

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Diplomová práce

Detekce mutace genu *HSF4* způsobující hereditární kataraktu
u ovčáckých psů

Autor diplomové práce: Bc. Lenka Vokálková

Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Jozová, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.

České Budějovice, 2020

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Lenka VOKÁLKOVÁ
Osobní číslo: Z18049
Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Téma práce: Detekce mutace genu HSF4 způsobující hereditární kataraktu u ovčáckých psů
Zadávací katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Zásady pro vypracování

Katarakta (šedý zákal) je poruchou průhlednosti čočky a způsobuje slepotu. U ovčáckých psů byla zjištěna mutace delece 1 nukleotidu v exonu 9 genu HSF4. Cílem diplomové práce je zpracovat literární přehled dosavadních poznatků o této geneticky podmíněné chorobě v závislosti pro ovčácká plemena a analyzovat jejich genotypy. DNA bude izolována ze stěrů z bukální sliznice. Analýza mutace genu bude prováděna metodou PCR a následnou fragmentační popřípadě realtime PCR analýzou.

Cíle práce: Definice hypotéz a cílů práce.

Literární přehled: Charakteristika a význam geneticky podmíněného onemocnění HSF4, charakteristika ovčáckých plemen, princip PCR metody a sekvenování.

Materiál a metody: Charakteristika testovaných vzorků, izolace genomické DNA, optimalizace PCR metody, sekvenování, analýza vzorků, vyhodnocení získaných dat.

Výsledky: optimalizace metody, vyhodnocení dat.

Diskuze: Porovnání vlastních výsledků s literárními zdroji, posouzení možnosti praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce.

Seznam použité literatury: V abecedním pořadí dle platné citační normy ČSN ISO 690 (01 0197).

Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah pracovní zprávy: 40 – 50 stran
Rozsah grafických prací: 10-15 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Ricketts, S. L., Pettitt, L., McLaughlin, B., Jenkins, C. A., & Mellersh, C. S. (2015). A novel locus on canine chromosome 13 is associated with cataract in the Australian Shepherd breed of domestic dog. *Mammalian Genome*, 26(5-6), 257-263.
- Beckers, E., Van Poucke, M., Ronsyn, L., & Peelman, L. (2016). Frequency estimation of disease-causing mutations in the Belgian population of some dog breeds, part 1: shepherds. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 85(4), 175-184.
- Beckers, E., Van Poucke, M., Ronsyn, L., & Peelman, L. (2016). Frequency estimation of disease-causing mutations in the Belgian population of some dog breeds, part 2: retrievers and other breed types. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 85(4), 185-196.
- Mellersh, C. S., McLaughlin, B., Ahonen, S., Pettitt, L., Lohi, H., & Barnett, K. C. (2009). Mutation in HSF4 is associated with hereditary cataract in the Australian Shepherd. *Veterinary ophthalmology*, 12(6), 372-378.
- Mellersh, C. S., Pettitt, L., Forman, O. P., Vaudin, M., & Barnett, K. C. (2006). Identification of mutations in HSF4 in dogs of three different breeds with hereditary cataracts. *Veterinary ophthalmology*, 9(5), 369-378.
- Šmarda J. a kol. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně, 2008, 188 s.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Jozová, Ph.D.
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: Ing. Dagmar Stehlíková
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné


Datum zadání diplomové práce: 25. února 2019
Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2020

V Českých Budějovicích dne 25. února 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvká 1888, 370 05 České Budějovice


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

L.S.


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to- v nezkrácené podobě- v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou- elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Bc. Lenka Vokálková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Ing. Evě Jozové. Ph.D. a Ing. Dagmar Stehlíkové Ph. D. za vedení mé diplomové práce, cenné rady a odborný dohled. Dále bych chtěla poděkovat všem chovatelům psů, kteří mi poskytli vzorky potřebné k vypracování praktické části diplomové práce.

Detekce mutace genu *HSF4* způsobující hereditární kataraktu u ovčáckých psů

Abstrakt

Hereditární katarakta patří mezi jedno z nejčastějších onemocnění očí u ovčáckých plemen psů. Jedná se o závažné onemocnění, které způsobuje zhoršení zraku psa. Při zanedbání může vést až ke slepotě. Hereditární katarakta se projevuje bilaterálním zákalem oka. Průběh onemocnění je různý a počátek nemoci může nastat v jakémkoliv věku psa.

Vznik katarakty může být důsledkem jiné oční vady nebo poraněním oka. V tomto případě se jedná o sekundární kataraktu. Primární katarakta je řízena geny. Kandidátním genem pro vznik hereditární katarakty je gen *HSF4*.

Tento gen hraje důležitou roli v imunitním systému. Kóduje proteiny tepelného šoku, které chrání buňku před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí, jako jsou například vysoká teplota nebo UV záření. Kromě toho se také podílí na vývoji vláken oční čočky. Mutace v exonu 9 genu *HSF4* způsobuje degradaci těchto vláken a tím vzniká šedý zákal.

Hereditární katarakta je závažné onemocnění, které se často léčí chirurgicky implantací oční čočky. Proto je důležitá včasná diagnostika a vyřazení postižených jedinců z chovu, aby nedošlo přenosu onemocnění do další generace. Detekcí mutace genu *HSF4*, způsobující kataraktu se zabývám v mé diplomové práci.

Jako vhodnou metodu pro detekci mutace genu *HSF4* byla zvolena fragmentační analýza. Mutace spočívá v inzerci jednoho nukleotidu C. Fragmentační analýza dokáže velmi přesně určit délku amplifikovaného fragmentu a umožňuje odlišit i fragment lišící se pouze v jedné bázi.

V praktické části bylo vyšetřeno celkem sto vzorků psů plemen australský ovčák, německý ovčák, border kolie a dlouhosrstá a krátkosrstá kolie. Pouze jeden pes byl vyhodnocen jako přenašeč hereditární katarakty. Jednalo se o psa plemene australský ovčák. Tři vzorky psů nebylo možné vyhodnotit, nejspíše z důvodu špatného odběru vzorku nebo degradace DNA. Zbytek vyšetřovaných psů (96 vzorků) byl vyhodnocen jako zdravý jedinec.

Klíčová slova: Hereditární katarakta, ovčácký pes, *HSF4*, fragmentační analýza

The Detection of the gene *HSF4* mutation causing hereditary cataract with shepherds dogs.

Summary

Hereditary cataract belongs amongs the most common diseases of the eye with the shepherd dog breeds. It is a very serious disease, which causes the deterioration of sight of the dog. With the neglection can the illness cause even blindness. Heteritary cataract manifests itself with bilateral turbidity of the eye. Course of the illness differs and the beginning of the sickness can start at any age of the dog.

The formation of the cataract can be the result of another eye disease or the in jury of the eye. In this case it is a secondary cataract. Primary cataract is directed by genes. Candidate gene for the formation of the hereditary cataract is the *HSF4* gene.

This gene include an important role in the immunity system. It encodes proteins of the thermal shock, that protects the cell from adverse effects of the outer environment, like high temperatures or UV rays. Besides that it also cantrributes to the development of the eye lens fibers. Mutation in the exon of the gene *HSF4* causes the degradation of these fibers, hence cataract.

Hereditary cataract is a serious illness, which must be cured by surgical implantation of the eye lens. Therefore, timely diagnosis and decommission of affected individuals from the breed, that the transfer of the illness to the next generation will be prevented. I deal with the detection of a mutation in the *HSF4* gene causing cataracts in my diploma thesis.

I have chosen the fragment analysis as the most suitable method for detection of the mutation in the gene *HSF4*. The mutation is in the insertion of one nucleotid C. Fragment analysis can determine very precisely the mass of the DNA molecule and permits to differ even a fragment, which differs only in one base.

In the practical part of the thesis were examined 100 samples of the dogs of breeds australian shepperd, border collie, german shepherd and long ans short haired collie. Only one of the dogs was evaluated as the carrier of the hereditary cataract. It was the dog of the australian shepperd breed. Three of the samples were non-evaluabe, caused by wrong sampling or degradation of the DNA. The rest of the evaluated dogs (96 samples) were healty.

Keywords: Hereditary cataract, shepherd dog, *HSF4*, fragment analysis.

Obsah

1	ÚVOD	9
2	LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
2.1	Charakteristika ovčáckých plemen psů	10
2.1.1	Australský ovčák	10
2.1.2	Německý ovčák	12
2.1.3	Border kolie	14
2.1.4	Dlouhosrstá/krátkosrstá kolie	15
2.2	Genom psa	17
2.2.1	Gen <i>HSF4</i>	19
2.3	Katarakta-šedý zákal oční čočky	20
2.3.1	Léčba	21
2.4	Diagnostika hereditární katarakty	22
2.5	Genetické testy	23
2.5.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	24
2.5.2	Gelová elektroforéza	24
2.5.3	Fragmentační analýza	25
3	CÍLE PRÁCE	27
4	PRAKTICKÁ ČÁST	28
4.1	Odběr vzorku	28
4.2	Izolace DNA z bukálních stěrů psa	32
4.3	Měření koncentrace DNA	33
4.4	Detekce genu <i>HSF4</i> metodou PCR	33
4.5	Příprava gelu a elektroforéza	34
4.6	Příprava vzorku pro fragmentační analýzu	35
5	VÝSLEDKY	38
5.1	Izolace DNA	38
5.2	Detekce genu <i>HSF4</i> metodou PCR	38
5.3	Fragmentační analýza	40
6	DISKUZE	46
7	ZÁVĚR	49
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	50
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57

1 Úvod

Pes hraje důležitou roli v životě člověka již od nepaměti. Pravděpodobně se pes vyvinul z vlka, kterého začali lidé odchyťovat. Jejich štěňata se snažili vychovávat tak, aby chránila jejich obydlí a stáda. Postupem času se úloha psa měnila. Nejdříve byl využíván především k lovu, práci s dobyt看em a ochraně majetku. Později začal být pes využíván i jako společník. Se změnou využití se lišily i nároky na vlastnosti a vzhled psa. Vznikala tak nová, moderní plemena psů.

Vlivem šlechtění se začala u psů hromadit geneticky podmíněná onemocnění. Hereditární katarakta patří mezi jedno z nečastějších onemocnění oční čočky, které může vést až k slepotě psa. Během posledních let došlo k rozšíření dědičné formy katarakty mezi ovčáckými plemeny psů. Především u australského ovčáka, border kolie, německého ovčáka a krátkosrsté nebo dlouhosrsté kolie. Na tato plemena jsem se z důvodu nejčastějšího výskytu zaměřila ve své diplomové práci.

Mechanismus vzniku katarakty není doposud zcela znám. Může se jednat o sekundární projev jiné oční vady, jako je například zelený zákal, nebo může vzniknout jako důsledek poranění oka. Tato forma katarakty není ovlivněna geny a není přenášena z generace na generaci. Vznik primární katarakty je důsledkem genetické mutace.

Dle studií je kandidátním genem pro vznik katarakty gen *HSF4*, ve kterém může dojít v oblasti exonu 9 k inzerci jednoho nukleotidu C. Tato mutace má za následek narušení vláknitých buněk oční čočky, které může vést až k jejich terminaci.

K projevu onemocnění může dojít v jakémkoli věku psa. Průběh a příznaky katarakty se u každého jedince liší. Většinou probíhá bilaterálně, ale ve výjimečných případech může probíhat i jednostranně. Jediná doposud známá léčba je operace oka.

Aby se předešlo šíření hereditární katarakty je zapotřebí podchytit a vyřadit z chovu postižené jedince a přenašeče. Jedince, u kterých se nemoc neprojevuje, ale mohou jí přenášet do další generace. Protože se jedná pouze o inzerci jednoho nukleotidu, je obtížné určit rozdíl mezi normální a mutovanou alelou. Pro detekci mutace byla zvolena detekce pomocí fragmentační analýzy. Jedná se o citlivou a spolehlivou metodu, která přesně určuje délku fragmentů.

Molekulární metody jsou v tomto případě nejspolehlivější pro odhalení hereditární katarakty. Dále je možné provést vyšetření oční čočky, které však neumožňuje odhalit skrytého přenašeče.

2 Literární rešerše

2.1 Charakteristika ovčáckých plemen psů

Lidé začínali s domestikací psa před více než 15 000 lety. V té době, kdy ještě kočovali, se k jejich obydlí začali stahovat vlci, kteří se přizivovali na zbytcích. Lidé začali odchyťvat štěňata vlků a snažili se je vychovat tak, aby chránila jejich stáda a jejich příbytky (Fogle, 1999).

Bylo nalezeno i mnoho důkazů, že pes se stal důležitou součástí lidského života. Jedná se o zkameněliny domestikovaného psa. Jejich stáří se odhaduje na 10 000 – 35 000 let, kosti zdomácnělého psa z doby kamenné a umělecká díla vytvořená člověkem v podobě malých sošek nebo jeskynních maleb (Taylor, 1994).

Způsob života člověka se neustále měnil a s ním i požadavky na psy. Přibližně před dvěma desítkami let prodělal výraznou proměnu způsob chovu ovcí na našem území. Bylo zapotřebí stádo nejen obránit, ale také se stádem pracovat, aby zůstalo pohromadě. Křížením loveckých plemen vznikla skupina ovčáckých psů. Tito psi splňovali všechny požadavky pro práci s ovci. Jsou to psi bystrí, vytrvalí, houževnatí, mohou pracovat dlouho a za každého počasí, jsou poslušní a pracují s chutí (Horák, 2012).

Do skupiny ovčáckých plemen psů spadají dva různé typy psů. Psi pastevečtí a psi honáčtí, kteří se od sebe liší nejen vzhledem, ale i svým posláním. Psi pastevečtí mají za úkol stádo ohlídat a střežit před nebezpečím, zatímco psi honáčtí se používají pro práci se stádem-udržují stádo pohromadě, zaběhlé kusy přivádějí zpět a nahánějí ovce z pastvy do ohrady. Typickými znaky pro ovčácká plemena psů jsou klínový tvar hlavy a vzpřímené ušní boltce trojúhelníkovitého tvaru. Jsou to rysy, které dokazují vývoj domestikovaného psa z vlka (Císařovský, 1995).

2.1.1 Australský ovčák

Historie plemene australský ovčák začíná koncem 19. století. V této době začínali Baskové migrovat do Austrálie, kam kvůli vysoké poptávce po vlně přesouvali početná stáda ovcí. Psi, kteří Basky doprovázeli, aby ochránily jejich stáda, se vzhledem i povahou velmi podobala australským ovčákům tak, jak je známe dnes. Křížením s místními plemeny vzniklo plemeno, které se dostalo do Spojených států amerických. Zde bylo plemeno oficiálně registrováno (Hartnagle-Taylor, 2013).

Díky své povaze se stali oblíbenými psi mezi kovboji, které doprovázeli při nahánění stád. Zvládnou bez problému běžet vedle koně, nikde se netoulají a nemají sklony k pytláčení. Do Evropy se dostali společně s kovboji, kteří si tyto psy přivezli sebou společně s koňmi z USA (Krämer, 1996).

2.1.1.1 Charakteristika plemene

Tělo australského ovčáka je lehce obdélníkového tvaru (o málo delší než vyšší). Tito psi mají rovný hřbet, záď se mírně svažuje. Jsou pevní a svalnatí, bez známek těžkopádnosti. Kostra je střední velikosti, v dospělosti psi dosahují výšky 51-58 cm a feny 46-53 cm. Ocas je buď přirozeně dlouhý, krátký nebo kupírovaný (Verhoeff-Verhallen, 2010).

Srst australského ovčáka je polodlouhá, může být rovná i vlnitá. Hustota závisí na ročním období a na klimatických podmínkách. Charakteristický je pro plemeno límec, který bývá mohutnější u psů než u fen. Zbarvení srsti může být blue merle, red merle, čistě černá nebo hnědá. Mohou se vyskytovat bílé znaky nebo pálení v oblasti třísel, hrudi, končetin, spodní strany čenichové a límce. Na hlavě může být bílá lysina rozšířená ze spodní strany těla (Císařovský, 2008).

Zbarvení očí je hnědé, ambrové nebo modré. U vícebarevných jedinců se vyskytují i kombinace těchto barev, kdy mají psi oči z části modré (Krämer, 2010).

Australský ovčák je pes temperamentní a vytrvalý. Je velmi inteligentní a lehce cvičitelný. K cizím lidem je rezervovaný, velmi často bývá fixovaný na svého pána a jeho rodinu. Svého pána velmi rád hlídá. Vzhledem k temperamentu a snadné učenlivosti plemene je australský ovčák vhodný do různých disciplín psího sportu. Na obrázku 1 je vidět typický jedinec plemene australského ovčáka. (Verhoeff-Verhallen, 2010; Krämer, 1996).



Obr. č. 1: *Typický zástupce plemene australského ovčáka zbarvení red merle (Autor: HANZLOVÁ, 2012; Australský ovčák. https://www.ifauna.cz/upload/clanky/photos/gallery/201809/6139-australsky-ovcak_15556346855283.jpg?ver=1555634685).*

2.1.2 Německý ovčák

Plemeno německý ovčák má původ v Německu, kde je chov ovčáckých plemen psů dlouholetou tradicí. Dříve bylo hlavním úkolem psa ochránit stádo před velkými šelmami, jako jsou medvědi, ryši a vlci. Po válce, když se otevřeli hranice s okolními státy, došlo téměř k vyhubení těchto šelem. Hlavním posláním ovčáckých psů už nebylo chránit stádo, ale držet jej pohromadě ve vymezených prostorách. Už nebylo zapotřebí psů s velkou konstitucí, ale psi lehčí, vytrvalí a pohybliví (Soukupová, 2006).

Významný kynolog Max von Stephanitz měl jasnou představu, jak by takové plemeno mělo vypadat a jaké by mělo mít vlastnosti. Dlouholetým šlechtěním dosáhl cíle a vyšlechtil nové národní plemeno ovčáka (Soukupová, 2006).

2.1.2.1 Charakteristika plemene

Tělo německého ovčáka je obdélníkového tvaru. Je přibližně o 10-17 % delší než je kohoutková výška. Hřbet je silný a rovný, záď se pomalu svažuje. Ocas je svěšený a dlouhý, sahá nejméně k hlezenním kloubům. Hrud' je hluboká, žebra dlouhá a dobře tvarovaná. Plemeno je střední velikosti. Psi dosahují kohoutkové výšky 60-65 cm a feny 55-60 cm (Cunliffe, 2004).

Srst německého ovčáka je hustá, rovná a tvrdá. Chlupy jsou delší na límci, ocasu, kalhotách a zadní straně končetin. Na obličeji a předních stranách končetin jsou chlupy kratší. Vyskytují se i další varianty typu srsti, ty jsou ale nežádoucí. Chlupy jsou delší, nepřiléhavé a srst je příliš jemná. Často chybí podsada. Zbarvení srsti je černé s červenohnědými, hnědými nebo žlutými znaky. Německý ovčák může být také celý černý, šedý nebo šedý s česným sedlem a maskou. Bílé znaky jsou nežádoucí. Nos musí být vždy černý. Podsada je vždy lehce našedlá (Samms, 1999)

Německý ovčák je velmi inteligentní pes, který rád pracuje. Silně se fixuje na svého pána. Ostražitě pozoruje jeho okolí a je připraven bránit jeho obydlí, majetek i rodinu. Má vynikající čich a díky hustotě srsti je odolný vůči nepříznivému počasí. Vzhledem ke své povaze se jedná o plemeno, které se využívá v armádě a u policie při vyhledávání drog. Může se také využívat v psích sportech a jako společník pro aktivně založené lidi. Typický německý ovčák je na obrázku 2 (Verhoef-Verhallen, 2010).



Obr. č. 2: Typický zástupce plemene německého ovčáka (Autor: NOHELOVÁ, 2014; Německý ovčák https://www.ifauna.cz/upload/clanky/photos/gallery/201809/6958-nemecky-ovcak_15556375138828.jpg?ver=1555637513).

2.1.3 Border kolie

Plemeno border kolie vzniklo v Northumberlandu: je to místo, kde se nachází hranice mezi Anglií a Skotskem. Odtud si také nese své jméno. Border znamená v překladu hranice. Tito psi byli vyšlechtěni za účelem hlídání a pasení hospodářských zvířat, zejména ovcí. Všechny border kolie jsou potomky psa, který se jmenoval Old Hemp. Old Hemp byl pes chytrý a klidný. Jeho majitel Adam Telfer ho využíval k práci s ovce. Byl známý jako nejlepší pastevecký pes v okolí. Border kolie se stala populární až na konci 19. století, kdy Old Hemp v roce 1984 poprvé složil pasteveckou zkoušku (Singer, 2011).

2.1.3.1 Charakteristika plemene

Tělo border kolie je obdélníkového rámce, délka těla je o něco větší než jeho výška. Krk je kratší ale dobře svalnatý a silný. Trup je atletický. Ocas nízko nasazený. Pohyb border kolie působí plynule a neúnavně. Tito psi mají drobné proporce. Psi dosahují kohoutkové výšky 50-55 cm a feny 47-52 cm (Price, 2014).

Srst border kolie je střední textury, tvořena měkkou a hustou podsadou, díky které jsou schopné odolávat i nepříznivým vnějším podmínkám. Délka srsti se vyskytuje ve dvou variantách. Krátká srst, která je oceňována především u jedinců využívaných při práci a dlouhá srst, která je vyžadována u border kolií na výstavách. Barva srsti může být různá, nikdy však nesmí převládat bílá barva. Nejčastější zbarvení je černobílé (FCI standart, 2009).

Povaha border kolie odpovídá způsobu využití, ke kterému bylo toto plemeno využito. Jsou to psi živí, pozorní inteligentní a hlavně poslušní. Nesmí vykazovat žádné známky agresivity. V dnešní době se stala border kolie i oblíbeným domácím mazlíčkem. Vzhledem k temperamentu je nutno co nejvíce zaměstnávat. Své uplatnění nachází například v agility, kdy psi překonávají různé překážky nebo caniscrossu, kde doprovázejí své majitele při běhu různým terénem. Na obrázku 3 je typický zástupce border kolie s černobílým zbarvením, které se u toho plemene vyskytuje nejčastěji (Tučimová, 2020).



Obr. č. 3: Fena plemene border kolie s černobílým zbarvením. Jedná se o nejčastější zbarvení jedinců tohoto plemene (zdroj: POLÁKOVÁ, *Border kolie* http://www.sweetcavaliers.cz/images/Yaminka_SV2.jpg).

2.1.4 Dlouhosrstá/krátkosrstá kolie

Původ kolie není doposud zcela znám. Existují dvě teorie o vzniku plemene. Podle první teorie bylo plemeno na Britské ostrovy zavlečeno s přistěhovalci. Další teorie předpokládá vznik šlechtěním loveckých psů ve Skotsku. Jisté ale je, že ze Skotska bylo plemeno převezeno do Anglie. V Anglii byly kolie dále šlechtěny až do podoby, ve které je známe dnes. Na rozšíření plemene má velký podíl královna Viktorie, která si při své cestě na Balmoar kolie oblíbila a chovala ve všech barevných variantách. Později došlo k rozdělení kolí na dvě třídy. Krátkosrsté a dlouhosrsté kolie, které se liší v délce srsti (Moore, 2001).

2.1.4.1 Charakteristika plemene

Všechny části těla kolie jsou ve správném poměru k celku, trup je jen nepatrně delší, než je výška v kohoutku. Stavba těla je silná, bez známek těžkopádnosti. Hřbet je pevný, záď mírně klenutá. Ocas je dlouhý, nízko nesený. Vždy ale musí mít zvednutou špičku. Pro kolie je charakteristický pohyb, který musí být vždy jistý,

lehký a plynulý. Psi dosahují kohoutkové výšky 56-61 cm a fený 51-56 cm (FCI standart, 2009).

Délka srsti kolií je buď krátká, nebo dlouhá, hrubá na dotek. Psi s dlouhou srstí si našli oblibu především kvůli svému vzhledu. Psi s krátkou srstí nikdy nepřišli do módy. Byly využívány především pro práci s dobyt看em. Svou oblibu si našli až v posledních letech díky své nenáročnosti a skvělým vlastnostem, díky kterým vynikají v psích sportech. Nejčastější zbarvení srsti kolií je blue-merle, white sable a trikolor (Krämer, 2002).

Kolie je pes, který je inteligentní a učenlivý. Zároveň je velmi citlivý, špatně snáší hrubé zacházení. Povaha krátkosrsté kolie se liší v temperamentu, který je o něco větší než u kolie dlouhosrsté. Obě tato plemena jsou velmi citově vázána na svého pána a jeho rodinu, mají dobrý vztah k dětem. Rozdíl mezi dlouhosrstou a krátkosrstou kolií je vidět na obrázku 4 (dlouhosrstá kolie) a na obrázku 5 (krátkosrstá kolie) (Krämer, 2002).



Obr. č. 4: Fotografie dlouhosrsté kolie (Zdroj: Kučeriková, 2015; *Erny Gold Coll-Kony*
– P <http://www.collie-sheltie-club.cz/userFiles/klubovi-sampioni-krazy/erny-gold-coll-kony.jpg>



Obr. č. 5: Stavba těla krátkosrsté kolie je stejná jako u kolie dlouhosrsté. Liší se pouze v délce jejich srsti (Zdroj: DOBROVSKÁ, 2016; *Kolie krátkosrstá* https://www.ifauna.cz/upload/clanky/photos/gallery/201809/7790-kolie-kratkosrsta_15556406627350.jp)

2.2 Genom psa

Pes domácí je již dlouho předmětem pozornosti vědců. Na rozdíl od ostatních modelových organismů bylo velice obtížné odhalit genetický základ pro určité fenotypové vlastnosti, jako jsou barva a struktura srsti, chování, velikost a další morfologické znaky. Ty se totiž výrazně liší u jednotlivých plemen. U psa se navíc vyskytuje řada symptomů nemocí, které se objevují i u lidí. U ostatních modelových organismů je výskyt těchto nemocí výrazně nižší. Pes domácí se tak stává důležitým prvkem pro studium lidských genetických chorob (Wayne a Ostrander, 2007).

Psí genom byl poprvé osekvenován v roce 2003 americkou institucí *The National Human Genome Research Institute* (NHGRI). K výzkumu byl použit vzorek DNA fený boxera Tashy. Toto plemeno bylo vybráno z důvodu vysoké prošlechtěnosti. Předpokládala se vysoká genetická homogenita. Po porovnání s předchozími rozbory se ukázalo, že je genom Tashy téměř univerzální i pro ostatní plemena (Guyon a kol., 2003).

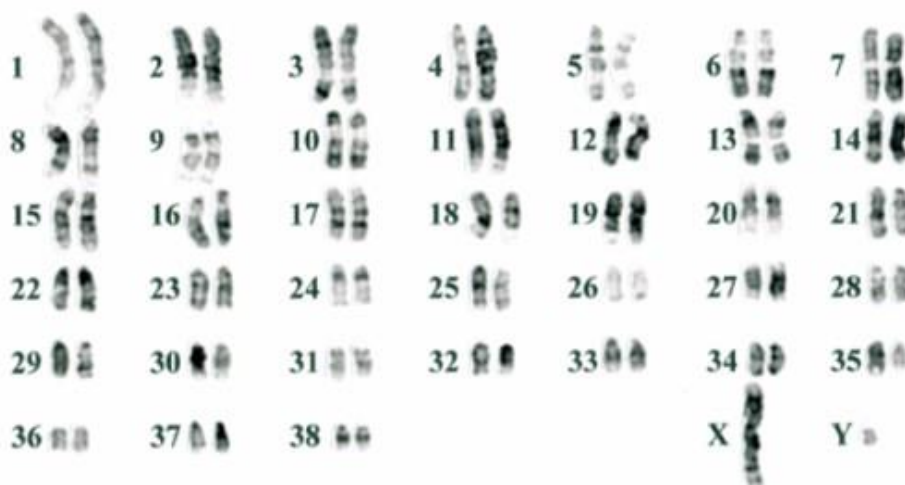
Genom psa je velký přibližně 2,4 miliardy bází. Genetická informace se nachází na 78 chromozomech - 38 párů akrocentrických autozomů a 1 pár pohlavních

chromozomů. U feny jsou pohlavní chromozomy XX a u psa XY. Na obrázku 6 a na obrázku 7 je uveden typický karyotyp psa (Reimann a kol., 1999).

Při porovnání s lidským genomem je genom psa přibližně o 18 % menší než genom člověka. Počet genů je také nižší. Uvádí se, že psí genom obsahuje 20 439 genů. To je přibližně pouze 5 % z celkové DNA. Zbytek DNA je nekódující (Dostál, 2007).



Obr. č. 6: Metafázové stadium v mitóze (zdroj: BREEN, 2018. *Canine Karyotypy* https://www.breenlab.org/img/chromo_prep.jpg)



Obr. č. 7: Karyotyp psa metou FISH (zdroj: BREEN, 2018. *Canine Karyotypy* https://www.breenlab.org/img/chromo_prep.jpg)

2.2.1 Gen *HSF4*

Gen *HSF4* (heat shock transcription factor 4) se u psů v závislosti na plemeni nachází na chromozomu 5 nebo 13. Například u stafordširského bulteriéra byl gen *HSF4* mapován na 5. chromozomu (Mellersh a kol., 2006). U ovčáckých plemen psů se nachází na 13 chromozomu (Ricketts a kol., 2015).

Patří do skupiny genů nazývajících se transkripční faktory tepelného šoku, která aktivuje geny zodpovídající za expresi proteinů tepelného šoku (HSP). HSP jsou produkovány, pokud je buňka vystavena stresovým podmínkám, jako jsou například tepelný šok, UV záření, těžké kovy, chlad, volné radikály nebo bakteriální či virová infekce. Tyto proteiny jsou důležité pro ochranu buněk před jejich poškozením (De Maio, 1999; Smaoui a kol., 2004).

HSP jsou produkovány ve všech organismech v různých subcelulárních kompartmentech. Patří do skupiny proteinů nazývané molekulární chaperony. Funkce chaperonů je regulace proteosyntézy. Vážou se na nově vzniklý peptid a napomáhají ke správnému složení do trojrozměrného tvaru. Vznikne-li špatně složený protein, chaperony ho dokážou rozložit a znovu složit do správné podoby, nebo ho odstraní (Ohtsuka a Hata, 2009).

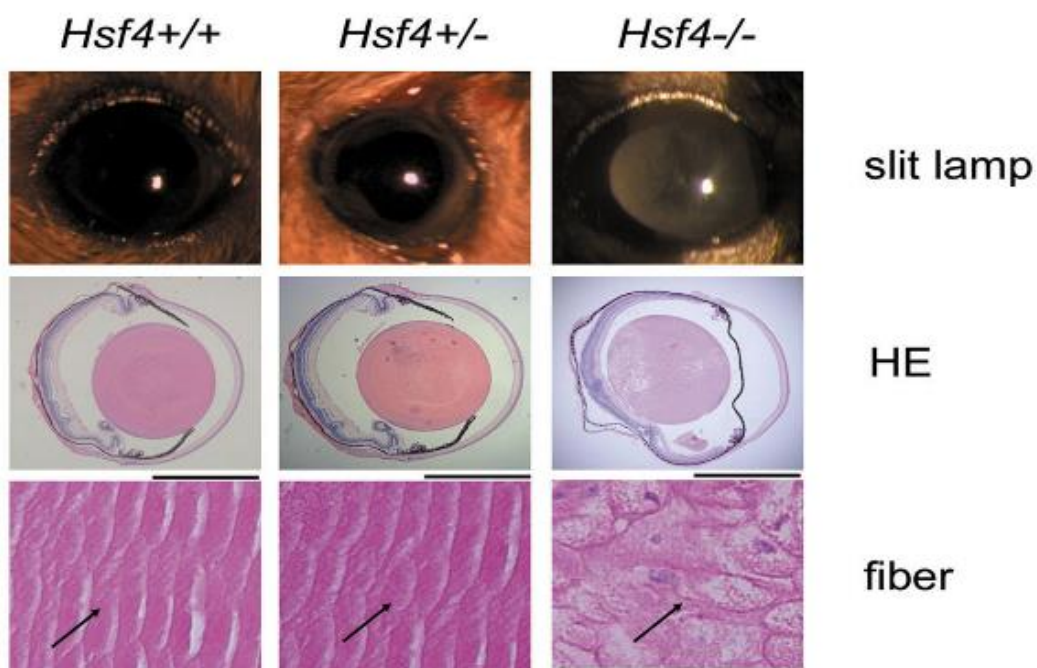
HSP vytvářejí váček, do kterého jsou zachyceny antigenní proteiny (proteiny vzniklé při stresových podmínkách). Takto zachycené antigenní proteiny jsou dále předávány antigen prezentujícím buňkám (APC). Tento krok je nezbytný pro vytvoření potenciální odpovědi peptidově specifických T-lymfocitů. HSP jsou díky schopnosti předávání antigenu APC velmi důležité pro správné fungování imunitního systému. Pokud by k tomuto ději nedocházelo, hromadily by se antigenní proteiny v buňce a mohlo by dojít k jejich vzájemné integraci, která by mohla vést ke vzniku proteinových agregátů. (Lindquist, 1986; Javid a kol., 2007).

Gen *HSF4* hraje také důležitou roli při vývoji oční čočky. V oblasti exonu 9 může dojít k mutaci. Jedná se o inzerci jednoho nukleotidu C. Tato mutace způsobuje vznik předčasného stop kodonu. Následkem mutace je větší náchylnost psa ke vzniku hereditární katarakty (Nicholas, 2012).

Mechanismus vzniku hereditární katarakty není doposud zcela objasněn. Podle některých studií mutace genu *HSF4* způsobuje nadměrnou proliferaci epitelových buněk oční čočky. Dochází tak k vytvoření nadměrného množství vláknitých buněk v oční čočce. S rostoucím věkem je uspořádání těchto buněk narušené

a nepravidelné. Důsledkem je přerušení konečné terminace vláknitých buněk oční čočky (Gao a kol., 2007).

Shi a kol. (2009) analyzovali ve své práci změny komponentů oční čočky. Jako model použili myši, u kterých byl proveden knockout genu *HSF4* a lidské epiteliální buněčné linie. Podle výsledků jejich práce *HSF4* reguluje komplexní řadu proteinových struktur čočky. Tento gen má také velmi důležitou roli při vývoji čočky během pozdního embryonálního a postnatálního stádia vývoje. Narušení genu může vést ke vzniku šedého zákalu mnoha cestami. Na obrázku 8 je patrný rozdíl mezi vlákny oční čočky u myši s původním genem *HSF4*^{+/+} a myši s knockoutovaným genem *HSF4*^{-/-}. Struktura vláken oční čočky myši s genotypem *HSF4*^{-/-} je narušená, dochází k zániku těchto vláken (Shi a kol., 2009).



Obr. č. 8: Rozdíl mezi vlákny oční čočky u myši s původním genem *HSF4*^{+/+} a myši s knockoutovaným genem *HSF4*^{-/-}. Struktura vláken oční čočky myši s genotypem *HSF4*^{-/-} je narušená, dochází k zániku těchto vláken. V případě heterozygota *HSF4*^{+/-} jsou vlákna narušena méně, šedý zákal postihuje oční čočku v menším rozsahu (zdroj: Shi a kol., 2009 <http://bmc molbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2199-10-10>)

2.3 Katarakta-šedý zákal oční čočky

Existuje mnoho forem šedého zákalu oční čočky. Některé formy se vyskytují ve stáří a vyvíjí se velmi pomalu, jiné formy se můžou objevit již v několika týdnech stáří. V jakém věku se nemoc projeví, závisí především na plemeni psa. Průběh

katarakty je oboustranný. To znamená, že se vyvíjí na obou očích stejně. Ve výjimečných případech může být průběh na každém oku jiný (Dostál, 2007).

Hereditární katarakta (HC) patří mezi jedno z nejčastějších očních onemocnění, které může vést až ke slepotě psa. Závažnost hereditární katarakty záleží na mnoha faktorech, jako jsou anatomická pozice oční čočky nebo přítomnost další oční vady (Mellersh a kol., 2006).

Obecně rozdělujeme kataraktu na dva druhy. Primární katarakta je dědičná forma katarakty, která je způsobena změnou genetické informace. Sekundární katarakta není přenášena z generace na generaci, ale je způsobena vlivem vnějšího prostředí. Může jí předcházet jiné oční onemocnění, zejména atrofie sítnice, dysplazie sítnice, nebo zelený zákal (Mellersh a kol., 2006).

Jako kandidátní gen vzniku HC u ovčáckých plemen psů byl vyhodnocen gen *HSF4* (Mellersh a kol., 2007). Sally L. Ricketts a kol. (2015) použili ve své studii o HC 400 psů plemene australský ovčák. Předpokládali, že psi, u kterých se projevila HC, budou mít mutaci genu *HSF4*. Přibližně u 10 % psů s bilaterálním šedým zákalem se ale tato mutace nepotvrdila. Genom těchto psů byl osekvenován a byl zmapován chromozom 13 a chromozom 5. U těchto chromozomů byl předpoklad výskytu genů, které by se mohli podílet na vzniku HC. Na chromozomu 13 některých jedinců byl identifikován gen *SCFD2*, který by také mohl mít vliv na vznik HC (Ricketts a kol., 2015).

2.3.1 Léčba

U lidí je nejčastější léčba šedého zákalu operace oka, při které se odstraní zakalená čočka a nahradí se umělou nitrooční čočkou. Jedná se o implantát, který je nejčastěji z plexiskla. Malý kousek lomivé umělé hmoty, který je umístěn místo čočky umožňuje po operaci dobré vidění. Důležité pro operaci bez komplikací je zahájení léčby včas. Odkládání operace může způsobit tzv. přezrání zákalu a dokonce i k oslepnutí. První operace byla provedena již v roce 1745 Francouzem Jacquesem Davielem, v té době bylo možné pouze čočku z oka odoperovat. K první úspěšné implantaci umělé čočky uskutečnil v roce 1949 anglický oční lékař Harold Ridley (Pitrová, 1993)

HC u psa může být léčena aplikací očních kapek, které oddalují vývoj onemocnění nebo chirurgicky implantací oční čočky. Chirurgická metodika závisí na věku psa a symptomů s ohledem na pooperační léčbu. Pro jednodušší průběh

léčby je důležité včas detekovat onemocnění. Majitelé psů mají mnohdy málo povědomí o HC. Nepřikládají proto váhu k signálům ukazujícím na poruchu zdraví u svého psa. Psi trpící HC se drží častěji u svého majitele a při chůzi se potácí. Aby nedošlo k zanedbání nemoci, jsou nutné pravidelné návštěvy veterinárního lékaře, který dokáže identifikovat abnormality ve struktuře čočky (Kim, 2016).

2.4 Diagnostika hereditární katarakty

Včasná detekce mutace genu *HSF4* způsobující HC je velmi důležitá pro efektivní léčbu HC. V pozdějším stadiu se může HC stát trvalou. Během léčby může také dojít k častějším komplikacím. Při operaci čočky mohou vzniknout v pouzdru trhlinky nebo se může dokonce celá čočka utrhnout a spadnout do sklivcového prostoru. Dojde sice k odstranění šedého zákalu, ale už není možné implantovat umělou čočku. Diagnostika HC spočívá především ve sledování stavu zornice. Šedočerná zornice oka změní barvu na šedobílou až křídově bílou. Zpočátku nemoci není ovlivněno vidění. To se zhorší až v pokročilém stadiu. Pes se začne hůře orientovat, může dokonce narážet do věcí. Šedý zákal lze také odhalit tzv. metodou zvanou reflex očního pozadí (tepální reflex), kdy se při osvětlení oka šedočerná zornice zdravého psa zbarví od zelené přes žlutou až po růžovou. U lidí se tento jev nazývá červený reflex. Na rozdíl od psa se ale zornice zdravého člověka při osvětlení zbarví červeně. Tento jev lze například pozorovat při fotografování s přídatným bleskem. Šedý zákal brání k dopadu světla na pozadí zornice a nemůže tak dojít k vybarvení reflexu. K domácí diagnostice postačí lampička s halogenovou žárovkou a zrcátko, pomocí kterého odrážíme světlo z lampičky psovi do očí. Oko by se mělo zbarvit žlutozeleně (nebo růžově či zeleně). Pokud k zabarvení nedojde, má pes s největší pravděpodobností šedý zákal. Diagnózu ale musí určit zkušený veterinární lékař, který má zkušenosti s vyšetřováním očí (Vlach, 2004).

Veterinární lékař používá k vyšetření oftalmolog. Díky oftalmologu může posoudit vzhled oka, pohyblivost oční koule, neurologické oční reflexy a reakce zornice. V zatemnělé místnosti pomocí speciální štěrbinové lampy (obrázek 9), která obsahuje biomikroskop s různě barevnými filtry a stroj umožňující změnu úhlů osvětlení může veterinární lékař zhodnotit stav spojivky, rohovky, přední oční komory a duhovky. Pomocí těchto postupů je vyšetřeno oční pozadí a určen stupeň šedého zákalu. Vyšetření by se mělo pravidelně opakovat u jedinců, u jejichž příbuzných se HC vyskytla. V posledních letech se začaly u některých plemen psů

dělat testy genetické. Na rozdíl od oftalmoskopie dokážou odhalit i skryté přenašeče a vyřadit je z chovu, aby se HC dále nešířila. K provedení genetického testu stačí pouze vzorek krve nebo stěr z bukální sliznice (Chmelíková, 2014).



Obr. č. 9: Vyšetření oka psa šěrbinovou lampou (autor: Beránek, 2017 <https://www.veterina-pce.cz/img/4/18.jpg>)

2.5 Genetické testy

Důležitou prevencí šedého zákalu jsou genetické testy pro odhalení mutace způsobující HC. Heterozygotní jedinci (a mnohdy i homozygotní jedinci) nemusí vykazovat známky nemoci. Předávají tak nevědomky mutaci do další generace. Genetické testy dokážou odhalit přenašeče HC se spolehlivostí nad 99 %. Díky nim mohou chovatelé zamezit narození štěňat, u kterých by se mohla nemoc projevit. Genetické testy pro odhalení HC detekují mutaci exonu 9 genu *HSF4* (Queney, 2012).

Nejčastěji používané testy k detekci mutace jsou různé modifikace PCR nebo metody s PCR kombinované. Nejprve je provedena klasická PCR a následně jsou analyzovány fragmenty pomocí kapilární elektroforézy. Citlivější metodou je sekvenování genomu nebo analyzovaného fragmentu. Pro potvrzení výsledků sekvenování lze použít PCR-RFLP. Restrikční enzym je používán *BfAI*, který štěpí DNA v oblasti CTAG. Tato metoda je vhodná pro odhalení mutace v exonu 9 genu *HSF4*, která spočívá v záměně A>G, která se vyskytuje u plemene anglický

kokršpaněl (Engelhardt a kol., 2007). U ovčáckých plemen psů se nejvíce využívá fragmentační analýza, která je velmi citlivá a spolehlivá (Engelhardt a kol., 2007; Mellersh a kol., 2009).

2.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je jednoduchá a rychlá metoda, která umožňuje z celého komplexu vybrat specifický fragment a ten amplifikovat v jakémkoliv množství. Princip celé reakce vychází ze znalosti replikace nukleových kyselin v buňce. PCR probíhá ve třech základních krocích, které se opakují. Tyto kroky jsou, denaturace, nasedání primerů a prodlužování vlákna. Reakce probíhá v přístroji termocykler (Garybian, 2013; Šmarda, 2005).

Existuje celá řada modifikací PCR. Mezi nejvíce používané patří například PCR-RFLP (stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů u produktů PCR. Nejprve se provede klasická PCR a následně je k produktu přidána restriční endonukleáza, která DNA specificky štěpí (Rasmussen, 2012).

Další významnou modifikací je real-time PCR (RT-PCR). PCR probíhá ve speciálním přístroji. Přístroj měří nárůst fluorescence. Umožňuje sledovat množství amplifikovaného produktu v každém cyklu. Velkou výhodou této metody je kvantifikace DNA (Deepak a kol., 2007).

Mezi další často využívané modifikace PCR patří například multiplex PCR, kdy je použito v jedné PCR reakci více párů primerů. Rt-PCR využívá jako templát cDNA vzniklý přepisem molekuly RNA do DNA pomocí reverzní transkriptázy. Tato metoda je vhodná pro vyhodnocování genové exprese. Alelově specifická PCR (AS PCR) využívá v PCR reakci primery nasedající na mutovanou/nemutovanou alelu a tím produkt buď vzniká, nebo nevzniká (záleží na navržení primerů) (Šmarda, 2005).

2.5.2 Gelová elektroforéza

Elektroforéza je jednou z nejčastěji používaných metod pro separaci fragmentů DNA z PCR reakce. Nejčastěji se používá agarózový gel, který umožňuje separaci fragmentů DNA v elektrickém poli, ve kterém se molekula DNA pohybuje směrem k anodě. Vizualizace produktů po separaci je možná pod UV světlem po obarvení vhodným barvivem, např. ethidium bromidem (Lee a kol., 2012; Ylmaz a kol., 2012).

2.5.3 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza je metoda vycházející ze Sangerovy metody sekvenování. Při sekvenování jsou za pomoci jednoho primeru generovány značené fragmenty všech délek a následně s jejich pomocí je sestaveno pořadí bazí v sekvenci DNA. Fragmentační analýza neurčuje pořadí bazí, ale dokáže určit velikost fragmentu s přesností jedné báze (Lee a kol., 2002).

Velkou výhodou je značení primerů fluorescenční barvou. Odpadá tak práce s radioaktivními látkami, které se využívají k vizualizaci DNA v jiných metodách. Také lze použít více barev (systém čtyř barev) a provést souběžnou analýzu více vzorků DNA najednou. Na obrázku 10 jsou uvedené některé komerčně dostupné fluorescenční barvy. Každá barva vyzařuje jiný světelný signál (6-FAM-modrý, VIC-zelený, NED-žlutý, PET-červený a LIZ-oranžový) (Klánová, 1999).

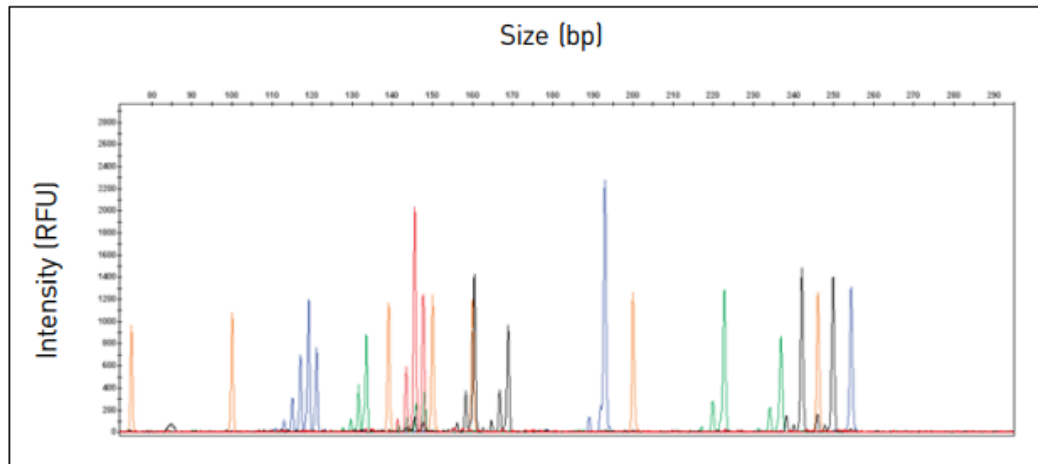
DyeSet	Filter	Blue	Green	Yellow	Red	Orange
DS-30	D	6-FAM™	HEX™	NED™	ROX™	-
DS-33	G5	6-FAM™	VIC®	NED™	PET®	LIZ®

Obr. č. 10 Komerčně dostupné fluorescenční barvy (zdroj: https://www.bioc.cam.ac.uk/files/media/copy_of_DyeSetssmall.png)

Metoda se skládá ze dvou jednoduchých kroků. Nejdříve proběhne PCR reakce, při které je fragment označen fluorescenčním primerem (vždy je značený jeden primer z každého páru, z pravidla bývá značen forward primer). Následně jsou produkty PCR hodnoceny pomocí speciálního přístroje zvaný sekvenátor. Sekvenátor funguje na principu kapilární elektroforézy (CE). Elektrokinetická injekce nasává fragmenty DNA z roztoku do kapiláry. Vysoké napětí působící na vzorek způsobuje pohyb molekuly DNA, která nese negativní náboj, kapilárou. Delší fragmenty jsou separovány na základě jejich celkového náboje. Před anodou jsou umístěny laserové paprsky. Procházející separované fragmenty DNA značené fluorescenční barvou pod těmito laserovými paprsky svítí. Světelný signál je detekován CCD kamerou (Applied Biosystem, 2014).

Výstupní data jsou zaznamenána ve formě elektroforeogramu. Velikosti fragmentů jsou znázorněny pomocí píků. Společně se vzorkem je analyzován vnitřní standard (Internal Size Standard), se kterým je délka fragmentů porovnávána. Vnitřní standard je soubor fragmentů o známé délce značený odlišnou fluorescenční barvou

než vzorek testované DNA. Nejčastěji se fragmentační analýza využívá k identifikaci jedince, zjišťování příbuzenských vztahů nebo určení paternity, analýze mikrosatelitů a SNP genotypizace. Na obrázku 11 je uveden příklad záznamu píků ve formě elektroforeogramu (Butler, 2005).



Obr. č. 11: Výstupní data fragmentační analýzy (zdroj: <https://www.bioc.cam.ac.uk/files/media/FA.png>)

Metoda není závislá na enzymatickém štěpení. Velkou výhodou fragmentační analýzy je citlivost. Touto metodou je možno určit velikost fragmentu s přesností jedné báze a to i z velmi malého množství materiálu, který ale musí být velmi čistý a kvalitní. Díky vysoké citlivosti a spolehlivosti je fragmentační analýza používána pro detekci fragmentů po genomové editaci, například metou CRISPR–Cas9 (Lonowski a kol., 2017).

Velkou výhodou CE je kromě vysoké citlivosti i možnost automatizace metody. CE je kompatibilní s řadou dalších metod, jako jsou například PCR-RFLP, fragmentační analýza, hmotnostní spektrometrie, sekvenování DNA apod. (Heller, 2001).

3 Cíle práce

- 1) Analýza genotypů několika jedinců ovčáckých plemen na základě fragmentační analýzy.
- 2) Optimalizace metody PCR pro detekci genu *HSF4* u ovčáckých plemen psů.
- 3) Zpracování literárního přehledu dosavadních poznatků o geneticky podmíněné chorobě hereditární katarakta u ovčáckých plemen psů.

4 Praktická část

4.1 Odběr vzorku

K analýze genu *HSF4* byla použita DNA izolovaná z bukálních stěrů ovčáckých plemen psů. Konkrétně se jednalo o plemena australský ovčák, německý ovčák, border kolie, dlouhosrstá kolie a krátkosrstá kolie.

Vzorky byly odebrány z bukální sliznice psů sterilním výtěrovým tampónem FLOQSwabs™ (Copan, ITA). U každého jedince byl odběr proveden dvakrát. Z každé strany bukální sliznice krouživými pohyby cytologickým kartáčkem po dobu nejméně 20 sekund byl odebrán vzorek DNA. Před odběrem bylo nutné zajistit, aby pes alespoň 20 minut nejedl, jinak by mohlo dojít ke kontaminaci vzorku.

Celkem byla použita DNA od 100 jedinců psů a fen v různém stáří. V tabulce 1 je uveden seznam psů, od kterých byl vzorek odebrán.

Tab. č. 1: Seznam psů, od kterých byl odebrán vzorek k analýze genu *HSF4*.

	Rasa	Pohlaví	Stáří psa	Datum odběru	Způsob odběru
1	Německý ovčák	Pes	1 rok	16.4.2019	Bukální stěr
2	Německý ovčák	Pes	4 roky	16.4.2019	Bukální stěr
3	Německý ovčák	Pes	2 roky	16.4.2019	Bukální stěr
4	Německý ovčák	Fena	8 let	16.4.2019	Bukální stěr
5	Německý ovčák	Fena	2 měsíce	16.4.2019	Bukální stěr
6	Německý ovčák	Fena	2 měsíce	16.4.2019	Bukální stěr
7	Německý ovčák	Pes	2 roky	16.4.2019	Bukální stěr
8	Německý ovčák	Pes	2 měsíce	16.4.2019	Bukální stěr
9	Německý ovčák	Fena	4 roky	16.4.2019	Bukální stěr
10	Dlouhosrstá kolie	Pes	2 roky	27.4.2019	Bukální stěr
11	Dlouhosrstá kolie	Pes	10 let	27.4.2019	Bukální stěr
12	Dlouhosrstá kolie	Fena	10 let	27.4.2019	Bukální stěr
13	Dlouhosrstá kolie	Fena	7 let	27.4.2019	Bukální stěr
14	Dlouhosrstá kolie	Fena	8 let	27.4.2019	Bukální stěr
15	Dlouhosrstá kolie	Pes	6 let	27.4.2019	Bukální stěr
16	Dlouhosrstá kolie	Pes	6 let	27.4.2019	Bukální stěr
17	Border kolie	Pes	6 let	1.5.2019	Bukální stěr

18	Border kolie	Pes	10 let	1.5.2019	Bukální stěr
19	Německý ovčák	Fena	1 rok	8.5.2019	Bukální stěr
20	Německý ovčák	Fena	8 let	8.5.2019	Bukální stěr
21	Německý ovčák	Fena	4 roky	8.5.2019	Bukální stěr
22	Německý ovčák	Pes	1 rok	8.5.2019	Bukální stěr
23	Německý ovčák	Pes	2 roky	8.5.2019	Bukální stěr
24	Německý ovčák	Fena	4 roky	8.5.2019	Bukální stěr
25	Německý ovčák	Pes	1 rok	8.5.2019	Bukální stěr
26	Německý ovčák	Fena	12 let	8.5.2019	Bukální stěr
27	Německý ovčák	Fena	4 roky	8.5.2019	Bukální stěr
28	Německý ovčák	Fena	3 roky	8.5.2019	Bukální stěr
29	Německý ovčák	Fena	7 let	12.5.2019	Bukální stěr
30	Německý ovčák	Fena	13 let	12.5.2019	Bukální stěr
31	Německý ovčák	Pes	8 let	12.5.2019	Bukální stěr
32	Německý ovčák	Pes	5 let	12.5.2019	Bukální stěr
33	Německý ovčák	Pes	4 roky	12.5.2019	Bukální stěr
34	Německý ovčák	Pes	8 let	25.5.2019	Bukální stěr
35	Německý ovčák	Pes	-	25.5.2019	Bukální stěr
36	Německý ovčák	Pes	4 roky	25.5.2019	Bukální stěr
37	Německý ovčák	Fena	4 měsíce	25.5.2019	Bukální stěr
38	Německý ovčák	Pes	1 rok	25.5.2019	Bukální stěr
39	Německý ovčák	Pes	2 roky	25.5.2019	Bukální stěr
40	Německý ovčák	Fena	9 let	25.5.2019	Bukální stěr
41	Německý ovčák	Pes	7 let	25.5.2019	Bukální stěr
42	Německý ovčák	Fena	1 rok	25.5.2019	Bukální stěr
43	Německý ovčák	Fena	3 roky	25.5.2019	Bukální stěr
44	Německý ovčák	Fena	7 let	25.5.2019	Bukální stěr
45	Německý ovčák	Fena	5 let	25.5.2019	Bukální stěr
46	Německý ovčák	Fena	5 let	25.5.2019	Bukální stěr
47	Německý ovčák	Pes	9 let	25.5.2019	Bukální stěr
48	Německý ovčák	Fena	4 roky	25.5.2019	Bukální stěr
49	Německý ovčák	Fena	6 let	25.5.2019	Bukální stěr
50	Německý ovčák	Fena	6 let	25.5.2019	Bukální stěr

51	Německý ovčák	Fena	3 roky	13.4.2019	Bukální stěr
52	Německý ovčák	Fena	7 let	13.4.2019	Bukální stěr
53	Německý ovčák	Fena	7 let	13.4.2019	Bukální stěr
54	Německý ovčák	Fena	10 let	13.4.2019	Bukální stěr
55	Německý ovčák	Fena	2 roky	13.4.2019	Bukální stěr
56	Australský ovčák	Fena	4 roky	13.4.2019	Bukální stěr
57	Australský ovčák	Fena	3 roky	13.4.2019	Bukální stěr
58	Australský ovčák	Fena	2 roky	13.4.2019	Bukální stěr
59	Německý ovčák	Fena	12 let	19.4.2019	Bukální stěr
60	Německý ovčák	Fena	-	19.4.2019	Bukální stěr
61	Německý ovčák	Pes	-	19.4.2019	Bukální stěr
62	Dlouhosrstá kolie	Pes	-	19.4.2019	Bukální stěr
63	Krátkosrstá kolie	Pes	4 roky	3.5.2019	Bukální stěr
64	Krátkosrstá kolie	Fena	3 roky	3.5.2019	Bukální stěr
65	Krátkosrstá kolie	Fena	6 let	3.5.2019	Bukální stěr
66	Krátkosrstá kolie	Pes	-	3.5.2019	Bukální stěr
67	Krátkosrstá kolie	Fena	-	3.5.2019	Bukální stěr
68	Border kolie	Fena	-	4.5.2019	Bukální stěr
69	Německý ovčák	Pes	-	4.5.2019	Bukální stěr
70	Krátkosrstá kolie	Pes	-	6.5.2019	Bukální stěr
71	Krátkosrstá kolie	Pes	-	6.5.2019	Bukální stěr
72	Krátkosrstá kolie	Pes	-	7.5.2019	Bukální stěr
73	Krátkosrstá kolie	Fena	-	7.5.2019	Bukální stěr
74	Krátkosrstá kolie	Fena	-	8.5.2019	Bukální stěr
75	Australský ovčák	Fena	-	12.5.2019	Bukální stěr
76	Australský ovčák	Fena	-	12.5.2019	Bukální stěr
77	Australský ovčák	Pes	-	12.5.2019	Bukální stěr
78	Border kolie	Pes	-	14.5.2019	Bukální stěr
79	Border kolie	Fena	-	14.5.2019	Bukální stěr
80	Německý ovčák	Fena	-	17.5.2019	Bukální stěr
81	Německý ovčák	Pes	-	18.5.2019	Bukální stěr
82	Krátkosrstá kolie	Pes	-	21.5.2019	Bukální stěr
83	Dlouhosrstá kolie	Fena	-	1.6.2019	Bukální stěr

84	Dlouhosrstá kolie	Pes	-	1.6.2019	Bukální stěr
85	Dlouhosrstá kolie	Fena	-	1.6.2019	Bukální stěr
86	Dlouhosrstá kolie	Fena	-	1.6.2019	Bukální stěr
87	Dlouhosrstá kolie	Pes	-	1.6.2019	Bukální stěr
88	Dlouhosrstá kolie	Pes	-	1.6.2019	Bukální stěr
89	Dlouhosrstá kolie	Fena	-	1.6.2019	Bukální stěr
90	Dlouhosrstá kolie	Pes	-	1.6.2019	Bukální stěr
91	Dlouhosrstá kolie	Pes	-	1.6.2019	Bukální stěr
92	Krátkosrstá kolie	Fena	-	1.6.2019	Bukální stěr
93	Dlouhosrstá kolie	Fena	-	1.6.2019	Bukální stěr
94	Dlouhosrstá kolie	Fena	-	1.6.2019	Bukální stěr
95	Dlouhosrstá kolie	Fena	-	1.6.2019	Bukální stěr
96	Německý ovčák	Fena	-	18.4.2019	Bukální stěr
97	Australský ovčák	Pes	7 let	13.4.2019	Bukální stěr
98	Australský ovčák	Pes	4 roky	13.4.2019	Bukální stěr
99	Australský ovčák	Fena	3 roky	13.4.2019	Bukální stěr
100	Australský ovčák	Fena	6 let	13.4.2019	Bukální stěr

(zdroj: autor)

Z celkového počtu 100 psů bylo 53 jedinců plemene německý ovčák, 10 jedinců plemene australský ovčák, 5 jedinců plemene border kolie, 20 jedinců plemene dlouhosrstá kolie a 12 jedinců plemene krátkosrstá kolie. Psů bylo celkem 43 a fen 57. Stáří jedinců bylo od 2 měsíců do 13 let. U některých jedinců nebyl věk znám.

4.2 Izolace DNA z bukálních stěrů psa

K izolaci DNA z odebraných vzorků byl použit komerční kit Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit; Geneaid dle doporučení výrobce.

Postup izolace DNA

Příprava vzorku

- Do připravených zkumavek o objemu 1,5 ml vložit odběrový tampon a krouživými pohyby uvolnit co nejvíce buněk do roztoku 500 µl S1 pufru a 20 µl proteinázy K. Poté ustříhnout konec odběrového tamponu. Zkumavku 10 sekund vortexovat a následně 10 minut inkubovat při teplotě 60 °C (po 5 minutách zvortexovat).
- Za pomoci sterilní pinzety přesunout odběrový tampon do filtrační kolonky vložené do 1,5 ml zkumavky. Vložit do centrifugy nastavené na 14 000 rpm a po dobu 2 minut centrifugovat. Filtrační kolonku vyhodit a eluát napipetovat k předešlému mixu.

Lýza buněk

- Přidat 500 µl S2 pufru a 1 µl nepřečištěné DNA. Ihned zvortexovat a 10 minut inkubovat při teplotě 60 °C (po 5 minutách zvortexovat).
- Přidat 500 µl absolutního etanolu a zvortexovat.

Navázání DNA na kolonky

- Připravit kolonky do 1,5 ml zkumavky. Napipetovat 750 µl vzorku a centrifugovat při 14 000 rpm po dobu 1 minuty. Eluát vylít, do stejné kolonky opět napipetovat 750 µl vzorku a znovu centrifugovat. Eluát vylít a vložit kolonku do nové 1,5 ml zkumavky.

Promytí DNA

- Do kolonky napipetovat 400 µl W1 pufru a centrifugovat při otáčkách 14 000 rpm 30 sekund.
- Vylít obsah zkumavky a znovu vložit kolonku. Napipetovat do kolonky 600 µl promývacího pufru a centrifugovat 30 sekund při 14 000 rpm.

Eluce DNA

- Vložit kolonku do nové 1,5 ml zkumavky.
- Přesně do středu kolonky napipetovat 100 µl předehřátého elučního pufru. Nechat 3minuty inkubovat při laboratorní teplotě. Centrifugovat 1 minutu při otáčkách 14 000 rpm. Kolonku odstranit.
- Vyizolovanou DNA skladovat při teplotě -20 °C.

4.3 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA se měří pomocí přístroje BioSpec-nano (Shimadzu). Jedná se o spektrofotometr, který kromě koncentrace DNA dokáže změřit i koncentraci nečistot. Výsledné koncentrace jsou uváděny v ng/μl.

Postup

- Napipetovat 1 μl blanku. Jako blank byl použit eluční pufr, ve kterém byla DNA rozpuštěna.
- Napipetovat 1 μl zvortexovaného vzorku DNA.

4.4 Detekce genu *HSF4* metodou PCR

Metoda PCR slouží k amplifikaci templátu DNA. Je nezbytná pro velkou část molekulárních metod. Pomocí této metody můžeme amplifikovat a detekovat zkoumaný gen nebo můžeme připravit vzorek k další analýze. V mé práci se jedná o přípravu vzorku pro fragmentační analýzu.

Příprava vzorku

- Připravit zkumavku 1,5 ml, do které bude připravena reakční směs.
- Reakční směs na jeden vzorek obsahuje 12,5 μl PPP MasterMixu (Top-Bio) 2xconc+Mg²⁺, 10,5 μl PCR vody, 0,5 μl forward (c=10 pmol/μl) primeru a 0,5 μl reverse primeru (10 pmol/μl). Sekvence primerů je uvedena v tabulce 2.
- Připravit tenkostěnné PCR zkumavky (0,2 ml). Do každé zkumavky napipetovat 24 μl reakční směsi.
- K reakční směsi napipetovat 1 μl templátu DNA (30-60 ng/μl).

Tab. č. 2: Sekvence primerů použitých k amplifikaci genu *HSF4* metodou PCR.

Primer	Sekvence (5'-3')
Exon9 <i>HSF4</i> _F	CGA GTG TGA CTT CTG CGT GA
Exon9 <i>HSF4</i> _R	GTT CAG GCT GTT GGG CAT T

(zdroj: Mellersh a kol., 2009).

Optimalizace reakčního protokolu

Aby bylo možné gen *HSF4* detekovat, nejprve je nutné metodu PCR optimalizovat. PCR reakční protokol se optimalizuje nastavením teplotního gradientu pro nasedání primerů na termocykleru (Termocykler Biometra Uno II). Schéma reakčního protokolu je uvedeno v tabulce 3.

Tab. č. 3: Schéma reakčního protokolu pro optimalizaci metody PCR.

	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	95 °C	10 min
Denaturace	95 °C	30 s
Nasedání primerů	52-62 °	30 s
Prodlužování vlákn	72 °	60 s
Terminální prodlužování vlákn	72 °C	10 min
Chlazení	4 °C	∞

} 32 cyklů

(zdroj: autor)

Vyhodnocení

Kontrola PCR reakce probíhá pomocí elektroforetické separace fragmentů na 2 % agarózovém gelu při napětí 90V po dobu nejméně 30 minut.

Na gelu by měl být patrný produkt o velikosti 120 bp odpovídající genu *HSF4*.

4.5 Příprava gelu a elektroforéza

Elektroforéza se používá k separaci fragmentů DNA. DNA nese záporný náboj a v elektrickém poli se pohybuje směrem k anodě. Větší fragmenty se pohybují v gelu pomaleji. Dle pohybu rychlosti fragmentů lze po porovnání s fragmenty o známé velikosti odhadnout jejich velikost. K separaci fragmentů genu *HSF4* byl použit 2 % agarózový gel.

Postup

Příprava 2 % gelu

- Navážit do baňky 2,2 g agarózy pro přípravu gelu.
- Přidat 120 ml 1x TBE pufu.
- V mikrovlnné troubě rozpustit, dokud nebude roztok čirý bez viditelných částic agarózy.
- Pod tekoucí vodou ochladit na teplotu přibližně 60-70 °C.
- Napipetovat 4 µl ethidia bromidu.
- Roztok nalít do připravené formy na gel a nechat ztuhnout.

Elektroforéza

- Gel vložit do elektroforetické vany.
- Do první jamky nanést 10 µl 100 bp DNA Ladder (NEB) a poté do následujících jamek nanést 20 µl vzorku PCR produktu.
- Nastavit elektroforetickou vanu na 90 V po dobu 30 minut. V případě potřeby čas prodloužit.
- Výsledek odečíst pod UV světlem.

4.6 Příprava vzorku pro fragmentační analýzu

Optimalizace metody

Pro optimalizaci metody byli použity 4 reakční směsi, které se lišily koncentrací DNA a množstvím primerů. Z každé směsi byly připraveny 4 vzorky, aby byly výsledky přesnější. Složení jednotlivých reakčních směsí je uvedeno v tabulce 4.

Při manipulaci s fluorescenčním primerem bylo nutné dbát zvýšené opatrnosti. Primer musí být uchováván v černé mikroskopické kádince a je zapotřebí zabránit příliš dlouhému působení světla. Jinak by mohlo dojít k degradaci fluorescenční barvy, neboli k takzvanému „vysvícení“ primeru. Primer byl značený 6-carboxyfluoresceinem (6-FAM). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab. č. 4: Složení jednotlivých reakčních směsí pro optimalizaci metody FA.

	Reakční směs 1	Reakční směs 2	Reakční směs 3	Reakční směs 4
Master mix	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
PCR H ₂ O	10,5 µl	10,5 µl	11 µl	11 µl
Forward primer	0,5 µl (10 pmol/µl)	0,5 µl (10 pmol/µl)	0,25 µl (10 pmol/µl)	0,25 µl (10 pmol/µl)
Reverse primer	0,5 µl (10 pmol/µl)	0,5 µl (10 pmol/µl)	0,25 µl (10 pmol/µl)	0,25 µl (10 pmol/µl)
Templát DNA	1 µl (10 µg/l)	1 µl (5 µg/l)	1 µl (10 µg/l)	1 µl (5 µg/l)

(zdroj: autor)

Tab. č. 5: Sekvence použitých primerů pro přípravu vzorků pro FA.

Primer	Sekvence (5'-3')
Exon9HSF4_F	FAM ^a - CGA GTG TGA CTT CTG CGT GA
Exon9HSF4_R	GTT CAG GCT GTT GGG CAT T

[^a] FAM = 6-carboxyfluorescein

(zdroj: Mellersh a kol., 2009).

Postup

- Připravit zkumavky 1,5 ml, do kterých budou připraveny reakční směsi.
- Připravit 4 reakční směsi dle tabulky č. - 4.
- Do PCR zkumavek (0,2 ml) napipetovat 24 µl reakční směsi. K reakční směsi napipetovat 1 µl templátu DNA.
- Vložit do termocykleru (Termocykler Biometra Uno II) s nastaveným příslušným reakčním protokolem dle tabulky 6.

Tab. č. 6: Reakční protokol pro přípravu vzorků k analýze metodou FA.

	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	95 °C	10 min
Denaturace	95 °C	30 s
Nasedání primerů	54 °	30 s
Prodlužování vlákn	68 °	60 s
Terminální prodlužování vlákn	72 °C	10 min
Chlazení	4 °C	∞

} 32 cyklů

(zdroj: autor)

Fragmentační analýzy byla provedena formou služby firmou SEQme na přístroji Applied Biosystems 3500 (Applied Biosystem). Jako velikostní standart byl použit 600LIZ. Výsledky elektroforeogramu byly vyhodnoceny v programu GeneMapper (Applied Biosystem).

5 Výsledky

5.1 Izolace DNA

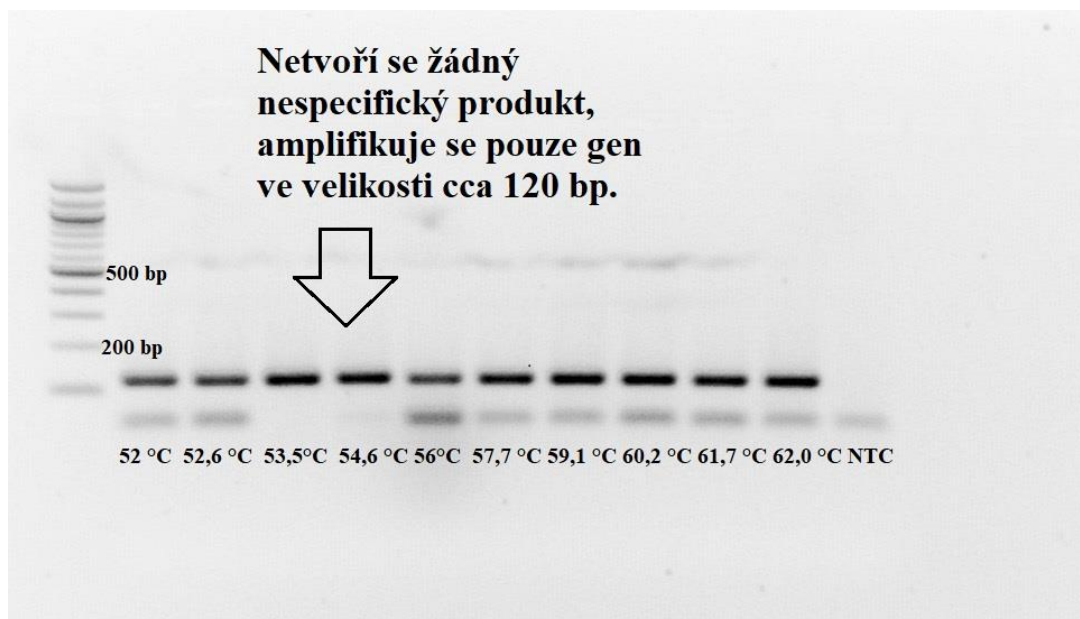
Nejdříve byla provedena izolace DNA z odebraných vzorků psů. K izolaci DNA byl použit komerční kit Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit; (Geneaid). Kontrola koncentrace a čistoty izolované DNA byla měřena přístrojem BioSpec-nano (Shimadzu).

Koncentrace i čistota se u některých vzorků výrazně lišila. Nízká koncentrace DNA mohla být způsobena špatným odběrem vzorku nebo špatnou manipulací se vzorkem (např. špatné uchování vzorku, chyby při izolaci DNA). Bylo obtížné zajistit, aby pes minimálně 20 minut před odběrem nejedl. I z toho důvodu moly být některé koncentrace DNA nižší. U některých psů, zejména u mladých psů a štěňat, nebyl odběr proveden dostatečně dlouho. Psi byli neklidní a nebyli zvyklí na manipulaci pro odběr vzorku.

Koncentrace DNA se průměrně pohybovali kolem 40 ng/μl. Nejnižší naměřená koncentrace byla 9,32 ng/μl a nejvyšší 131,54 ng/μl.

5.2 Detekce genu *HSF4* metodou PCR

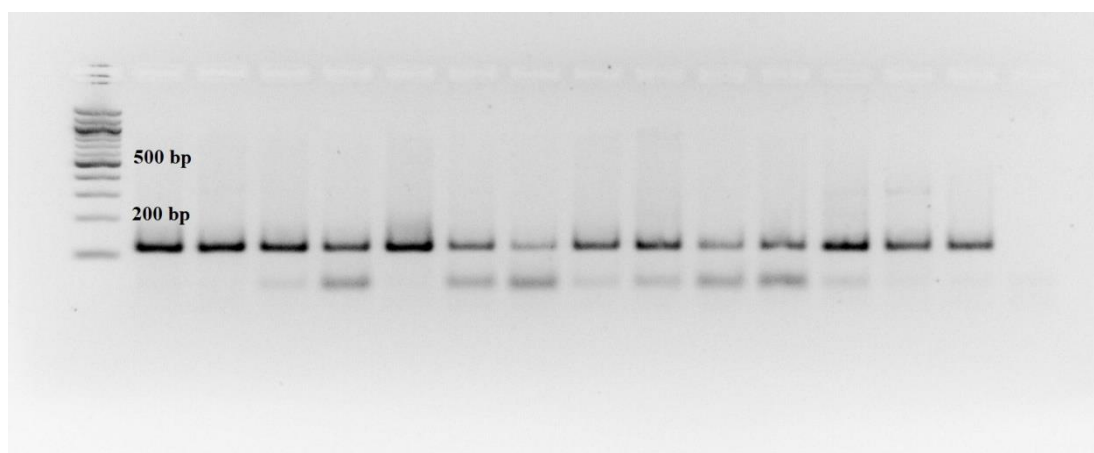
Dále byla provedena optimalizace metody pro detekci genu *HSF4* nastavením teplotního gradientu pro teplotu nasedání primerů. Teplota nasedání primerů byla nastavena na 52 °C, 52,6 °C, 53,5 °C, 54,6 °C, 56 °C, 57,7 °C, 59,1 °C, 60,2 °C, 61,7 °C, 59,1 °C, 60,2 °C, 61,7 °C, a 62,0 °C. Na obrázku 12 je vidět, že nejlépe PCR reakce proběhla při teplotě nasedání primerů 53,5 °C a 54 °C. Při těchto teplotách nebyl vytvořen žádný nespecifický produkt. Teplota nasedání primerů v reakční protokolu pro detekci genu *HSF4* byla na základě výsledků upravena na 54°C.



Obr. č. 12: Výsledky optimalizace metody PCR pro detekci genu *HSF4* nastavením teplotního gradientu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při teplotě 53,5 °C a 54,6 °C (zdroj: autor).

Po optimalizaci reakčního protokolu byl detekován gen *HSF4* u všech vzorků. Některé vzorky, zejména ty které měly nižší koncentraci nebo u nich byla naměřena horší hodnota ukazující čistotu vzorku, nebyly na gelu dobře viditelné. PCR reakce u nich byla zopakována. Do reakční směsi bylo přidáno větší množství templátové DNA.

Příklad vizualizace PCR produktů na 2 % agarózovém gelu je uveden na obrázku 13. Na gelu jsou viditelné fragmenty o velikosti 120 bp, které odpovídají genu *HSF4*.



Obr. č. 13: Ukázka výsledků detekce genu *HSF4* metodou PCR po elektroforéze nukleových kyselin (zdroj: autor).

5.3 Fragmentační analýza

Dle výsledků optimalizace metody fragmentační analýzy bylo dosaženo nejlepších výsledků u reakční směsi číslo 4 (viz tabulka 7). Pro analýzu vzorků byla reakční směs připravena dle těchto parametrů.

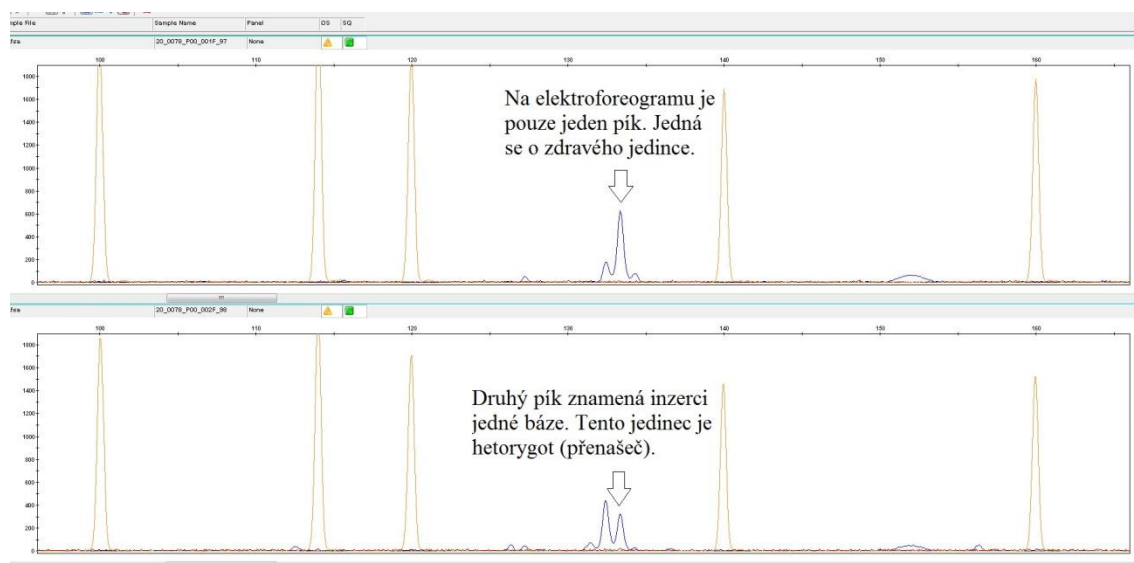
Tab. č. 7: Složení reakční směsi pro FA.

	Reakční směs 4
Master mix	12,5 μ l
PCR H ₂ O	11 μ l
Forward primer	0,25 μ l (10 pmol/ μ l)
Reverse primer	0,25 μ l (10 pmol/ μ l)
Templát DNA	1 μ l (5 μ g/l)

(zdroj: autor)

Data ze sekvenátoru byla zpracována pomocí programu GeneMapper a vizualizována v podobě píků. Na obrázku 14 je ukázka výsledků z fragmentační analýzy. V horní části obrázku je vidět výsledek typického zdravého jedince. Tento pes má normální alelu, proto je zaznamenán pouze jeden pík.

Jedná-li se o přenašeče, jedince, který nese jednu alelu mutovanou, zaznamená sekvenátor v důsledku inserce jedné báze 2 píky. Typický výsledek přenašeče je znázorněn v dolní polovině obrázku.



Obr. č. 14: Ukázka dat získaných z FA po zpracování v programu (zdroj: autor).

U některých vzorků byly píky příliš malé nebo dokonce žádné. Takové výsledky nebylo možné hodnotit. Vzorky byly znovu připraveny a odeslány do firmy SEQme k zopakování analýzy. Vzorky, které měly i po opakované analýze píky příliš malé, byly připraveny znovu. Koncentrace templátové DNA u těchto vzorků byla upravena z 5 µg/l na 10 µg/l.

I přes úpravu koncentrace templátové DNA se nepodařilo některé vzorky hodnotit. U těchto vzorků mohlo dojít k degradaci DNA vlivem dlouhodobého skladování. Chyba mohla nastat i při izolaci DNA nebo při odběru vzorku psa.

Vzorky, které se nepodařilo vyhodnotit, byly celkem 3. Jeden jedinec plemene australský ovčák byl vyhodnocen jako heterozygot (přenašeč HC). Zbytek vyšetřovaných psů (96 jedinců) byli vyhodnoceni jako zdraví, bez přítomnosti mutace genu *HSF4*. Na obrázku 15 jsou graficky znázorněné výsledky z FA.

Kompletní seznam výsledků z fragmentační analýzy je uveden v tabulce 8. Homozygoti jsou označováni jako clear a heterozygoti (přenašeči) jsou označováni carrier.



Obr. č. 15: Grafické znázornění výsledků (zdroj: autor).

Tab. č. 8: Výsledky z FA. Zdraví jedinci jsou označeni jako clear a heterozygoti (přenašeči) jako carrier.

Číslo vzorku	Rasa	Genotyp
1	Německý ovčák	Clear
2	Německý ovčák	Clear
3	Německý ovčák	Clear
4	Německý ovčák	Clear
5	Německý ovčák	Clear
6	Německý ovčák	Clear
7	Německý ovčák	Clear
8	Německý ovčák	Clear
9	Německý ovčák	Clear
10	Dlouhosrstá kolie	Clear
11	Dlouhosrstá kolie	Clear
12	Dlouhosrstá kolie	Clear
13	Dlouhosrstá kolie	Clear
14	Dlouhosrstá kolie	Clear
15	Dlouhosrstá kolie	Clear
16	Dlouhosrstá kolie	Clear
17	Border kolie	Clear
18	Border kolie	Clear
19	Německý ovčák	Clear
20	Německý ovčák	Clear
21	Německý ovčák	Clear
22	Německý ovčák	Clear
23	Německý ovčák	Clear
24	Německý ovčák	Clear
25	Německý ovčák	Clear
26	Německý ovčák	Clear
27	Německý ovčák	Clear
28	Německý ovčák	Clear
29	Německý ovčák	Clear
30	Německý ovčák	Clear

31	Německý ovčák	Clear
32	Německý ovčák	Clear
33	Německý ovčák	Clear
34	Německý ovčák	Clear
35	Německý ovčák	Clear
36	Německý ovčák	Clear
37	Německý ovčák	Clear
38	Německý ovčák	Clear
39	Německý ovčák	Clear
40	Německý ovčák	Clear
41	Německý ovčák	Clear
42	Německý ovčák	Clear
43	Německý ovčák	Clear
44	Německý ovčák	Clear
45	Německý ovčák	Clear
46	Německý ovčák	Clear
47	Německý ovčák	-
48	Německý ovčák	Clear
49	Německý ovčák	Clear
50	Německý ovčák	Clear
51	Německý ovčák	Clear
52	Německý ovčák	Clear
53	Německý ovčák	Clear
54	Německý ovčák	Clear
55	Německý ovčák	Clear
56	Australský ovčák	Clear
57	Australský ovčák	Clear
58	Australský ovčák	Clear
59	Německý ovčák	Clear
60	Německý ovčák	Clear
61	Německý ovčák	Clear
62	Dlouhosrstá kolie	Clear
63	Krátkosrstá kolie	Clear

64	Krátkosrstá kolie	Clear
65	Krátkosrstá kolie	Clear
66	Krátkosrstá kolie	Clear
67	Krátkosrstá kolie	Clear
68	Border kolie	Clear
69	Německý ovčák	Clear
70	Krátkosrstá kolie	Clear
71	Krátkosrstá kolie	Clear
72	Krátkosrstá kolie	Clear
73	Krátkosrstá kolie	Clear
74	Krátkosrstá kolie	Clear
75	Australský ovčák	Clear
76	Australský ovčák	Clear
77	Australský ovčák	Clear
78	Border kolie	Clear
79	Border kolie	Clear
80	Německý ovčák	Clear
81	Německý ovčák	Clear
82	Krátkosrstá kolie	Clear
83	Dlouhosrstá kolie	Clear
84	Dlouhosrstá kolie	Clear
85	Dlouhosrstá kolie	Clear
86	Dlouhosrstá kolie	-
87	Dlouhosrstá kolie	Clear
88	Dlouhosrstá kolie	Clear
89	Dlouhosrstá kolie	Clear
90	Dlouhosrstá kolie	Clear
91	Dlouhosrstá kolie	Clear
92	Krátkosrstá kolie	Clear
93	Dlouhosrstá kolie	Clear
94	Dlouhosrstá kolie	Clear
95	Dlouhosrstá kolie	Clear
96	Německý ovčák	-

97	Australský ovčák	Clear
98	Australský ovčák	Carrier
99	Australský ovčák	Clear
100	Australský ovčák	Clear

(zdroj: autor)

Jeden pes plemene australský ovčák (vzorek 98) byl detekován jako přenašeč mutace genu *HSF4* způsobující hereditární kataraktu. U vzorku 47, 86 a 96 nebylo možné zjistit výsledek. Píky elektroforeogramu byly moc nízké a nedalo se s přesností určit genotypy jedinců. Příčinou může být např. degradace materiálu, špatný odběr vzorku nebo chyba při izolaci DNA.

6 Diskuze

Primární hereditární katarakta je geneticky přenášená nemoc postihující více než sto plemen psů. U každého plemene psa se liší věk nástupu nemoci a také její příznaky. V rámci plemene bývají symptomy jednotné, nebo velmi podobné. U některých plemen ovčáckých psů se nemusí projevy katarakty dostavit během života psa vůbec. Genetické testy jsou jednou z možností pro odhalení postižených psů. Podle studie Mellersh a kol. (2009) je u australského ovčáka s mutací v genu *HSF4* riziko zvýšeno 17krát oproti jedincům u kterých se mutace nevyskytuje (Mellersh a kol., 2009)

Mellersh a kol. (2006) použili ve své práci DNA izolovanou z krve psů. Odebraná krev byla konzervována v roztoku EDTA a následně izolována komerčním kitem pro extrakci DNA (Tepnel, Manchester, UK). Ricketts a kol. (2015) ve své studii využili DNA izolovanou z krve nebo z bukálních stěrů. Odběr krve musí provádět veterinární lékař a jedná se o invazivní metodu způsobující diskomfort psa. Z tohoto důvodu byl odběr vzorku proveden pomocí bukálních stěrů. U některých vzorků nebylo možné odběr provést správně, především z důvodu agresivity psa. U těchto vzorků byla naměřena menší koncentrace DNA. K izolaci DNA byl použit komerční kit (Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit; Geneaid), který je určený právě pro izolaci DNA ze vzorku odebraných stěrem bukální sliznice.

K izolaci psí DNA je také možno použít i jiné biologické materiály, například kožní tkáň nebo chlup. Izolací DNA z psích chlupů se ve své studii zabývali Pfeiffer a kol. (2004). Z jejich výzkumu vyplývá, že je tento způsob získávání psí DNA pracný a problematický. Jednotlivé chlupy obsahují velmi malé množství DNA a mnohdy nemají žádné kořeny a folikuly. Genotypizace jedinců pomocí DNA získané z psích chlupů bývá proto velmi často neúspěšná.

Po izolaci DNA byl optimalizován PCR reakční protokol k detekci genu *HSF4*. Ten se lišil od teplotního profilu PCR Mellersh a kol. (2009) uvedeného v jejich práci v teplotě nasedání primerů (Mellersh a kol. (2009) uvádí jako optimální teplotu pro nasedání primerů 58 °C, rozdíl je tedy 4°C). Teplotní profil se také liší od reakčního protokolu uvedeného v práci Smaoui a kol. (2004) (teplota nasedání primerů se liší o 1 °C). Smaoui a kol. (2009) se ale zabývali detekcí genu *HSF4* ze vzorků lidské DNA.

Teplota nasedání primerů závisí na jejich složení a jejich délce. V diplomové práci jsou ale použity primery, které využívali Mellersh a kol. (2009) ve své práci. Rozdíl teplot mohl být způsobený rozdílnými laboratorními podmínkami, použitím jiného termocykleru nebo použitím reagentů od odlišného dodavatele k přípravě reakční směsi. V diplomové práci byl použit PPP MasterMixu (Top-Bio). Výše uvedení autoři MasterMix nepoužili, reakční směs připravili smícháním *Taq* polymerázy, $MgCl_2$ PCR pufru a dNTPs (volných nukleotidů).

Komerčně dostupný master mix obsahuje všechny komponenty nezbytné pro PCR reakci (kromě templátové DNA a primerů). Jedná se o velkou výhodu z hlediska časové náročnosti přípravy vzorků. Není zapotřebí smíchávat malé objemy reakčních složek, tím je také sníženo riziko kontaminace. Master mix firmy Top-Bio navíc obsahuje kromě aditiv zjednodušujících skladování a účinnost PCR i interní barvivo, díky kterému je možné nanášet vzorky na gel okamžitě bez nutnosti smíchávání amplifikovaných fragmentů s dalším barvivem (Top-Bio).

Jako metodu vhodnou pro analýzu genotypů psů byla zvolena fragmentační analýza. Stejnou metodu použili k detekci mutace genu *HSF4* ve své studii Mellersh a kol. (2006, 2009). Jedná se o velmi citlivou metodu, která dokáže odlišit velikosti fragmentů lišící se pouze o jednu bázi. Ricketts a kol. (2015) a Müller a kol. (2008) použili ve své práci pro genotypizaci jedinců metody sekvenování využívající platformy Illumina a Sangerovo sekvenování. Shi a kol. (2009) použili k analýze exprese genu *HSF4* u myši metody reverzní transkripce a real-time PCR. Tyto metody by byly ale v porovnání s fragmentační analýzou finančně náročnější. Fragmentační analýza je alternativní metodou klasickému sekvenování, která kromě financí šetří i čas.

Fragmentační analýza má v genetice psů celou řadu uplatnění. Například Savolainen a kol. (2000) využili tuto metodu pro forenzní vyšetřování DNA, konkrétně pro analýzu tandemových repetice mtDNA u domácích psů. Pomocí fragmentační analýzy odhalili inserce nebo delece v této oblasti a následně na základě získaných dat dokázali identifikovat jedince. Irion a kol. (2003) tuto metodu použili ve své práci k hodnocení genotypové variability u 28 psích plemen. Cílem práce bylo určit genetickou příbuznost těchto plemen a objasnit jejich fylogenezi. Ke studii bylo vybráno 100 mikrosatelitních markerů (autozomálně recesivní markery, Y chromozom markery, mtDNA markery a SNP).

Rutinní použití fragmentační analýzy pro testování genetických mutací psů je vhodné například pro detekci delece v genu *POMC*, která je spojována s obezitou u labradorských retrívrů (Lourenço a kol., 2019). Pro detekci mutace v genu *SERPINH1*, který kóduje vývoj kolagenu I. typu. Tato mutace má za následek onemocnění osteogenesis imperfecta projevující se zvýšenou lomivostí kostí u jezevčků (Eckardt a kol., 2013). Nebo pro screening genu *CNGAI*. Delece v tomto genu má za následek progresivní atrofii sítnice u sheltí (Wiik a kol., 2015).

Ricketts a kol. (2015) se ve své práci věnují kromě genu *HSF4* i dalším genům, které by mohli mít spojitost s HC. Jako nadějný marker se jeví gen *SCFD2*. Mutace v tomto genu byla nalezena u několik jedinců s HC. Zatím ale tento gen není příliš dobře znám. Prozatím jeho detekce slouží pouze jako kontrolní test při testování genu *HSF4*.

Po vyhodnocení dat ze sekvenátoru byl jeden pes plemene australský ovčák genotypizován jako přenašeč HC. Ostatní vzorky byly vyhodnoceny jako „čisté“, bez přítomnosti mutace. Vyšetřovaných jedinců plemene australského ovčáka bylo v diplomové práci celkem 10. Procento promořenosti by tak odpovídalo 10 % v populaci australského ovčáka. Queney (2012) analyzoval populaci australských ovčáků. Na základě získaných dat určil frekvenci výskytu u australského ovčáka na 23 %. Podle výsledků studie Mellersh a kol. (2009) je procento promořenosti přenašeče HC u australského ovčáka 15,7 % a homozygotních jedinců s HC 0,34 %.

Procenta promořenosti uvedena v publikacích mohou být ovlivněna místem, kde byla studie prováděna. Rozdíl by mohl být způsoben i rozdílnou velikostí testované populace. Mellersh a kol. (2009) a Queney (2012) měli k dispozici pro analýzu genu *HSF4* více jedinců, proto mohou být statistická data ovlivněna.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce byla optimalizace metody PCR pro detekci genu *HSF4* u ovčáckých plemen psů a následně analýza genotypů několika jedinců těchto plemen pomocí fragmentační analýzy.

Fragmentační analýza byla zvolena jako vhodná metoda z hlediska povahy mutace a také z hlediska finančního. Jedná se o levnější metodu, než je například klasické sekvenování, ale zároveň je to metoda citlivá a velmi spolehlivá.

Celkem bylo testováno 100 vzorků psů plemene australský ovčák, německý ovčák, border kolie, dlouhosrstá a krátkosrstá kolie. Vzorky byly odebrány cytologickým kartáčkem z bukální sliznice psů.

Pro izolaci DNA byl použit komerční extrakční kit. Hlavní výhodou komerčního kitu je rychlá a nenáročná izolace DNA, která je při větším množství vzorku potřeba. Kvalita takto izolované DNA je pro účely screeningu genu *HSF4* dostačující. Koncentrace izolovaných vzorků se pohybovala v rozmezí od 9,32 ng/μl do 131,54 ng/μl. Horší kvalita a menší koncentrace DNA mohla být způsobena špatným odběrem vzorku.

Po izolaci DNA byl optimalizován teplotní profil PCR. Gen *HSF4* byl detekován u všech jedinců. Následně byli jedinci genotypizováni za použití fragmentační analýzy. Primery použité k amplifikaci genu *HSF4* byly označeny fluorescenční barvou FAM. Následně byly fragmenty analyzovány formou služby firmou SEQme na přístroji Applied Biosystems 3500 (Applied Biosystem).

Tři vzorky se nepodařilo ani po opakované analýze vyhodnotit. 96 vzorků bylo vyhodnoceno jako zdraví jedinci a 1 pes plemene australský ovčák byl vyhodnocen jako přenašeč hereditární katarakty (celkem bylo testováno 10 psů plemene australský ovčák).

Po vyhodnocení výsledků lze konstatovat, že fragmentační analýza je pro vyšetření genu *HSF4* vhodná. Je to metoda citlivá a inzerce nukleotidu C byla detekována velmi přesně na základě rozdílných amplifikovaných fragmentů DNA.

Z výsledků také vyplývá, že se v chovech ovčáckých psů (především v chovu australského ovčáka) HC vyskytuje. Výskyt přenašečů je ale velmi nízký. I přes to, že se jedná o pozitivní zprávu, majitelé psů by neměli včasnou detekci mutace genu *HSF4* před zařazením psa nebo feny do chovu podcenit. Genetické testování psů je velmi důležité pro zabránění narození nemocných štěňat nebo přenašečů.

8 Seznam použitých zdrojů

- Butler, J. M., 2005. *Forensic DNA typing: biology & technology behind STR markers*. Academic Press.
- Císařovský, M., 1995. *Plemena psů A-Z*. Praha: Brázda. 270 s. ISBN 8020902562.
- Císařovský, M., 2008. *Pes: nekonečný příběh od pravěku do třetího tisíciletí*. Praha: Canis. 904 s. ISBN 9788090082014.
- Cunliffe, J., 2004. *Encyklopedie psů*. Praha: Slovart. 384 s. ISBN 80-7209-620-6.
- Deepak, S. A., Kottapalli, K.R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K.S., Iwahashi, H., Masuo, Y. a Agrawal, G.K., 2007. *Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes*. *Current Genomics*, 8 (4): 234-251, <http://dx.doi.org/10.2174/138920207781386960>.
- De Maio, A., 1999. *Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams*. *Shock*, 11 (1): 1-12, <http://dx.doi.org/10.1097/00024382-199901000-00001>.
- Dostál, J., 2007. *Genetika a šlechtění plemen psů*. České Budějovice: Dona. 264 s. ISBN 9788073221041.
- Eckardt, J., Kluth, S., Dierks, C., Philipp, U. a Distl, O., 2013. *Population screening for the mutation associated with osteogenesis imperfecta in dachshunds*. *Veterinary Record*, 172 (14): 364-364, <http://dx.doi.org/10.1136/vr.101122>.
- Engelhardt, A., Wöhlke A. a Distl O., 2007. *Evaluation of canine heat-shock transcription factor 4 as a candidate for primary cataracts in English Cocker Spaniels and wire-haired Kromfohrlanders*. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124 (4): 242-245, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0388.2007.00663.x>.
- Fogle, B., 1999. *Německý ovčák*. Čes. vyd. 2. Praha: Cesty. Příručky pro chovatele psů. 79 s. ISBN 8071813605.
- Gao, M., Huang, Y., Wang, L., Huang, M., Liu, F., Liao, S., Yu, S., Lu, Z., Han, S., Hu, X., Qu, Z., Liu, X., Ymer, T. A., Yang, L., Tang, Z., Li, D. W.-Ch. a Qu, Z., 2017. *HSF4 regulates lens fiber cell differentiation by activating p53 and its downstream regulators*. *Cell Death & Disease*, 8 (10): e3082-e3082, <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.478>.

- Guyon, R., Lorentzen, T. D., Hitte, Ch., Kim, L., Cadieu, E., Parker, H. G., Quignon, P., Lowe, J. K., Renier, C., Gelfenbeyn, B., Vignaux, F., DeFrance, H. B., Gloux, S., Mahairas, G. G. andré, C., Galibert, F. a Ostrander, E. A., 2003. *A 1- Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100 (9): 5296-5301, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0831002100>.
- Hartnagle-Taylor, J. J., 2013. *Australský ovčák od A do Z*. Praha: Plot. 384 s. ISBN 978-80-7428-198-3.
- Heller, C., 2001. *Principles of DNA separation with capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 22 (4): 629-643, [http://dx.doi.org/10.1002/1522-2683\(200102\)22:4629::AID-ELPS6293.0.CO;2-S](http://dx.doi.org/10.1002/1522-2683(200102)22:4629::AID-ELPS6293.0.CO;2-S).
- Horák, F., 2012. *Chováme ovce*. Praha: Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda. 412 s. ISBN 978-80-209-0390-7.
- Irion, D. N., Schaffer, A. L., Famula, T. R., Eggleston, M. L., Hughes, S. S. a Pedersen, N. C., 2003. *Analysis of Genetic Variation in 28 Dog Breed Populations With 100 Microsatellite Markers*. Journal of Heredity, 94 (1): 81-87, <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esg004>.
- Javid, B., MacAry, P. A. a Lehner, P. J., 2007. *Structure and Function: Heat Shock Proteins and Adaptive Immunity*. The Journal of Immunology, 179 (4): 2035-2040, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2035>.
- Kim, K. B., 2016. *Extraction of Canine Cataract Object for Developing Handy Pre-diagnostic Tool with Fuzzy Stretching and ART2 Learning*. The International Journal of Fuzzy Logic and Intelligent Systems, 16 (1): 21-26, <http://dx.doi.org/10.5391/IJFIS.2016.16.1.21>.
- Krämer, E. M., 1996. *Průvodce plemeny psů: [se všemi plemeny psů uznanými FCI]*. Ostrava: Blesk. 320 s. ISBN 8090018343.
- Krämer, E. M., 2010. *250 plemen psů: původ, charakter, chov*. Praha: Knižní klub. Universum (Knižní klub). 288 s. ISBN 978-80-242-2651-4.
- Krämer, E. M., 2002. *Kolie dlouhosrstá a krátkosrstá*. Praha: Cesty. 62 s. ISBN 8071817066.
- Lee, L. G., Taing, M. C. a Rosenblum, B. B., 2002. *Atropisomers of asymmetric xanthene fluorescent dyes and methods of DNA sequencing and fragment analysis*. U.S. Patent No. 6,448,407.

- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. a Kim, Y. H., 2012. *Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments*. Journal of Visualized Experiments, 2012(62):3923 (62), <http://dx.doi.org/10.3791/3923>.
- Lindquist, S., 1986. *The Heat-Shock Response*. Annual Review of Biochemistry, 55 (1): 1151-1191, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005443>.
- Lonowski, L. A., Narimatsu, Y., Riaz, A., Delay, C. E., Yang, Z., Niola, F., Duda, K., Ober, E. A., Clausen, H., Wandall, H. H., Hansen, S. H., Bennett, E. P. a Frödin, M., 2017. *Genome editing using FACS enrichment of nuclease-expressing cells and indel detection by amplicon analysis*. Nature Protocols, 12 (3): 581-603, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.165>.
- Lourenço, N. O. albuquerque, A. L. H., Basso, R. M., Trecenti, A. S. albertino, L. G., Melchert, A., Borges, A. S. a Oliveira-Filho, J. P., 2019. *Canine POMC deletion (P187fs) allele frequency in Labrador Retrievers in Brazil*. Pesquisa Veterinária Brasileira, 39 (11): 909-914, <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6419>.
- Mellersh, C. S., Pettitt, L., Forman, O. P., Vaudin, M. a Barnett, K. C., 2006. *Identification of mutations in HSF4 in dogs of three different breeds with hereditary cataracts*. Veterinary Ophthalmology, 9 (5): 369-378, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2006.00496.x>.
- Mellersh, C. S., Graves, K. T., McLaughlin, B., Ennis, R. B., Pettitt, L., Vaudin, M. a Barnett, K. C., 2007. *Mutation in HSF4 Associated with Early but Not Late-Onset Hereditary Cataract in the Boston Terrier*. Journal of Heredity, 98 (5): 531-533, <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esm043>.
- Mellersh, C. S., McLaughlin, B. ahonen, S., Pettitt, L., Lohi, H. a Barnett, K. C., 2009. *Mutation in HSF4 is associated with hereditary cataract in the Australian Shepherd*. Veterinary Ophthalmology, 12 (6): 372-378, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00735.x>.
- Moore, S., 2001. *Kolie*. Praha: Fortuna Print. 160 s. ISBN 8086144704.
- Müller, C., Wöhlke, A. a Distl, O., 2008. *Evaluation of canine heat shock transcription factor 4 (HSF4) as a candidate gene for primary cataracts in the Dachshund and the Entlebucher Mountain dog*. Veterinary Ophthalmology, 11 (1): 34-37, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2007.00598.x>.

- Ohtsuka, K. a Hata, M., 2009. *Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40-a review*. International Journal of Hyperthermia, 16 (3): 231-245, <http://dx.doi.org/10.1080/026567300285259>.
- Pfeiffer, I., Völkel, I., Täubert, H. a Brenig, B., 2004. *Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification*. Forensic Science International, 141 (2-3): 149-151, <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.01.016>.
- Pitrová, Š., 1993. *Chraňte svůj zrak*. Praha: Grada Avicenum. 120 s. ISBN 80-7169-037-6.
- Price, C., 2014. *Border kolie od A do Z*. Praha: Plot. 312 s. ISBN 978-80-7428-209-6.
- Rasmussen, H. B., 2012. *Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting*. Gel Electrophoresis – Principles and Basics. 315–334.
- Reimann, N., 1999. *Working with canine chromosomes: current recommendations for karyotype description*. Journal of Heredity, 90 (1): 31-34, <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/90.1.31>.
- Ricketts, S. L., Pettitt, L., McLaughlin, B., Jenkins, C. A. a Mellersh, C. S., 2015. *A novel locus on canine chromosome 13 is associated with cataract in the Australian Shepherd breed of domestic dog*. Mammalian Genome, 26 (5-6): 257-263, <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-015-9562-2>.
- Samms, S., 1999. *German shepherd dog*. Surrey, England: Pet Love. 157 s. ISBN 0966859200.
- Savolainen, P. arvestad L. a Lundberg J., 2000. *A Novel Method for Forensic DNA Investigations: Repeat-Type Sequence Analysis of Tandemly Repeated mtDNA in Domestic Dogs*. Journal of Forensic Sciences, 45 (5), <http://dx.doi.org/10.1520/JFS14820J>.
- Savolainen, P. arvestad L. a Lundberg J., 2000. *MtDNA Tandem Repeats in Domestic Dogs and Wolves: Mutation Mechanism Studied by Analysis of the Sequence of Imperfect Repeats*. Molecular Biology and Evolution, 17 (4): 474-488, <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026328>.

- Smaoui, N., Beltaief, O., BenHamed, S., M'Rad, R., Maazoul, F., Ouertani, A., Chaabouni, H. a Hejtmancik, J. F., 2004. *A Homozygous Splice Mutation in the HSF4 Gene Is Associated with an Autosomal Recessive Congenital Cataract*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 45 (8), <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.03-1370>.
- Shi, X., Cui, B., Wang, Z., Weng, L., Xu, Z., Ma, J., Xu, G., Kong, X. a Hu, L., 2009. *Removal of HSF4 leads to cataract development in mice through down-regulation of γ S-crystallin and Bfsp expression*. BMC Molecular Biology, 10 (1), <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-10-10>.
- Soukupová, E., 2006. *Německý ovčák*. Praha: Plot. Portréty (Plot). 93 s. ISBN 8086523705.
- Šmarda, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. 188 s. ISBN 8021038411.
- Taylor, D., 1994. *Váš pes: Všestranný průvodce pro chovatele psů: Péče o psy, o jejich zdraví a chování*. 2. vyd. Bratislava: Prúdy. 287 s. ISBN 8085355159.
- Verhoef-Verhallen, E., 2010. *Psi: velký atlas plemen*. 3. vyd. Čestlice: Rebo. 544 s. ISBN 9788025504338.
- Wayne, R. K. a Ostrander, E. A., 2007. *Lessons learned from the dog genome*. Trends in Genetics, 23 (11): 557-567, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2007.08.013>.
- Wiik, A. C., Ropstad, E. O., Ekesten, B., Karlstam, L., Wade, C. M. a Lingaas, F., 2015. *Progressive retinal atrophy in Shetland sheepdog is associated with a mutation in the CNGA1 gene*. Animal Genetics, 46 (5): 515-521, <http://dx.doi.org/10.1111/age.12323>.
- Ylmaz, M., Ozic, C. a Ihami, G., 2012. *Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis*. in Magdeldin, S. (ed.). Gel Electrophoresis-Principles and Basics, pp 34-40. <http://dx.doi.org/10.5772/38654>.

Internetové odkazy

- Applied biosystem. 2014. *DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis*. ThermoFisher SCIENTIFIC [online] [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/fragment-analysis-chemistry-guide.pdf>.

- Beránek, J., 2017. *Dědičné oční vady*. Veterinární klinika MVDr. Jiří Beránek, Ph.D. Specializované pracoviště pro choroby oční [online] [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: <https://www.veterina-pce.cz/dedicne-ocni-vady-1>
- Breen, M., 2018. *Canine Karyotype*. Breen lab [online] [cit. 2019-11-27]. Dostupné z: <https://www.breenlab.org/karotype.html>.
- Chmelíková, E., 2014. *Oční vady*. Hovawart klub ČR [online] [cit. 2020-03-27]. Česká zemědělská univerzita v Praze. Dostupné z: <https://www.hovawart.cz/zdravi/ocni-vady.php>.
- Dobrovská, K., 2016. *Kolie krátkosrstá*. [online] [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: https://www.ifauna.cz/upload/clanky/photos/gallery/201809/7790-kolie-kratkosrsta_15556406627350.jpg?ver=1555640662
- FCI standart, 2009. *Collie (Rough)*. Belgium: Federation cynologique internationale. Dostupné také z: <http://www.fci.be/Nomenclature/Standards/156g01-en.pdf>.
- FCI standart, 2009. *Border collie*. Belgium: Federation cynologique internationale. Dostupné také z: <https://www.bccc.cz/dokumenty/standard.pdf>.
- Hanzlová, M., 2012. *Australský ovčák*. [online] [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: https://www.ifauna.cz/upload/clanky/photos/gallery/201809/6139-australsky-ovcak_15556346855283.jpg?ver=1555634685.
- Klánová, 1999. *Zkušenosti s využitím fragmentační analýzy DNA na genetickém analyzátoru ABI Prism 310*. III pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů [online]. [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: <http://orion.chemi.muni.cz/Setkani/setkani3/setkani.htm>
- Nicholas, F., 2012. *Cataract, early onset in Canis lupus familiaris*. OMIA - Online Mendelian Inheritance in Animals [online]. [cit. 2019-12-02]. Dostupné z: <https://omia.org/OMIA001758/9615/>.
- Nohelová, E., 2014. *Německý ovčák*. [online] [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: https://www.ifauna.cz/upload/clanky/photos/gallery/201809/6958-nemecky-ovcak_15556375138828.jpg?ver=1555637513.
- Poláková, L., *Border kolie*. Sweet Cavalier [online]. [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: http://www.sweetcavaliers.cz/images/Yaminka_SV2.jpg

- Queney G., 2012. *Hereditary Cataract of Australian Shepherd: A hereditary ocular disease prevented thanks to a DNA test*. Antagene [online]. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: https://www.antagene.com/sites/default/files/cataract_australian_shepherd.pdf
- Singer, A., 2011. *Border Collie Breed History*. BorderCollieAdvice [online]. [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: <http://bordercollieadvice.com/history/>.
- Top-Bio. *PCR Master Mixy*. Top-Bio [online] [cit. 2020-05-22]. Dostupné z: <http://www.top-bio.cz/pcr-master-mixy-12.html>.
- Tučimová, J., *Využití border kolií*. Border collie club czech republic [online]. [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: <https://www.bccczech.cz/?r=opleneni>.
- Vlach, T., 2004. *Diagnostika šedého zákalu v domácích podmínkách*. Veterina-info [online]. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: <http://www.veterina-info.cz/odborne-clanky/diagnostika-sedeho-zakalu-v-domacich-podminkach-180.html>.

9 Seznam použitých zkratek

Např.	Například
Obr.	Obrázek
Tab.	Tabulka
Tzv.	Takzvaně
HC	Hereditární katarakta
FA	Fragmentační analýza
CE	Kapilární elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
A	Adenin
bp	Pár bází
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCR-RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů
AS PCR	Alelově specifická PCR
rt-PCR	Polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
RT-PCR	Real-time PCR
<i>HSF4</i>	Heat shock transcription factor 4 (Transkripční faktor tepelného šoku 4)
HSP	Proteiny tepelného šoku
APC	Antigen prezentující buňka
NK	Nukleová kyselina