena elektroforetickou separací a současně i díky výsledkům pyrosekvenace.
- 4) Pyrosekvenační analýze byly podrobeno celkem 22 zástupců různých psích plemen a 2 zástupci vlka eurasijského.
- 5) Na základě srovnání referenčních sekvencí genů SOD1 a DNMI a sekvenovaných fragmentů byly identifikovány mutace v exonových i intronových částech obou genů.
- 6) U genu SOD1 bylo pyrosekvenací identifikováno 36 polymorfismů, z toho se pouze jediná mutace nacházela v exonu. Daná mutace se vyskytovala u 11 jedinců. Jednalo se o kauzální mutaci pro vznik onemocnění degenerativní myelopatie.
- 7) U genu DNMI bylo pyrosekvenací identifikováno 35 polymorfismů, z toho se čtyři mutace vyskytovaly v exonových částech genu. Pouze jedna z těchto mutací byla nesynonymní a odpovídala kauzální mutaci pro vznik výcvikového kolapsu.
- 8) U obou genů nebyla zjištěna žádná další mutace, která by vedla k doposud nepopsané variantě kódovaného polypeptidu.
- 9) Pomocí kladogramů byly hodnoceny sekvenční polymorfismy haplotypů u obou studovaných genů. Největší počet haplotypů (13) byl identifikován v intronu 2-3 genu SOD1. Z kladogramů vyplývá i velká sekvenční variabilita mezi těmito haplotypy.
- 10) Kauzální mutace genu SOD1 vedoucí k degenerativní myelopatii nebyla nalezena ani u jednoho zástupce těchto psích plemen – labradorský retriever, bearded kolie, border kolie, border terier a pudl. Mutace se nevyskytovala ani u zástupců vlka eurasijského.

- 11) Kauzální mutace genu DNMI vedoucí k výcvikovému kolapsu nebyla nalezena ani u jednoho zástupce těchto psích plemen – československý vlčák, bearded kolie, border kolie, border terier a pudl. Mutace se nevyskytovala ani u zástupců vlka eurasijského.
- 12) Populační analýza u genu SOD1 byla provedena pouze u československého vlčáka (ČSV), u kterého se vyskytovala mutovaná alela. V populaci ČSV se vyskytovalo 56 % dominantních homozygotů, 38 % heterozygotů a 6 % recesivních homozygotů.
- 13) Populační analýza u genu DNMI byla provedena pouze u plemene labradorský retriever (LR), u kterého se vyskytovala mutovaná alela. V populaci LR se vyskytovalo 63 % dominantních homozygotů, 33 % heterozygotů a 4 % recesivních homozygotů.
- 14) Koeficient inbreedingu odhadnutý na základě genotypových frekvencí genu SOD1 byl u plemene ČSV roven 2,00 %. Koeficient inbreedingu odhadnutý na základě genotypových frekvencí genu DNMI byl u plemene LR roven 5,21 %.
- 15) V případě úplné selekce vůči recesivním homozygotům genu SOD1 po 20 generací by došlo u plemene československý vlčák k poklesu frekvence recesivní alely v populaci o 20,88 % a u genu DNMI u plemene labradorský retriever o 16,39 %.

Využití PCR-RFLP markerů genů SOD1 a DNMI v reprodukci psích plemen

Výsledky získané při řešení diplomové práce, které se týkaly genotypizace konkrétních jedinců, byly předány pouze majitelům psů, popřípadě poradcům chovu. Obě onemocnění, která byla tématem mé práce, nepatří mezi geneticky podmíněné choroby, u kterých by pro uchovnění psů a fen byly požadovány genetické testy. Proto nyní záleží pouze na chovatelské veřejnosti a na poradcích chovu, jakým způsobem budou se získanými výsledky nakládat.

Poradcům chovu a jednotlivým chovatelům mohu doporučit, aby v případě využití heterozygotního jedince (přenašeče mutované alely) v chovu volili jako druhého rodiče jedince, který bude z hlediska mutací genu SOD1 nebo DNMI nemutovaný homozygot. Z takového spojení je teoretická pravděpodobnost, že se narodí 50 % přenašečů a 50 % zdravých nemutovaných homozygotů. V případě, že by chovatelé provedli spojení dvou heterozygotů, nastane teoreticky riziko, že se s pravděpodobností 25 % narodí nemocný jedinec, který bude homozygot z hlediska kauzálních mutací genů SOD1 nebo DNMI.

8. SEZNAM LITERATURY

- Agah, A., Aghajan, M., Mashayekhi, F., Amini, S., Davis, R. W., Plummer, J. D., Ronaghi, M., Griffin P. B. 2004. A multi-enzyme model for pyrosequencing. *Nucleic Acids Research*. 32 (21). 1-15.
- Ahmadian, A., Ehn, M., Hober, S. 2006. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*. 363 (1-2). 83-94.
- 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 8090290620.
- Ambler, Z. 2006. Amyotrofická laterální skleróza. *Neurologie pro praxi*. 1. 9-12.
- Ansorge, W. J. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*. 25 (4). 195-203.
- Averill, D. R. Jr. 1973. Degenerative myelopathy in aging German Shepherd dog: Clinical and pathological findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 162 (12). 1045-1051.
- Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. J., 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. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 106 (8). 2794-2799.
- Barclay, K. B., Haines, D. M. 1994. Immunohistochemical Evidence for Immunoglobulin and Complement Deposition in Spinal Cord Lesions in Degenerative Myelopathy in German Shepherd Dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 58 (1). 20-24.
- Battistini, S., Benigni, M., Ricci, C., Rossi, A. 2012. SOD1 Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *European Neurological Journal*. 4 (2). 33-43.

- Bichsel, P., Vandeveld, M., Lang, J., Kull-Hächler, S. 1983. Degenerative myelopathy in a family of Siberian Husky dogs. *Journal of Comparative Neurology*. 183 (9). 998-1000.
- Braund, K. G., Vandeveld, M. 1978. German Shepherd Dog myelopathy – A morphologic and morphometric study. *American Journal of Veterinary Research*. 39 (8). 1309-1315.
- Carri, M. T., Ferri, A., Battistoni, A., Famhy, L., Gabbianelli, R., Poccia, F., Rotilio, G. 1997. Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 414 (2). 365-368.
- Cleveland, D. W., Rothstein, J. D. 2001. From Charcot to Lou Gehrig: Deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature Reviews Neuroscience*. 2 (11). 806-819.
- 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 A1. 1-33.
- Coates, J. R., March, P. A., Oglesbee, M., Ruaux, C. G., Olby, N. J., Berghaus, R. D., O'Brien, D. P., Keating, J. H., Johnson, G. S., Williams, D. A. 2007. Clinical Characterization of a Familial Degenerative Myelopathy in Pembroke Welsh Corgi Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 21 (6). 1323-1331.
- Coates, J. R., Wininger, F. A. 2010. Canine degenerative myelopathy. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 40 (5). 929-950.
- Crisp, M. J., Beckett, J., Coates, J. R., Miller, T. M. 2013. Canine degenerative myelopathy: Biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. *Experimental Neurology*. 248. 1-9.
- Dangoumau, A., Verschueren, A., Hammouche, E., Papon, M.-A., Blasco, H., Cherpi-Antar, C., Pouget, J., Corcia, P., Andres, Ch. R., Vourc'h, P. 2014. A novel SOD1

mutation p.V31A identified with a slowly progressive form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*. 35 (1). 2661-2664.

Deng, H.-X., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.-Y., Getzoff, E. D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R. P., Warner, C., Deng, G., Soriano, E., Smyth, C., Parge, H. E., Ahmed, A., Roses, A. D., Hallewell, R. A., Pericak-Vance, M. A., Siddique, T. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*. 261 (5124). 1047-1051.

Dorak, M. T. Basic population genetics [online]. 2004. [cit. 2014-03-25]. Dostupné z: <<http://dorakmt.tripod.com/genetics/popgen.htm>>.

Elchuri, S., Oberley, T. D., Qi, W., Eisenstein, R. S., Roberts, L. J., Van Remmen, H., Epstein, Ch. J., Huang, T.-T. 2005. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*. 24. 367-380.

Ferguson, S. M., Brasnjo, G., Hayashi, M., Wölfel, M., Collesi, Ch., Giovedi, S., Raimondi, A., Gong, L.-W., Ariel, P., Paradise, S., O'Toole, E., Flavell, R., Cremona, O., Miesenböck, G., Ryan, T. A., De Camilli, P. 2007. A Selective Activity-Dependent Requirement for Dynamin 1 in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Science*. 316 (5824). 570-574.

Fridovich, I. 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 64. 97-112.

Furrow, E., Minor, K. M., Taylor, S. M., Mickelson, J. R., Patterson, E. E. 2013. Relationship between dynamin 1 mutation status and characteristics of recurrent episodes of exercise-induced collapse in Labrador Retrievers. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 242 (6). 786-791.

Gillet, E., Gömöry, D., Paule, L. 2005. Measuring genetic variation within and among population. In: Geburek, T., Turok, J. 2005. *Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe*. Arbora Publishers. Zvolen. 693 s. ISBN 80-967088-1-3.

- 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.
- Griffiths, I. R., Duncan, I. D. 1975. Chronic degenerative radiculomyelopathy in the dog. *Journal of Small Animal Practice*. 16 (1-12). 461-471.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41. 95-98.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 22 (2). 160-174.
- Heymann, J. A. W., Hinshaw, J. E. 2009. Dynamins at a glance. *Journal of Cell Science*. 122 (19). 3427-3431.
- Jukes, T. H., Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro H. N., editor. *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press. New York. 21-132.
- Kathmann, I., Cizinauskas, S., Doherr, M. G., Steffen, F., Jaggy, A. 2006. Daily Controlled Physiotherapy Increases Survival Time in Dogs with Suspected Degenerative Myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 20 (4). 927-932.
- Kato, S. 2008. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica*. 115 (1). 97 – 114.
- Kato, S., Takikawa, M., Nakashima, K., Hirano, A., Cleveland, D. W., Kusaka, H., Shibata, N., Kato, M., Nakano, I., Ohama, E. 2000. New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: Inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. *Amyotrophic Lateral Sclerosis And Other Motor Neuron Disorders: Official Publication Of The World Federation Of Neurology*. 1(3). 163-184.
- Larsson, Ch., Geundberg, I., Söderberg, O., Nilsson, M. 2010. In situ detection and genotyping of individual mRNA molecules. *Nature Methods*. 7 (5). 395-397.

- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., deJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, Ch.-W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, Ch., Kim, L., Koepfli, K.-P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M. J., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C., Lander, E. S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438 (8). 803-819.
- Makrinou, E., Fox, M., Wolfe, J., Cameron, J., Taylor, K., Edwards, Y. H. 2004. DNM1DN: a new class of paralogous genomic segments (duplicons) with highly conserved copies on chromosomes Y and 15. *Annals of Human Genetics*. 68 (2). 85-92.
- March, P. A., Coates, J. R., Abyad, 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.
- Mardis, E. R. 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 9. 387-402.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Yi-Ju, Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., He Ho, Ch., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L. I., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J.-B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, M., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F., Rothberg, J. M. 2005. Genome sequencing in open microfabricated high-density picoliter reactors. *Nature*. 437 (7057). 376-380.
- Matthews, N. S., de Lahunta, A. 1985. Degenerative myelopathy in an adult miniature poodle. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 186 (11). 1213-1215.

- McCord, J. M., Fridovich, I. 1969. Superoxide Dismutase, an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *The Journal of Biological Chemistry*. 244 (22). 6049-6055.
- McGinn, S., Gut, I. G. 2012. DNA sequencing – spanning the generations. *New Biotechnology*. 30 (4). 366-372.
- Mellersh, C. S., Hitte, Ch., Richman, M., Vignaux, F., Priat, C., Jouquand, S., Werner, P., André, C., DeRose, S., Patterson, D. F., Ostrander, E. A., Galibert, F. 2000. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammalian Genome*. 11 (2). 120-130.
- Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 11 (1). 31-46.
- Miller, A. D., Barber, R., Porter, B. F., Peters, R. M., Kent, M., Platt, S. R., Schatzberg, S. J. 2009. Degenerative Myelopathy in Two Boxer Dogs. *Veterinary Pathology*. 46 (4). 684-687.
- Minor, K. M., Patterson, E. E., Keating, M. K., Gross, S. D., Ekenstedt, K. J., Taylor S., M., Mickelson, J. R. 2011. Presence and impact of the exercise-induced collapse associated DNMT1 mutation in Labrador retrievers and other breeds. *The Veterinary Journal*. 189 (2), 214 – 219.
- Morgan, B. R., Coates, J. R., Johnson, G. C., Bujnak, A. C., Katz, M. L. 2013. Characterization of intercostal muscle pathology in canine degenerative myelopathy: A disease model for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*. 91 (12). 1639-1650.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 106 (949). 283-292.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York. 333 s. ISBN -13: 978-0195135855.
- Obar, R. A., Collins, C. A., Hammarback, J. A., Shpetner, H. S., Vallee, R. B. 1990. Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme

- dynamamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature*. 347 (6290). 256-261.
- Oberley, L. W. 2001. Anticancer Therapy by Overexpression of Superoxide Dismutase. *Antioxidants & Redox Signaling*. 3 (3). 461-472.
- Patterson, E. E., Minor, K. M., Tchernatynskaia, A. V., Taylor, S. M., Shelton, G. D., Ekenstedt, K. J., Mickelson, J. R. 2008. A canine DNMI mutation is highly associated with the syndrome of exercise-induced collapse. *Nature genetics*. 40 (10). 1235-1239.
- Paule, L. 1992. *Genetika a šľachtenie lesných drevín*. Príroda a.s.. Bratislava. 304 s. ISBN: 80-07-00409-2.
- Praefcke, G. J. K., McMahon, H. T. 2004. The Dynamamin Superfamily: Universal membrane tubulation and fission molecules?. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 5 (2). 133-147.
- Roche. 2012a. *emPCR Amplification Method Manual – Lib-L. GS Junior Titanium Series*. 454 Life Sciences Corporation. (7). 0312.
- Roche. 2012b. *Rapid Library Preparation Method Manual. GS Junior Titanium Series*. 454 Life Sciences Corporation. (5). 0312.
- Roche. 2012c. *Sequencing Method Manual. GS Junior Titanium Series*. 454 Life Sciences Corporation. (6). 0312.
- Ronaghi, M. 2001. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research*. 11 (1). 3-11.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyren, P. 1996. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry*. 242 (0432). 84-89.
- Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyren, P. 1998. A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science*. 281 (5375). 363-365.

- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Fiqlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D. W., Smyth, C., Laing, N. G., Soriano, E., Pericak-Vance, M. A., Haines, J., Rouleau, G. A., Gusella, J. S., Horvitz, R., Brown, R. H. Jr. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 362 (6415). 59-62.
- Rothberg, J. M., Leamon, J. H. 2008. The development and impact of 454 sequencing. *Nature biotechnology*. 26 (10). 1117-1124.
- Rowland, L. P., Shneider, N. A. 2001. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*. 344 (22). 1688-1700.
- Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*. 132. 365 – 386.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. F. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. p. 2344. ISBN 0879695773.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74 (12). 5463-5467.
- Schadt, E. E., Turner, S., Kasarskis, A. 2010. A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*. 19 (2). 227-240.
- Shaw, B. F., Valentine, J. S. 2007. How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends in Biochemical Sciences*. 32 (2). 78-85.
- 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 Neurological Sciences*. 318 (1-2). 55-64.
- Sláma, O. 2006. Několik poznámek o paliativní péči u amyotrofické laterální sklerózy. *Neurologie pro praxi*. 1. 15.
- Stathopoulos, P. B., Rumfeldt, J. A. O., Scholz, G. A., Irani, R. A., Frey, H. E., Hallewell, R. A., Lepock, J. R., Meiering, E. M. 2003. Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (12). 7021-7026.
- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*. 9 (4). 678-687.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30. 2725-2729.
- Taylor, S. M., Shmon, C. L., Shelton, G. D., Patterson, E. N. E., Minor, K., Mickelson, J. R. 2008. Exercise-Induced Collapse of Labrador Retrievers: Survey Results and Preliminary Investigation of Heritability. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 44 (6). 295-301.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22 (22). 4673-4680.
- Waxman, F. J., Clemmons, R. M., Johnson, G., Evermann, J. F., Johnson, M. I., Roberts, Ch., Hinrichs, D. J. 1980. Progressive myelopathy in older German Shepherd Dogs: I. Depressed response to thymus-dependent mitogens. *The Journal of Immunology*. 124 (3). 1209-1215.

- Williams, D. A., Prymak, C., Baughan, J. 1985. Tocopherol (vitamin E) status in canine degenerative myelopathy. American College of Veterinary Internal Medicine. Proceedings of the 3rd Annual Meeting.
- 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 Missense Mutation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 25 (5). 1166-1170.
- Yao, P. J., Zhu, M., Pyun, E. I., Brooks, A. I., Therianos, S., Meyers, V. E., Coleman, P. D. 2003. Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*. 12 (2). 97-109.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., Folz, R. J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*. 33 (3). 337-349.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

μl	mikrolitr, 10 ⁻⁶ litru
A	adenin
A4V	substituce alaninu za valin na pozici 4. aminokyseliny
AA	amino acid; aminokyselina
ALS	amyotrophic lateral sclerosis; amyotrofická laterální skleróza
AMP	adenosinmonofosfát
APS	adenosin fosfosulfát
ATP	adenosintrifosfát
BIC	Bayesian Information Criterion; bayesiánské informační kritérium
BOC-KR4	vzorek DNA od kryptorchidního psa plemene border kolie
bp	base pair; počet párů bází v molekule nukleové kyseliny
BRT-KR1	vzorek DNA od kryptorchidního psa plemene border terier
C	cytosin
CCD	the charge-coupled device; speciálně upravená kamera
cDNA	complementary DNA; DNA vzniklá zpětným přepisem z RNA do DNA
CFA	<i>canis familiaris</i> autosome; autozomální chromozom psa
CSF	cerebrospinal fluid; mozkomíšní mok
CT	computed tomography; počítačová tomografie
ČSV	československý vlčák
ddH ₂ O	double distilled water; dvakrát deionizovaná voda
DM	degenerative myelopathy; degenerativní myelopatie
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
DNM	gen kódující dynamin; proteinová rodina dynaminů
DNM1	gen kódující dynamin 1; protein dynamin 1
dNMP	deoxynukleotidmonofosfát, kde N je kterákoli báze – A, T, C, nebo G
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát, kde N je kterákoli báze – A, T, C, nebo G
dsDNA	double stranded DNA; dvouřetězcová DNA
E40G	substituce kyseliny glutamové za glycin na pozici 40. aminokyseliny
E40K	substituce kyseliny glutamové za lysin na pozici 40. aminokyseliny
EIC	exercise-induced collapse = exercise intolerance and collapse; výcvikový kolaps

emPCR	emulsion polymerase chain reaction; emulzní polymerázová řetězová reakce
Fe-SOD	superoxid dismutáza s iontem železa v aktivním centru
F _{IS}	inbreeding coefficient of an individual relative to the subpopulation; stupeň inbreedingu
G	guanin
G767T	substituce guaninu za thymin na pozici 767. nukleotidu
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
GTPáza	enzym, který hydrolyzuje guanosintrifosfát na guanosindifosfát
GWAs	genome-wide association study; celogenomová asociační studie
HCC	hepatocellular carcinoma; hepatocelulární karcinom
H _E	expected heterozygosity; očekávaná heterozygotnost
HKY	statistický model metody maximální věrohodnosti (Hasegawa et al., 1985)
H _O	observed heterozygosity; pozorovaná heterozygotnost
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry; mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
JC	statistický model metody maximální věrohodnosti (Jukes a Cantor, 1969)
L3	horní bederní sektor páteře
LMN	lower motor neuron; dolní motorický neuron (motoneuron)
Mb	mega base pair; milion párů bází
MID sekvence	multiple identify sequence; rozpoznávací sekvence v adapteru pro pyrosekvenaci
ML metoda	maximum likelihood; statistická metoda maximální věrohodnosti
MRI	magnetic resonance imaging; magnetická rezonance
NCBI	National Center for Biotechnology Information; nukleotidová databáze mezinárodního centra pro biotechnologické informace
ng	nanogram, 10 ⁻⁹ gramu
NGS	new generation sequencing; sekvenování nové generace
nm	nanometr, 10 ⁻⁹ metru
NO	nitric oxide; oxid dusnatý
PCR	polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce

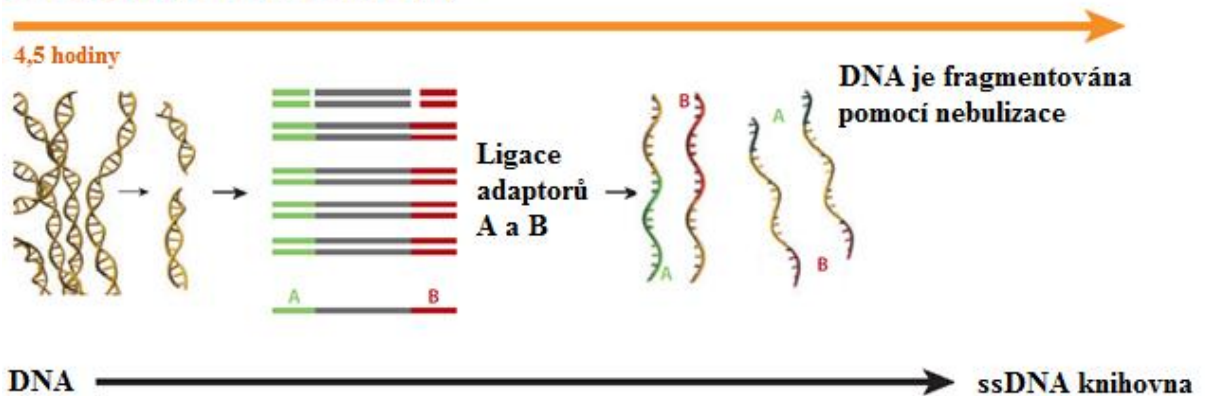
PCR-RFLP	PCR and restriction fragment length polymorphism; PCR reakce spojená s určením polymorfismu podle délky restričních fragmentů
P-KR3	vzorek DNA od kryptorchidního psa plemene pudl
PPi	pyrofosfát
PTP	PicoTiterPlate; pikotitrační destička
R256L	substituce argininu za leucin na pozici 256. aminokyseliny
RH mapa	radiation hybrid map, radiačně hybridní mapa
RNA	ribonucleic acid; ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
S3	páteří sektor křížové kosti
SBS	sequencing-by-synthesis; sekvenace využívající syntézu vlákna DNA
SMRT	single-molecule real-time sequencing; sekvenace jednotlivých molekul nukleových kyselin v reálném čase
SMS	single-molecule sequencing; sekvenování jednotlivých molekul DNA
SNP	single nucleotide polymorphism; jednonukleotidový polymorfismus
SOD	superoxide dismutase; superoxid dismutáza
SOD1 = Cu/Zn-SOD	superoxid dismutáza 1 s iontem mědi a zinku v aktivním centru
SOD2 = Mn-SOD	superoxid dismutáza 2 s iontem manganu v aktivním centru
SOD3 = EC-SOD	superoxid dismutáza 3 s iontem mědi a zinku v aktivním centru
SSB	single strand binding protein; protein vážící se na jednořetězcová vlákna DNA
ssDNA	single stranded DNA; jednořetězcová DNA
T	thymin
T18S	substituce threoninu za serin na pozici 18. aminokyseliny
T3	dolní krční sektor páteře
T92	statistický model metody maximální věrohodnosti (Tamura; 1992)
TBE	tris-borátový pufr
UMN	upper motor neuron; horní motorický neuron (motoneuron)
V31A	substituce valinu za alanin na pozici 31. aminokyseliny

10. PŘÍLOHY

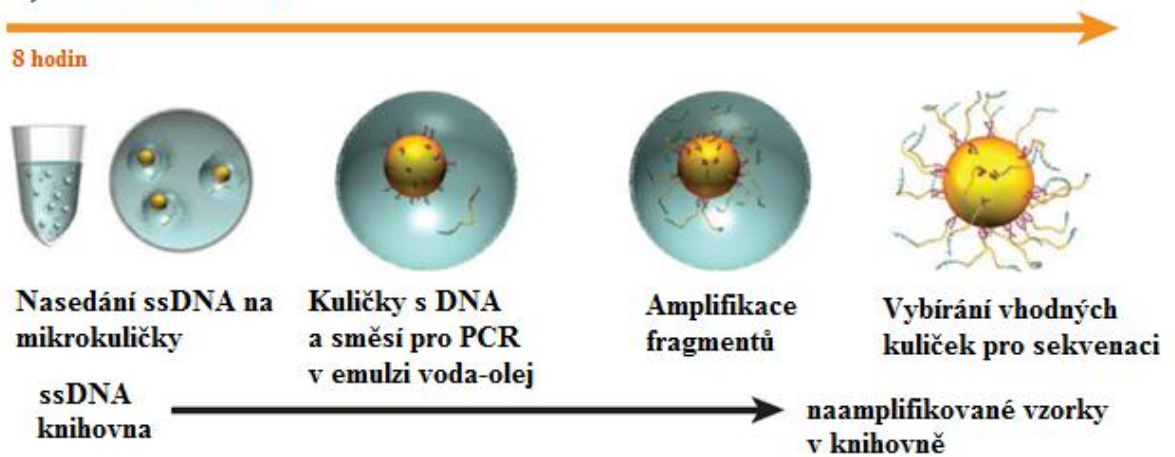
Příloha 1: Schéma pyrosekvenování

(upraveno podle Mardis, 2008)

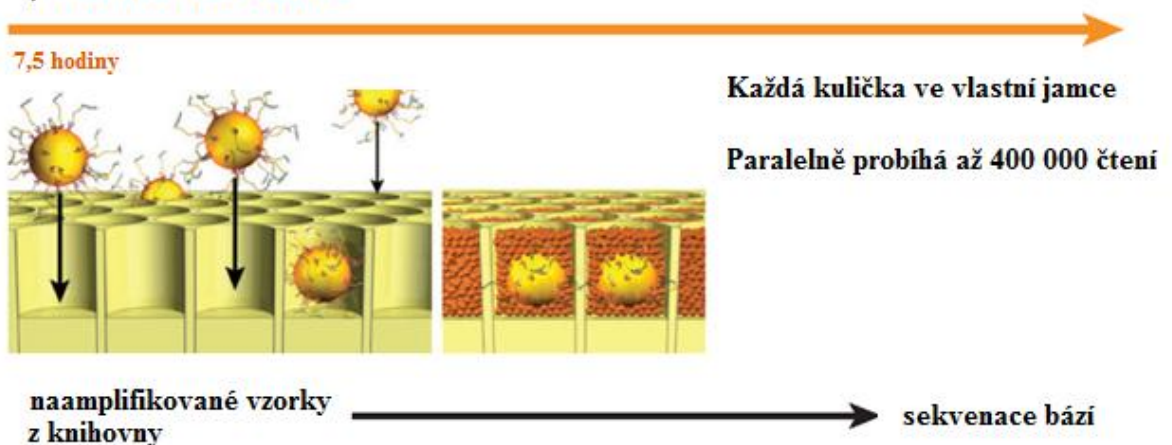
1) Příprava DNA knihovny



2) Emulzní PCR



3) Vlastní sekvenace



Příloha 2: Pufry a roztoky použité při elektroforetické separaci

(upraveno podle Sambrook et al., 1989)

- nanášecí pufr NP
 - 0,25 % bromfenolové modři – sodná sůl (Serva, SRN)
 - 0,25 % xylencyanolové modři FF (Sigma, USA)
 - 15,0 % ficolu (Sigma, USA)
 - vše se rozpustí ve sterilní ddH₂O
 - uchovává se při 4°C
- 10 x TBE pufr
 - 450 mM Tris-kyselina boritá (Sigma, USA), pH 8,0
 - 10 mM EDTA (Sigma, USA)
 - uchovává se při 4°C
- 1 x TBE pufr
 - naředí se 10 x TBE pufr 1x deionizovanou H₂O
 - uchovává se při 4°C
- zásobní roztok ethidium bromidu
 - 10 mg ethidium bromidu (Sigma, USA)
 - 1 ml sterilní ddH₂O
 - při přípravě a manipulaci se musí pracovat v ochranných rukavicích
 - uchovává se ve tmě při teplotě 4°C
- elektrodový pufr
 - 1500 ml 1 x TBE
 - 75 µl zásobního roztoku ethidium bromidu

Při přípravě a manipulaci s roztoky a pufry se musí pracovat v ochranných rukavicích a jsou určeny k okamžitému použití.