

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE



Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních  
zdrojů  
Katedra genetiky a šlechtění

**Hodnocení genetické variability plemene bearded  
kolie pomocí molekulárních markerů**  
Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl  
Autor práce: Jana Ježková

2010

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Hodnocení genetické variability plemene bearded kolie pomocí molekulárních markerů“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Brandýse nad Labem dne: 1. 4. 2010

podpis autora práce

## Poděkování

Ráda bych touto formou poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi a konzultantce Ing. Daniele Čílové za rady a odborné vedení, dále všem chovatelům bearded kolií za poskytnutí vzorků. Velký dík patří i mé rodině a přátelům za podporu nejen během studia. Řešení diplomové práce bylo podpořeno Výzkumným záměrem FAPPZ ČZU v Praze MSM 6046070901.

## SOUHRN

Bearded kolie je spolehlivým a všestranným ovčáckým psem, který zvládá práci s různými druhy hospodářských zvířat. Plemeno se vyvíjelo přirozeně po mnoho století, ale po druhé světové válce se velikost populace dramaticky snížila a došlo k poklesu genetické proměnlivosti. Předmětem této práce bylo posoudit genetickou variabilitu bearded kolií na molekulární úrovni pomocí markerů majících vztah ke zbarvení srsti a chování psů. Vzorky DNA byly získány od 109 bearded kolií stěrem buněk z bukální sliznice.

Pozornost byla nejprve věnována genu pro *beta-defensin 103 (CBD103)*, jehož mutace vede u psů k dominantnímu eumelanistickému zbarvení srsti. Byla navržena dvojice PCR markerů umožňující jednoznačně detekovat trinukleotidovou delecii v genu *CBD103* a sekvenační analýzou bylo potvrzeno, že se jedná o triplet kódující glycin. U všech hodnocených psů, s výjimkou jednoho, byla zjištěna přítomnost této mutace v homozygotní sestavě. Výsledek odpovídá skutečnosti, že se u plemene bearded kolie nevyskytuje žluté ani vlkošedé agouti zbarvení. Jediná výjimka se týkala hnědého psa s pálením, který mohl být teoreticky nositelem jiného typu mutace *CBD103* genu.

Dále byl ověřen vliv jednotlivých bodových mutací genu *TYRP1* a jejich interakcí na výsledné zbarvení srsti u bearded kolií. Mutace v exonu 5 tohoto genu byly detekovány pomocí dvou PCR-RFLP markerů *TYRP1-331* a *TYRP-345*. Pro identifikaci mutace v exonu 2 bylo nutné navrhnout nový PCR-SSCP marker *TYRP-41*. Ve sledované populaci byly přítomny všechny tři zmíněné alely způsobující hnědé zbarvení srsti. Získané výsledky plně korespondovaly s fenotypem i rodokmeny hodnocených zvířat. Výsledkem populační studie bylo navíc zjištění, že u markerů *TYRP-345* a *TYRP-41* došlo ke snížení heterozygotnosti, což lze vysvětlit poklesem genetické variability vlivem efektu hrdla láhve.

Posledním studovaným genem byl dopaminový receptor D4 (*DRD4*), který je často řazen mezi kandidátní geny ovlivňující psychické vlastnosti lidí i psů. Identifikace jednotlivých alel exonu 3 tohoto genu byla provedena pomocí PCR a sekvenační elektroforézy. U bearded kolií bylo nalezeno celkem pět z osmi známých alel. Nejvyšších četností dosahovaly alely *435* a *447a*, což lze považovat za typické pro plemena psů pocházejících z evropského kontinentu. Na základě dotazníkového šetření byl charakterizován stupeň nepozornosti a aktivity-impulzivity u 65 bearded kolií. Statisticky významná závislost mezi frekvencí alel, resp. genotypů a výsledným skórem pro obě sledované psychické vlastnosti nebyla neparametrickým  $\chi^2$ -testem ani dvouvýběrovým t-testem potvrzena.

**Klíčová slova:** bearded kolie – *beta-defensin 103* – *TYRP1* – *DRD4* – chování psů

## SUMMARY

The Bearded Collie is a steady and versatile herding dog, capable of working a variety of livestock. It's a breed which has evolved naturally over the centuries. However, population size decreased dramatically after the Second World War, resulting in a loss of genetic diversity. This thesis aims to evaluate the molecular basis of genetic variability in Bearded Collies, using markers relating to coat colour and canine behaviour, with DNA samples collected from buccal swabs of 109 bearded collies

Firstly, a gene that encodes the beta-defensin 103 protein (CBD103) was studied. A mutation in this gene causes dominant eumelanistic coat colour. Two PCR markers allowing reliable detection of the three-nucleotide deletion in CBD103 were designed. Sequence analysis confirmed that the deleted triplet encodes a glycine residue. This mutation was detected in homozygous state in all the Bearded Collies tested except one. The results suggest that sable or wolf sable colour caused by the Agouti gene does not exist in the breed. The exception, (a brown dog with tan points) may theoretically carry a different mutation of the CBD103 gene.

Secondly the effect of different sequence variants of the TYRP1 gene and their interactions on Bearded Collie coat colour phenotypes was studied. PCR-RFLP markers TYRP1-331 a TYRP-345 were used to detect mutations in exon 5 of this gene. It was necessary to design a new PCR-SSCP marker TYRP-41 for identification of the mutation in exon 2. All three sequence variants that can cause brown coat colour were present in the study population. The results were in full agreement with observed phenotypes and pedigree data. Loss of heterozygosity was found at markers TYRP-345 a TYRP-41. This may be caused by the bottleneck effect, leading to reduced genetic variability.

Finally, the dopamine receptor D4 gene (DRD4) was analysed. It is one of the candidate genes for human as well as canine personality traits. PCR and polyacrylamide gel electrophoresis technique were used to identify alleles of exon 3 of the DRD4 gene. Five out of eight known alleles were detected in Bearded Collies. The most frequent alleles were 435 and 447a, a typical finding in breeds of European origin. A questionnaire was used to characterize the extent of inattention and activity-impulsivity in 65 Bearded Collies. Association between the questionnaire scores and exon 3 DRD4 polymorphism was assessed by chi-square tests and independent samples t-tests but no significant association was found.

**Keywords:** Bearded Collie – *beta-defensin 103* – *TYRP1* – *DRD4* – canine behaviour

# OBSAH

1. Úvod.....	2
2. Cíl práce.....	3
3. Přehled literatury.....	4
3.1 Vývoj a původ domácího psa.....	4
3.2 Charakteristika plemene Bearded kolie.....	5
3.2.1 Historie a chov bearded kolí v zemi původu – ve Velké Británii.....	6
3.2.2 Chov bearded kolí v České republice.....	7
3.2.3 Zbarvení bearded kolí.....	8
3.3 Genetika zbarvení srsti u psů.....	11
3.3.1 Pigmentace.....	11
3.3.2 Hlavní lokusy ovlivňující zbarvení srsti u psů.....	13
3.4 Dopaminový receptor D4 ( <i>DRD4</i> ).....	19
3.5 Metody molekulární biologie.....	22
3.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	22
3.5.2 Restrikční štěpení PCR produktů.....	23
3.5.3 Elektroforetická separace fragmentů DNA.....	24
3.5.4 Polymorfismus konformace jednořetězcové DNA (SSCP).....	24
4. Materiál a metodika.....	26
4.1 Hodnocené genotypy.....	26
4.2 Izolace genomické DNA z buněk bukalních sliznic.....	26
4.3 Amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).....	26
4.3.1 Přehled použitých primerů.....	26
4.3.2 Gen <i>beta-defensin 103 (CBD103)</i> .....	28
4.3.3 Identifikace mutací genu <i>TYRP1</i> .....	31
4.3.4 Dopaminový receptor D4 ( <i>DRD4</i> ).....	34
4.4 Zpracování dotazníku pro odhad psychických vlastností psů.....	35
4.5 Bioinformatické zpracování dat a statistické hodnocení výsledků.....	35
4.5.1 Bioinformatické databáze a použité programy.....	35
4.5.2 Statistické vyhodnocení výsledků.....	36
4.5.3 Statistické hodnocení distribuce alel lokusu <i>TYRP1</i> .....	36
4.5.4 Statistické hodnocení vztahu mezi distribucí alel exonu 3 genu <i>DRD4</i> a hodnotami získanými pomocí ADHD dotazníku.....	36
5. Výsledky.....	38
5.1 Izolace DNA.....	38

5.2	Gen <i>CBD103</i> .....	38
5.2.1	Detekce alel lokusu <i>CBD103</i> .....	38
5.2.2	Sekvenační analýza PCR markeru genu <i>CBD103</i> při použití primerů Dbez23G-F a Dbez23G-R .....	40
5.3	Gen <i>TYRP1</i> .....	42
5.3.1	Detekce alel <i>TYRP1</i> -331 a <i>TYRP1</i> -345 na principu PCR-RFLP .....	42
5.3.2	Detekce alely TYRP-41 na principu PCR-SSCP .....	44
5.3.3	Interakce mezi hodnocenými lokusy <i>TYRP1</i> a jejich vliv na výsledné zbarvení srsti .....	45
5.3.4	Populační analýza frekvencí alel a genotypů studovaných lokusů <i>TYRP1</i> genu .....	50
5.4	Hodnocení lokusu <i>DRD4</i> .....	51
5.4.1	Detekce alel exonu 3 genu <i>DRD4</i> .....	51
5.4.2	Hodnocení ADHD dotazníku .....	56
5.4.3	Vztah mezi stupněm nepozornosti a polymorfismem markeru exonu 3 genu <i>DRD4</i> .....	56
5.4.4	Vztah mezi stupněm aktivity-impulzivity a polymorfismem markeru exonu 3 genu <i>DRD4</i> .....	61
6.4	Polymorfismus genu pro dopaminový receptor D4 ( <i>DRD4</i> ) a jeho vztah k chování psů .....	72
7.	Závěr .....	76
8.	Seznam literatury .....	78
9.	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	84

## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha č. 1 – Plemenný standard

Příloha č. 2 – Odběr vzorku DNA ze sliznice dutiny ústní

Příloha č. 3 – Agarózová gelová elektroforéza

Příloha č. 4 – Sekvenační elektroforéza

Příloha č. 5 – Metoda PCR-SSCP

Příloha č. 6 – ADHD dotazník validovaný pro majitele psů



# 1. ÚVOD

Pes domácí, *Canis familiaris*, je prvním živočišným druhem, který byl domestikován a provází člověka již po několik desetitisíciletí. V chovu psů je již od počátku prováděna selekce orientovaná jak na vzhled, tak i na povahové vlastnosti. Proto pozorujeme mezi současnými psími plemeny výrazné rozdíly v jejich morfologii i chování.

Publikování mapy genomu psa v roce 2005 a umožnilo rozvoj studia genetické podstaty různých znaků a onemocnění na molekulární úrovni. Protože psy postihují často podobné choroby jako člověk, mají výsledky těchto výzkumů přínos i v oblastech humánní medicíny.

V této diplomové práci jsem se zabývala hodnocením genetické variability plemene bearded kolie pomocí vybraných molekulárních markerů majících vztah ke zbarvení srsti a chování psů. Barva ani psychické vlastnosti nebyly u bearded kolií doposud na molekulární úrovni zkoumány.

Protože barvu psa snadno zjistíme pouhým pohledem nebo ji vyčteme z jeho rodokmenu, poskytují poznatky o dědičnosti zbarvení srsti jednoduchý model pro studium funkce genů a jejich interakce. V poslední době se podařilo identifikovat několik genů zodpovědných za pigmentaci u psů. Patří mezi ně například gen kódující *beta-defensin 103 (CBD103)*. Snahou této diplomové práce bylo potvrdit hypotézu, že zbarvení je u bearded kolií ovlivněno dominantní mutací tohoto genu. Dalším genem je *tyrosinase-related protein 1 (TYRP1)*, který je asociován s hnědým zbarvením srsti psů. Hnědé zbarvení je typické i pro bearded kolie, proto je třeba ověřit vliv jednotlivých bodových mutací lokusu *TYRP1* a jejich interakcí na výsledné zbarvení srsti u tohoto plemene.

Posledním studovaným genem byl dopaminový receptor D4 (*DRD4*), jehož polymorfismus může souviset s psychickými vlastnostmi lidí i psů. Efekt na úrovni aktivity-impulzivity se podařilo prokázat například u německých ovčáků. Dalším předmětem zájmu této diplomové práce proto bylo ověřit hypotézu o existenci vztahu mezi polymorfismem markeru exonu 3 genu *DRD4* a stupněm aktivity-impulzivity a nepozornosti bearded kolií.

## 2. CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce vycházejí z ověření některých hypotéz, které byly v poslední době vysloveny v souvislosti s molekulární determinací zbarvení srsti a chování psů. První z hypotéz vychází z experimentů předpokládajících existenci bodové mutace v lokusu pro *beta-defensin 103 (CBD103)*. Tato mutace je považována za kauzální pro vznik dominantní černé, resp. hnědé barvy srsti. Cílem diplomové práce bylo ověřit platnost této hypotézy u plemene bearded kolie. Další hypotéza, která byla u bearded kolií prověřena, je založena na výsledcích výzkumu zaměřeného na tři různé mutace v lokusu *TYRP1* zodpovědné za hnědou barvu srsti. Ověřována byla i hypotéza o vlivu různých alel exonu 3 genu pro dopaminový receptor D4 na stupeň nepozornosti a aktivitu-impulzivitu bearded kolií.

Konkrétní cíle diplomové práce je možné shrnout do následujících bodů:

- izolovat DNA z buklálních buněk v kvalitě a kvantitě vhodné pro následující analýzy
- navrhnout dva diagnostické PCR markery, které umožní identifikovat alelickou kombinaci v lokusu *CBD103*
- sekvenační analýzou potvrdit přítomnost trinukleotidové delece v genu *CBD103* vedoucí ke vzniku dominantního eumelanistického zbarvení
- optimalizovat dva PCR-RFLP markery umožňující identifikovat mutace v exonu 5 genu *TYRP1*
- navrhnout PCR-SSCP marker pro identifikaci bodové mutace v exonu 2 genu *TYRP1*
- pomocí nově navržených a optimalizovaných DNA markerů vyhodnotit 109 zástupců plemene bearded kolie a porovnat interakce mezi studovanými geny a výsledným zbarvením srsti
- zpracovat populačně genetickou studii charakterizující variabilitu populace bearded kolií z hlediska frekvencí alel a genotypů genu *CBD103* a *TYRP1*
- optimalizovat detekci jednotlivých alel genu *DRD4* a provést hodnocení 109 představitelů plemene bearded kolie
- zpracovat a vyhodnotit dotazník umožňující charakterizovat stupeň nepozornosti a aktivity-impulzivity bearded kolií
- zpracovat statistickou analýzu pomocí dvouvýběrového t-testu a neparametrického  $\chi^2$ -testu s cílem posoudit vztah mezi přítomností jednotlivých alel genu *DRD4* a stupněm nepozornosti a aktivity-impulzivity bearded kolií.

## 3. PŘEHLED LITERATURY

### 3.1 Vývoj a původ domácího psa

Pes domácí, *Canis familiaris*, je jediným plně domestikovaným zástupcem čeledi *Canidae*. Archeologické nálezy dokazují, že pes byl prvním živočišným druhem, který byl domestikován, a tento proces započal koncem poslední doby ledové, kdy lidská existence stále závisela na lovu, sběru a shánění potravy (Clutton-Brock, 1995). V současnosti je nejstarším nálezem domestikovaného psa čelist z pozdně paleolitického hrobu v Oberkasselu v Německu, stará 14 000 let (Nobis, 1979). Molekulárně genetické analýzy naznačují, že snahy o domestikaci psů mohly probíhat mnohem dříve, než ukazují archeologické nálezy, pes byl domestikován z vlka (*Canis lupus*) před více než 100 000 lety (Wayne, 1993; Vila *et al.*, 1997).

Domestikace probíhala v několika nezávislých centrech. Tyto vícečetné domestikační události přispěly spolu s intenzivní selekcí k nesmírné fenotypové a genetické variabilitě, která nemá u jiných živočišných druhů obdobu (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Hnací silou selekce, praktikované chovateli po celá staletí, byla především touha po získání psa s určitými fyzickými vlastnostmi, povahovými rysy, či jedinečnými dovednostmi (Young a Bannasch, 2006). Archeologické nálezy kostí a zubů odhalují značnou variabilitu ve velikosti a tělesných proporcích mezi jednotlivými populacemi pravěkých psů. Nicméně se zdá, že odlišná plemena nevznikala dříve než před 3000-4000 lety (Clutton-Brock, 1995). Dnes existuje více než 400 plemen psů, mnohá z nich vznikla s cílem vytvořit takové plemeno, které odpovídá určitému fenotypovému standardu. Mezi jednotlivými plemeny jsou výrazné morfologické rozdíly, mezi které patří například variabilní výška, váha, stavba kostry a typ srsti (Young a Bannasch, 2006).

Psi vykazují rozmanité povahové vlastnosti, některé jsou charakteristické pouze pro specifická plemena. Příkladem je instinkt pro pasení stáda (Young a Bannasch, 2006). Podle chování a způsobu práce s ovci lze odlišit dva typy psů, každý typ reprezentuje více plemen. Oba typy byly selektovány pro práci v podobných podmínkách (pastviny) a reagují na podobné podněty (hospodářská zvířata), ale přitom vykonávají velice odlišné úlohy. Povinností pasteveckého psa je nerušit ovce, ale žít mezi nimi a hlídat je před predátory. Povinností ovčáckého psa je přerušit chování hospodářských zvířat a vést je na povel na jiné místo (Coppinger a Schneider, 1995).

Pastevečtí psi jsou pravděpodobně nejstaršími pracovními psy. Samozřejmě nemohli být používáni dříve, než byla před asi 8 000 lety domestikována první hospodářská zvířata -

ovce a kozy (Coppinger a Coppinger, 2001)

### 3.2 Charakteristika plemene Bearded kolie

Bearded kolie se od běžné kolie zcela liší, ačkoliv je jejich pracovní účel podobný. Hustá hrubá chundelatá srst, tlustá kůže, silné končetiny a silný krátký krk je charakteristický pro všechna zvířata, která obývají horské oblasti s chladným vlhkým klimatem, například pro Highland pony a skotský náhorní skot. Bearded kolie je dokonale přizpůsobena ke šplhání do kopců díky síle končetin a hloubce hrudníku (Thompson Gray, 1891). Je velmi všestranným ovčáckým psem, který zvládá práci s různými druhy hospodářských zvířat v rozmanitých situacích. Ve Skotsku se používala například jako takzvaný „huntaway“, jehož úkolem bylo vyhnat štěkotem ovce schovávající se ve křovích a kopcích a shromáždit je do velkého stáda. Mezi další náplň činnosti patřilo hnát ovce z pastvy na pastvu či dobytek na trh. Ovčáci také vysílali své psy do hor a vřesovišť, aby jim přivedli stádo zpět do údolí. Díky takto různorodým požadavkům mají některé bearded kolie spíše přirozené sklony stádo přihánět k psovodovi (tzv. gathering a fetching), jiné naopak vynikají v hnání ovcí směrem od psovoda (driving). Obdobně část jedinců používá při manipulaci se stádem „oko“ (eye), naopak většina bearded kolíí preferuje hlasitý štěkot (Rieseberg a McKinney, 1997).

Obrázek 1: Bearded kolie při práci se stádem ovcí



FCI standard plemene je přílohou 1 této diplomové práce.

### 3.2.1 Historie a chov bearded kolií v zemi původu – ve Velké Británii

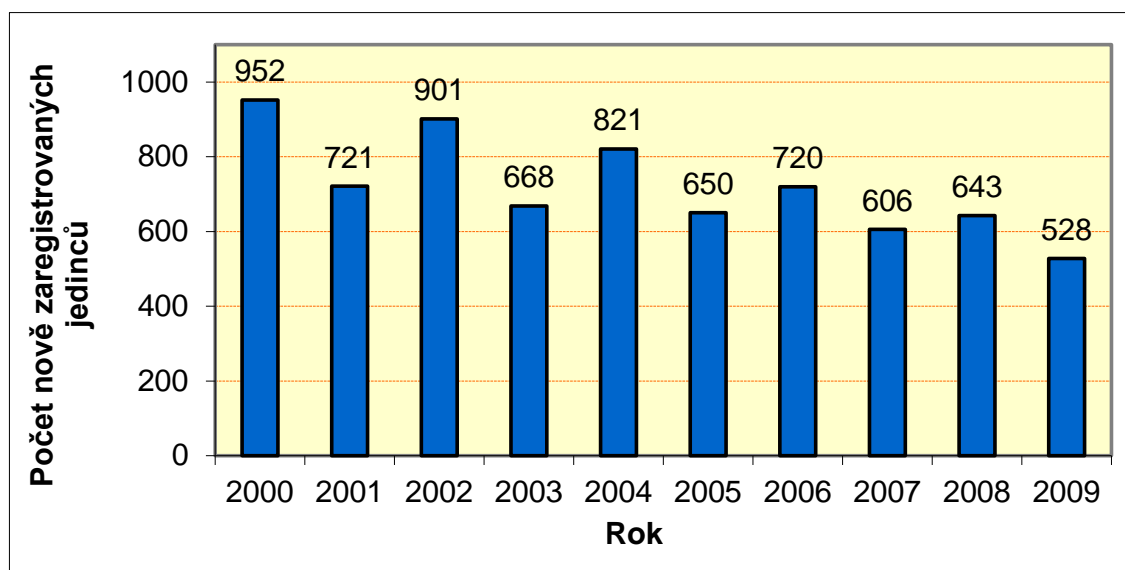
Bearded kolie se jako plemeno vyvíjela přirozeně po mnoho století, nepatří mezi plemena vytvořená v poměrně blízké minulosti, jako třeba zlatí retrívři nebo dobrmani. Podobné ovčácké psy s dlouhou srstí v obličejí nalezneme po celé zeměkouli, od Tibetu po Hebridy, většinou v horských oblastech nebo v zemích s drsnými zimami (Moorhouse, 1993). Všeobecně se předpokládá, že významným střediskem domestikace ovcí byla Střední Asie, je tedy logické se domnívat, že psi doprovázeli starověké pastevecké kmeny během migrace na západ. Psi, kteří cestovali s Ibery a Kelty, se tak dostali až do Británie, kde našli nový domov na severu ve Skotské vysočině (Collis a Jones, 1992).

Až do konce 19. století nebyl proveden pokus ustálit typ, jediným kritériem výběru byla pracovní schopnost. Zájem o předvádění bearded kolií na výstavách obrovsky vzrostl po vypsání tříd pro toto plemeno na výstavě Scottish Kennel Clubu v Edinburghu v roce 1897. Okolo roku 1912 byl Dr. Greigem založen Bearded Collie Club, bohužel registrace klubu nebyla dokončena kvůli 1. světové válce. Po válce byl počet vystavovaných jedinců velice nízký. O rozvoj plemene se tehdy zasloužila paní Cameron Millerová. Mezi lety 1929 a 1934 zaregistrovala 55 bearded kolií a odchovala 10 vrhů. Po její smrti zmizeli tito psi neznámo kam. V roce 1944 bylo paní G. O. Willisonové omylem zasláno hnědé štěně bearded kolie namísto pracovního štěněte šeltie. Že jde o bearded kolii a ne o křížence pracovních ovčáckých psů, zjistila chovatelka, až když byly fence dva měsíce. V roce 1948 byla fena zaregistrována britským Kennel Clubem pod jménem Jeannie of Bothkennar. Šlo o první registraci od roku 1939 (Moorhouse, 1993). I přesto, že patří mezi starodávná plemena, jsou všechny současné bearded kolie s průkazem původu potomky feny Jeannie of Bothkennar a psa Bailie of Bothkennar (Isabell, 2002). Hancock (2006) uvádí, že dnešní registrovaní jedinci pochází ze spojení pouze dvanácti různých psů, genetická základna je tedy velmi malá.

The Bearded Collie Club byl založen v roce 1955 a od roku 1959 bylo umožněno získávání čekatelství šampionátu (Rieseberg a McKinney, 1997).

Rozvoj plemene v 60. letech byl sice pomalý, ale stabilní. V roce 1966 byl založen první zahraniční klub (v Holandsku) a u plemene se začalo provádět RTG vyšetření dysplazie kyčelního kloubu. Od 70. let zájem kynologické veřejnosti o plemeno postupně stoupal. V roce 1988 se bearded kolie umístila na 21. místě v žebříčku popularity jednotlivých plemen psů. V roce 1989 poprvé v historii získala bearded kolie titul Best in Show na Cruftově výstavě, šlo o fenu Potterdale Classic of Moonhill (Moorhouse, 1993). Vývoj počtu nově zaregistrovaných jedinců britským Kennel Clubem je znázorněn v grafu 1.

Graf 1: Počet nově zaregistrovaných bearded kolií britským Kennel Clubem v letech 2000-2006 (narozená štěňata + importovaní jedinci)



Zdroj: <http://www.thekennelclub.org.uk>

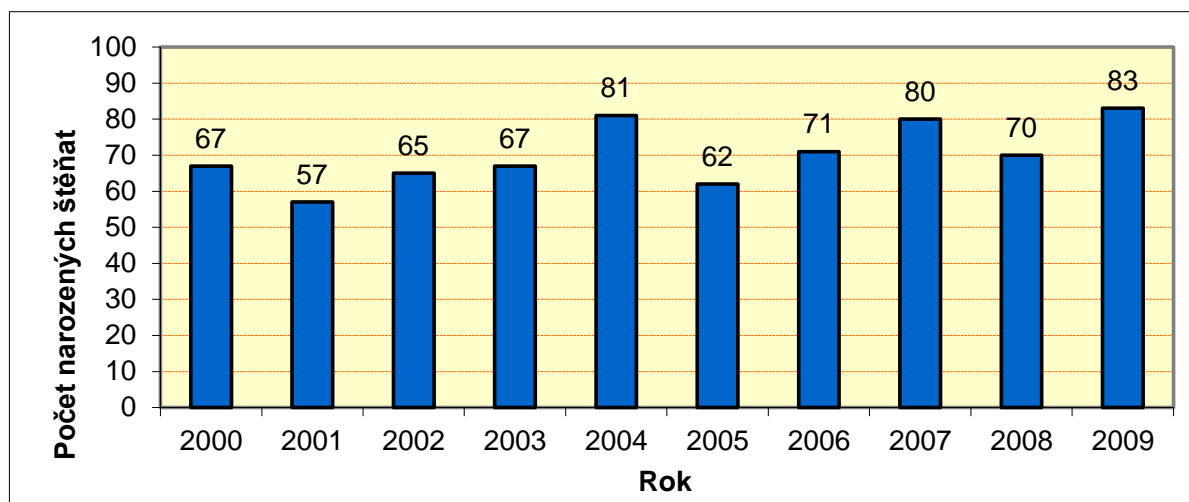
### 3.2.2 Chov bearded kolií v České republice

Chov bearded kolií v českých zemích začal rokem 1981, kdy manželé Karenovi (chovatelská stanice "Modrá") dovezli z Dánska první fenu Prunellas Blue Crowned Queen. Právě tato fena byla nakryta anglickým psem v chovatelské stanici Zotti-Floppy v Německu a v roce 1983 porodila první vrh bearded kolií na území tehdejšího Československa. V roce 1985 k nám byl dovezen první plemník Vigsbjergs Monarch. Následovaly další importy, především z Dánska, ale i z Německa a Rakouska. Důležitým krokem pro rozvoj českého chovu je také import dvou jedinců ze země původu (Velká Británie) z chovatelské stanice Davida Hyda "Natterjack" (Vazdová, 2003).

V roce 1990 na světové výstavě psů v Brně bylo přihlášeno celkem 120 beardií z 12 zemí Evropy. Zde měli majitelé a chovatelé z Čech poprvé možnost vidět zvířata ze špičkových chovů, správnou údržbu a úpravu srsti a výstavní předvedení. Rok 1990 byl zlomový i v tom, že byl založen samostatný Klub chovatelů bearded kolií. Dalším významným mezníkem byl rok 1993, kdy přijal pozvání posuzovat naši klubovou výstavu rozhodčí ze země původu plemene - pan David Hyde z chovatelské stanice "Natterjack" (Kleinová, 2001). Tento rok se také stává rekordním v počtu odchovaných vrhů - celkem 48. Popularita plemene dosáhla vrcholu, což má i negativní dopady a bohužel se některé chovatelské stanice soustřeďují na produkci štěňat pro výkupny (Vazdová, 2003).

Stejně jako u jiných plemen i u bearded kolíí nastal po mohutném vzestupu a nasycení poptávky útlum. O tom svědčí pouhých osm vrhů v roce 1998 (Kleinová, 2001). Počet narozených štěňat v posledních letech znázorňuje graf 2.

Graf 2: Počet narozených štěňat bearded kolíí v ČR v letech 2000 - 2006



Zdroj: Volková, 2002-2010

### 3.2.3 Zbarvení bearded kolíí

V původním standardu z konce osmnáctého století se uvádí, že všechny bearded kolie, nezávisle na zbarvení srsti, by měly mít tmavé oko a černý nos. Jeannie, zakladatelka chovu paní Willisonové, měla ale hnědou srst a hnědou nosní houbu a z tohoto důvodu se černě zbarvená nosní houbu u hnědých jedinců nevyskytuje (Moorhouse, 1993).

Moorhouseová (1993) uvádí, že se u plemene vyskytuje pět základních barev - černá, břidlicová, modrá, hnědá a plavá, všechny tyto barvy se nejčastěji objevují v kombinaci s bílými znaky. Černí a břidlicoví jedinci se rodí s černou barvou srsti, břidlicoví ale časem zesvětlají do různých odstínů od tmavě šedé až po stříbrnou. Černí psi, kteří během života nesvětlají, jsou poměrně vzácní. Willisonová (1971) se zmiňuje pouze o čtyřech zbarveních, tak jak jsou zřejmá hned po narození. Toto zjednodušené rozdělení přejímají i další autoři (Collis a Jones, 1992; Rieseberg a McKinney, 1997).

Z genetického pohledu jsou základní barvy pouze dvě - černá a hnědá. Černé zbarvení je dominantní nad hnědým (Willisonová, 1971; Collis a Jones, 1992; Moorhouse, 1993; Rieseberg a McKinney, 1997). Ostatní odstíny vznikají jejich modifikací. Modré zbarvení vznikne zředěním černého a plavé zředěním hnědého (Collis a Jones, 1992; Moorhouse, 1993; Rieseberg a McKinney, 1997). Nezředěné barvy jsou dominantní nad ředěnými (Rieseberg a McKinney, 1997).

Obrázek 2: Základní barvy srsti u štěňat plemene bearded kolie



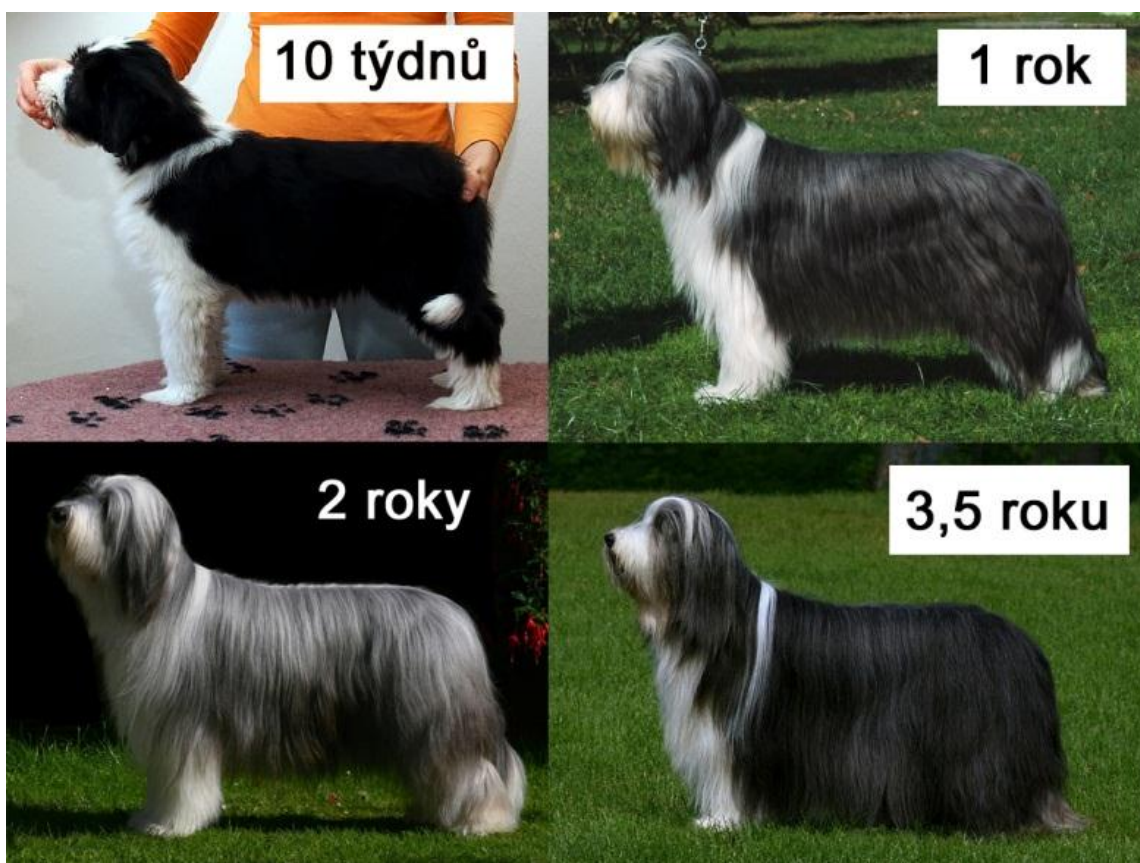
Obrázek 3: Základní barvy srsti u dospělých jedinců plemene bearded kolie





Barva srsti je navíc ovlivňována faktorem postupného zesvětlení. Zesvětlení se objevuje již ve věku šesti týdnů, nejprve kolem očí, na hleznech a předních končetinách a postupně se šíří po celém těle. Roční pes tak může být až světle stříbrný či krémový. V tomto období je těžké rozeznat černé jedince od modrých a hnědé od plavých, jediným vodítkem je nám barva nosní houby, která zůstává neměnná. Před dovršením dvou let věku psa začíná jeho srst opět tmavnout a po třetím roce života je zbarvení již převážně stabilní (Collis a Jones, 1992; Moorhouse, 1993; Rieseberg a McKinney, 1997). Přesto může docházet k méně výrazným změnám po každém línání (Moorhouse, 1993; Rieseberg a McKinney, 1997).

Obrázek 4: Změna barvi srsti u bearded kolií během dospívání



U některých štěňat, bez ohledu na základní zbarvení, se objevuje pálení na obočí, vnitřní straně uší, na lících, pod kořenem ocasu a na končetinách. Avšak tyto znaky s věkem mizí a u dospělého psa jsou téměř neznatelné, jelikož také podléhají zesvětlení (Collis a Jones, 1992; Moorhouse, 1993; Rieseberg a McKinney, 1997).

Bílé znaky se na těle vyskytují v různém rozsahu (Willisonová, 1971). Podle Moorhouseové (1993) je přijatelné, pokud má pes bílé končetiny až k hlezňům a bílá srst pokračuje přes koleno až k tělu. U jedince, který má na zadních končetinách bílé pouze tlapky, se bílá nemusí ve vyšších partiích vůbec vyskytovat, případně pokračuje směrem k tělu pouze na vnitřní straně, aniž by byla z bočního pohledu patrná. Collisová a Jonesová (1992) upozorňují na znění standardu, který říká, že bílé znaky by se neměly vyskytovat na vnější straně pánevní končetiny nad úrovní hlezna. Nasazení bílé srsti také nesmí přesahovat přes kohoutek (Collis a Jones, 1992; Moorhouse, 1993). Na hlavě může být bílá celá čenichová partie a široká lysinka spojující se na temeni s bílým límcem (Moorhouse, 1993; Rieseberg a McKinney, 1997). Na uších a okolo očí by se bílá srst vyskytovat neměla. Rozsah a rozložení bílých znaků na hlavě se dědí nezávisle na bílých znacích objevujících se na zbytku těla (Rieseberg a McKinney, 1997). Nepatrné nestandardní bílé znaky by neměly být považovány za hrubou vadu (Collis a Jones, 1992). V České Republice je rozmístění bílých znaků velmi sledováno a chovatelé uplatňují přísnou selekci na nestandardní zbarvení (Vazdová, 2003).

### **3.3 Genetika zbarvení srsti u psů**

Půvab neobvyklého zbarvení srsti domácích zvířat vyvolal zájem o selekci na tyto znaky, genetikům se tak naskytl model pro studium funkce genů a jejich interakce, kterým se začali zabývat již před stoletím a pokračují až dodnes. Většina prací se zabývala především zbarvením laboratorních myší, díky studiu více než sto mutací způsobujících různá zbarvení srsti se podařilo proniknout do biologie kmenových buněk, biogeneze buněčných organel a hormon-receptorových interakcí (Candille, 2007).

#### **3.3.1 Pigmentace**

Zbarvení savců je určeno přítomností melaninů v kůži a srsti (Ruvinsky a Sampson, 2001, Dostál, 2007). Melaniny jsou syntetizovány a ukládány v membránových organelách nazývaných melanosomy, které se nacházejí v melanocytech (Hearing, 2005). Během embryonálního vývoje migrují melanocyty z neurální lišty do oblasti kůže a dalších tkání (Mills a Patterson, 2009). Melanocyty, z nichž vzniká retinální pigmentový epitel, mají původ v neuroektodermu. Jakmile je migrace dokončena, zaujmou melanocyty svá místa v bazální vrstvě epidermis a v chlupových folikulech, kde vstupují do úzkého vztahu s mnoha keratinocyty. Vysílají k nim své štíhlé dendritické výběžky zajišťující těmto buňkám přísun pigmentu. Každý melanocyt dopravuje melanosomy k 36 keratinocytům (Freinkel a Woodley,

2001). Ukazuje se, že by v regulaci růstu a diferenciaci melanocytů mohly hrát roli i fibroblasty (Yamaguchi *et al.*, 2004).

Pigmentace kůže a srsti tedy závisí na přítomnosti melanocytů, ale i na stupni jejich melanogenní aktivity či aktivitě exocytózy. Mezi dva nejčastější mechanismy, kterými je redukována pigmentace, patří absence melanocytů nebo jejich inaktivita (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Melaniny jsou velké polymery tvořené různým množstvím tyrosinu a cysteinu (Ruvinsky a Sampson, 2001). Vyskytují se ve dvou základních typech. Prvním typem je eumelanin, který má černé nebo hnědé zbarvení a obsahuje především tyrosin. Druhým je červenožlutý feomelanin skládající se kromě z tyrosinu také z proměnlivého množství cysteinu (Hearing a Tsukamoto, 1991; Ruvinsky a Sampson, 2001; Candille *et al.*, 2007). Melanocyty mají schopnost tvořit jak eumelanin, tak feomelanin, ale ne oba současně. Produkce eumelaninu závisí na přítomnosti melanocyty stimulujícího hormonu ( $\alpha$ MSH) pocházejícího z hypofýzy. Melanocyty mají na svém povrchu receptory (*MC1R*), které tento hormon váží (Ruvinsky a Sampson, 2001). *MC1R* patří mezi receptory spřažené s G proteiny (Hearing, 2005). Po navázání  $\alpha$ MSH na receptor dojde k aktivaci adenylátcyklázy a zvýšení koncentrace cAMP aktivuje proteinkinázu A (PKA), což stimuluje melanocyt k produkci eumelaninu. Pokud tento signál není přítomen, ať už z důvodu absence MSH či povrchových receptorů, melanocyty syntetizují feomelanin (Ruvinsky a Sampson, 2001). *MC1R* může být aktivován svým ligandem  $\alpha$ MSH a inhibován antagonistou *ASIP* – agouti signal proteinem (Hearing, 2005).

Melaniny se tvoří katalýzou z tyrosinu a cysteinu (Ruvinsky a Sampson, 2001). Enzym, jehož substrátem je tyrosin, se nazývá tyrosináza a obsahuje měď. Katalyzuje tři různé reakce v biosyntetické dráze melaninu (Hearing a Tsukamoto, 1991):

1. hydroxylace tyrosinu na 3,4-dihydroxyfenilalanin (DOPA)
2. oxidace DOPA na dopachinon (DQ)
3. oxidace 5,6-dihydroxyindolu (DHI) na indolchinon.

První reakce je rozhodující, následné reakce mohou probíhat spontánně při fyziologickém pH (Hearing a Tsukamoto, 1991; Hearing, 2005).

Eumelanin je heterogenní polymer, vznikající z metabolitů dopachromu, feomelanin vzniká z metabolitů cysteinyl DOPA (Hearing a Tsukamoto, 1991).

Melanocyty reagují na širokou škálu vnitřních a vnějších faktorů, produkovaných prostředím nebo sousedícími buňkami v kůži, například na UV záření, melanocyty stimulující

hormon ( $\alpha$ MSH), agouti signal protein (*ASIP*), endothelin 1 (*ERI*), dickkopf 1 (*DKK1*) a na mnoho různých růstových faktorů a cytokinů.

Pro melanogenezi jsou také nutné další dva proteiny – *tyrosinase-related protein 1* (*TYRP1*) a *tyrosinase-related protein 2* (*TYRP2*) (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Řízení funkce melanocyty je složité a mnoho lokusů je zodpovědných za různé mechanismy kontroly melanogeneze. Některé lokusy zasahují do buněčné diference nebo migrace z neurální lišty. Jiné ovlivňují morfologii melanocyty nebo jeho schopnost ukládat melanosomy do rostoucího chlupu či pokožky. Další přímo působí na enzymy a související proteiny zodpovědné za melanogenezi. Na některých lokusech nacházíme alely, které ovlivňují interakci  $\alpha$ MSH s receptory melanocyty. Na výsledný fenotyp má vliv vzájemná interakce všech těchto lokusů (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Každý chlup má ve svém středu medulu (dřeň), ve které se nachází jedna nebo více řad buněk střídajících se s mezerami vyplněnými vzduchem. Na vnějším povrchu se nachází kůra (kortex) s tenkou kutikulou (Willis, 1989). Podrobným studiem pigmentace chlupů bylo zjištěno, že výsledné zbarvení srsti vzniká kombinací sedmi různých způsobů modifikace pigmentových granulí (Willis, 1989; Dostál, 2007):

1. barva granulí
2. tvar granulí (podlouhlé, oválné, kulaté, nepravidelné)
3. počet granulí v buňkách meduly
4. počet granulí v kortexu
5. rozvrstvení granulí do řídkých nebo hustých shluků
6. velikost granulí
7. uložení granulí ve vnitřní či venkovní části meduly.

Některá plemena jsou známá tím, že se štěňata narodí zbarvená tak, jak zůstávají po celý život. U jiných plemen se naopak během života zbarvení mění. Například kerry blue teriéři stářím světlají a naopak bělouši českého fouska se rodí světlí a postupně tmavnou (Dostál, 2007).

### **3.3.2 Hlavní lokusy ovlivňující zbarvení srsti u psů**

Během posledních pár let se podařilo dosáhnout obrovského pokroku v identifikaci genů zodpovědných za pigmentaci u psů. Přispěla k tomu především komparativní genomika. Celkem bylo zatím identifikováno sedm genů, které určují specifické zbarvení srsti psů nebo odznaky (Schmutz a Berryere, 2007): *melanocortin 1 receptor* (*MC1R*), *tyrosinase-related*

*protein 1 (TYRP1)*, *agouti signal peptid (ASIP)*, *melanophilin (MLPH)*, *SILV*, *microphthalmia-associated transcription factor (MITF)* a *beta-defensin 103 (CBD103)*.

V následujícím přehledu budou vybrané geny a jejich funkce popsány podrobněji.

### 3.3.2.1 Gen *melanocortin 1 receptor (MC1R)*

Každý melanocyt může přepínat mezi syntézou eumelaninu a feomelaninu díky interakci parakrinní signální molekuly - agouti proteinu - s transmembránovým receptorovým proteinem *MC1R*, který proniká membránou buňky sedmkrát a je exprimován melanocyty v chlupových folikulech. *MC1R* je spřažen s adenylátcyklázou a jeho aktivace vede k hromadění cAMP, což podněcuje syntézu eumelaninu namísto feomelaninu. *Agouti* protein inhibuje aktivitu *MC1R* a tím přiměje melanocyty vytvářet feomelanin místo eumelaninu (Kerns *et al.*, 2003).

*MC1R* byl prvním genem studovaným pomocí molekulárně genetických metod u psů, byl zmapován na pátý chromozóm – CFA5 (Schmutz a Berryere, 2007). Little (1957) pojmenoval tento lokus *E* neboli *extension* a uvádí, že u psů se alely tohoto genu liší od těch, které nacházíme u jiných druhů.

Dominantní alely *E* zvyšují aktivitu adenylátcyklázy buď spontánně, nebo v odpovědi na  $\alpha$ MSH a jsou zodpovědné za produkci eumelaninu. Recessivní alely mají za následek ztrátu funkce receptoru, který není schopen reagovat na stimulaci  $\alpha$ MSH a je vytvářen pouze feomelanin (Newton *et al.*, 2000; Ruvinsky a Sampson, 2001). Mutace v genu kódujícím *MC1R* jsou epistatické k mutacím *agouti* lokusu (Schmutz a Berryere, 2007).

Newton *et al.* (2000) a Everts *et al.* (2000) popsali mutaci způsobující ztrátu funkce receptoru *MC1R*, 914C>T, která vede k záměně argininu za předčasný stop kodón (R306ter). Mutace odpovídá alele *e* a je přítomná u většiny psů mnoha plemen s červenou nebo žlutou srstí. Všichni psi s černou nebo hnědou srstí tento předčasný kodón nemají nebo jsou heterozygotní (Newton *et al.*, 2000). To odpovídá předpokladům, že černé zbarvení srsti je dominantní nad červeným u většiny plemen (Winge, 1950; Little, 1957).

Třetí alela  $E^M$  je způsobena substitucí jednoho nukleotidu (799A>G) vedoucí k záměně aminokyselin M264V. Melanistická maska zapříčiněná jednou kopií této alely je viditelná pouze u psů, kteří jsou plaví (žlutí) nebo žíhaní. Psi zbarvení celoplášťově černě, hnědě nebo modře nemají masku odlišitelnou od barvy jejich těla. Nicméně u psů, kteří s věkem světlají do šedé barvy, se maska může na čas ukázat. Psi s bílými znaky na tlamě neprodukují v této

oblasti těla melanin, a tak nemůže být maska viditelná, i když pes tuto alelu má (Schmutz *et al.*, 2003).

### 3.3.2.2 Gen *agouti signal peptide* (ASIP)

*Agouti* lokus je zodpovědný za tvorbu proteinu, který brání působení  $\alpha$ MSH na melanocyty (Jackson, 1994). V oblastech těla, kde je tento protein přítomen, nemohou melanocyty v chlupových folikulech reagovat na  $\alpha$ MSH, a proto tvoří feomelanin a ne eumelanin (Ruvinsky a Sampson, 2001). Tam, kde tento protein schází, mají melanocyty úplnou schopnost odpovídat na stimulaci  $\alpha$ MSH a tvoří eumelanin (Jackson, 1994). Pruhané chlupy se tvoří v místech s pulzující tvorbou *agouti* proteinu (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Gen *agouti signal peptide* (ASIP) kódující parakrinní signální molekulu (Berryere *et al.*, 2005) se nachází na 24. chromozómu (CFA24) mezi mikrosatelity *AHT 118* a *AHT 125* (Kerns *et al.*, 2004). U psů se vyskytují čtyři alely ASIP kontrolující zbarvení, které lze seřadit podle hierarchie dominance následovně (Schmutz a Berryere, 2007):  $a^y > a^w > a^t > a$ .

Alela divokého typu ( $a^w$ ) způsobuje výskyt střídajících se proužků eumelaninu a feomelaninu po celé délce chlupu. Typicky se proužkování vyskytuje na dorsální straně trupu (Schmutz a Berryere, 2007). Často se toto zbarvení označuje jako „divoké“. U psů se vyskytuje například u vlkošedého německého ovčáka, československého vlčáka, šedého norského elkhounda, šedého sibiřského husky nebo hrubosrstého jezevčíka (Dostál, 2007). Sekvence této alely ASIP je zcela homologní s vlčí sekvencí (Berryere *et al.*, 2005) a sekvence aminokyselin v proteinu je také stejná i u kojotů (Schmutz *et al.*, 2007).

Recesivní alela *R96C* ( $a$ ) (c.288C>T) má za následek černé zbarvení srsti, nazývá se také non-*agouti*. Alela  $a$  se vyskytuje především, ale ne výhradně, u ovčáckých plemen. Je jedinou příčinou černé barvy u německého ovčáka a šeltie (Kerns *et al.*, 2004; Berryere *et al.*, 2005), ale nalezneme ji také u černých psů plemene šiperka, groenendael a puli (Schmutz a Berryere, 2007).

Jednou z nejčastějších alel vyskytujících se u domácích psů je alela  $a^y$ , která je v alelické sérii dominantní nad všemi ostatními. Od alely divokého typu se liší dvěma aminokyselinami – A82S a R83H (c.246G>T a c.250G>A), u těchto substitucí byla zjištěna kompletní vazbová nerovnováha (Berryere *et al.*, 2005). Výsledkem je žluté zbarvení srsti nazývaní se u většiny plemen plavé (fawn) nebo sobolí (sable) (Schmutz a Berryere, 2007). Tato alela nemá nic společného s letální žlutou ( $A^y$ ) u myši (Berryere *et al.*, 2005). U některých plemen se setkáváme s příměsí chlupů s černě zbarvenými konečky, které se

vyskytují především na hlavě, hrudníku, na hřbetě a na ocase (Dostál, 2007). U psů s  $a^y$  alelou existuje v počtu černých chlupů značná variabilita (Schmutz a Berryere, 2007).

Předpokládá se, že čtvrtá alela ( $a^t$ ) způsobuje pálení (tan). V kódující sekvenci (exon 2-4) nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi psy s pálením a psy s vlkošedým (divokým) zbarvením (Berryere *et al.*, 2005). Tato předpokládaná alela se tedy pravděpodobně liší v jedné z oblastí promotoru. Situace je navíc komplikována tím, že u tohoto genu pravděpodobně existuje více než jeden promotor, čímž je zajišťována exprese v různých oblastech těla. Zdá se, že jeden z promotorů kontroluje zbarvení ventrální části těla (břicha) a druhý dorzálních oblastí – hřbetu psa (Schmutz a Berryere, 2007).

Ačkoliv někteří chovatelé popisují pátou alelu  $a^s$  pro zbarvení tvořící sedlo, není pro takovou alelu v současnosti žádný důkaz (Schmutz a Berryere, 2007).

### 3.3.2.3 Gen *beta-defensin 103* (*CBD103*)

Dominantní dědičnost černého zbarvení je u psů řízena jinak, než u jiných druhů zvířat. Little (1957) rozpoznal, že u psů musí existovat lokus odlišný od *extension* (*E*) a podle něj by dominantní černá mohla být způsobena neobvyklou *agouti* alelou *A*. Tento předpoklad se ukázal jako mylný. Pomocí klasické vazbové analýzy se podařilo objevit mutaci v jiném genu představujícím doposud nerozpoznaný prvek melanokortinové dráhy (Kerns *et al.*, 2007).

Příslušný gen *CBD103* překvapivě kóduje protein *beta-defensin 103*, jehož funkce byly doposud studovány především ve spojitosti s imunitou. *CBD103* patří do velké rodiny sekretovaných peptidů se strukturou podobnou *agouti* a jeho exprese v kůži psů je vysoká. Stejně jako *agouti* protein se i *CBD103* kompetitivně váže na receptor *MC1R* (Candille *et al.*, 2007). Gen *CBD103* se nachází na chromozómu CFA16 (Schmutz a Berryere, 2007).

K označení lokusu se používá písmeno *K* (poslední písmeno anglického slova pro černou barvu - „black“) (Kerns *et al.*, 2007). Lokus má tři alely s následujícím pořadím dominance (Candille *et al.*, 2007): černá – black ( $K^b$ ) > žíhaná – brindle ( $k^{br}$ ) > žlutá – yellow ( $k^y$ ).

U alely  $K^b$  došlo ke ztrátě tří párů bází v druhém exonu *CBD103* vedoucí k „in-frame“ deleci glycinu ( $\Delta G23$ ). Tato mutace může být příčinou černého zbarvení pomocí dvou odlišných mechanismů – zvýšené afinity k *MC1R* a zvýšené dostupnosti zralého proteinu *in vivo* (Candille *et al.*, 2007). Aby měl pes celoplášťové eumelanistické zbarvení (černé, hnědé nebo šedé), musí být u většiny plemen přítomna alespoň jedna alela *E* nebo  $E^m$  na lokusu *MC1R* a alespoň jedna dominantní alela  $K^b$  na lokusu *K* (Schmutz a Berryere, 2007).

Experimentálně bylo prokázáno, že mutantní alela *CBD103* způsobuje černé zbarvení i u transgenních myší (Candille *et al.*, 2007).

Jedna kopie alely  $k^{br}$  v přítomnosti alely  $k^y$  postačuje k projevu žíhání (Schmutz a Berryere, 2007). U jedinců s alelou  $a^y$  se žíhaná srst objevuje po celém těle, kdežto u psů s genotypem  $a^f/a^f$  je žíhání viditelné pouze na ventrálních partiích (Berryere *et al.*, 2005).

Barva psů s genotypem  $k^y/k^y$  závisí na jejich *ASIP* genotypu a může být plavá, vlkošedá či jedna z barev způsobená eumelaninem v kombinaci s pálením (Schmutz a Berryere, 2007).

#### 3.3.2.4 Gen tyrosinase- related protein 1 (*TYRPI*)

*Tyrosinase-related protein 1 (TYRPI)* je protein obsažený v melanocytech, který modifikuje zbarvení kůže a srsti u zvířat (Jackson, 1988). Tento protein je kódován genem nacházejícím se u psů na chromozómu 11 (CFA 11) mezi mikrosatelity *C03109* a *FH2004* (Schmutz *et al.*, 2002). *TYRPI* se skládá ze sedmi exonů (Box *et al.*, 1998) a bylo odhadnuto, že u psů kóduje protein o 538 aminokyselinách (Schmutz *et al.*, 2002). Little (1957) jej označoval jako lokus *B*. Recesivní alela *b* snižuje aktivitu *TYRPI*, což vede ke změně zbarvení černého eumelaninu na hnědý. Hnědé melanosomy jsou strukturně odlišné od černých. U hnědého fenotypu nemá kataláza, která je za normálních okolností zapojena do procesu melanogeneze, schopnost chránit eumelanin před působením peroxidu vodíku tvořeným během melanogeneze (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Schmutz *et al.* (2002) objevili tři různé nové alely *TYRPI* zodpovědné za hnědé zbarvení. Alela  $b^s$  obsahuje předčasný stop kodón v exonu 5 (Q331ter) (c. 991C>T), u alely  $b^d$  došlo k delecí jednoho prolinového zbytku rovněž v exonu 5 (345delP) (c. 1033-6 deleted) a u alely  $b^c$  k jednonukleotidové substituci v exonu 2 (c. 121T>A) způsobující záměnu serinu za cystein (S41C). Jakákoliv kombinace dvou těchto alel je příčinou hnědě zbarvené srsti.

Všechny tři alely byly detekovány u několika z 28 genotypovaných plemen, ale u některých plemen, kde jsou hnědí jedinci běžní, se přítomnost všech tří alel neprokázala. Je možné, že existují ještě další neodhalené vzácné mutace v *TYRPI*, které se doposud nepodařilo odhalit (Schmutz a Berryere, 2007).

Hnědá barva srsti je často popisována jako játrová či čokoládová. U některých plemen, například u dobrmanů nebo australských ovčáků, jsou však hnědí psi označováni jako červení (Ruvinsky a Sampson, 2001). Ve skutečnosti jsou ale doopravdy hnědí, jelikož u nich byly výše uvedené mutace v *TYRPI* prokázány (Schmutz *et al.*, 2002).



Ačkoliv se odstín hnědé barvy mezi jednotlivými psy i plemeny liší, nebyl žádný z možných šesti hnědých genotypů *TYRPI* asociován s konkrétním odstínem (Schmutz a Berryere, 2007). Všichni hnědí psi mají hnědý nos a hnědé polštářky tlap (Schmutz *et al.*, 2002). Barva oka je také o něco světlejší, než u hnědých psů (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Mezi alelami *TYRPI* a alelami *MC1R* existují interakce. Pes s genotypem *e/e* na lokusu *MC1R* má krémové, žluté nebo červené zbarvení srsti, ale nos, okraje očních víček a polštářky tlapek mají barvu v závislosti na genotypu *TYRPI* – černou, hnědou, nebo barvu vzniklou ředěním černé či hnědé (Schmutz *et al.*, 2002)

Všichni psi s černou, hnědou nebo šedou barvou srsti, kterou zdělili dominantně, mají nejméně jednu alelu *E* nebo *E<sup>M</sup>*. Dále také mají alespoň jednu alelu *K<sup>B</sup>* (Candille *et al.*, 2007).

### 3.4 Dopaminový receptor D4 (*DRD4*)

Dopamin je hlavní katecholaminový neurotransmitter v mozku savců regulující mnoho procesů, například motorickou aktivitu, kognitivní funkce, emoce, motivaci, příjem potravy a endokrinní regulaci (Missale *et al.*, 1998). Je syntetizován z tyrosinu působením tyrosinhydroxylázy a skladuje se ve vezikulech v presynaptické části neuronu. Po stimulaci je uvolňován do synaptické štěrby, kde působí na postsynaptické a presynaptické receptory (Drtílková *et al.*, 2007).

Různé fyziologické působení dopaminu je zprostředkováno nejméně pěti odlišnými typy receptorů spřažených s G proteiny. D1 a D5 tvoří skupinu dopaminových receptorů typu D1 (D1-like receptors) a aktivují adenylátcyklázu. D2, D3 a D4 představují skupinu receptorů typu D2 (D2-like receptors), které adenylátcyklázu inhibují a aktivují draslíkové kanály (Missale *et al.*, 1998, Drtílková *et al.*, 2007). Geny pro receptory D1 a D5 postrádají introny. Receptory D2 a D3 se v určitých tkáních díky alternativnímu sestřihu liší (Missale *et al.*, 1998).

Každý receptor má specifické farmakologické vlastnosti, lokalizaci v mozku a roli ve fungování normálního mozku (Drtílková *et al.*, 2007).

Dopaminové receptory jsou ve velké míře exprimovány v centrální nervové soustavě. V periferních tkáních je nacházíme v ledvinách, v cévách a hypofýze, kde ovlivňují především sodíkovou rovnováhu, cévní tonus a sekreci hormonů.

Gen pro dopaminový receptor D4 (*DRD4*) vykazuje polymorfismus v několika oblastech (Ito *et al.*, 2004). U lidí obsahuje třetí exon tohoto genu oblast se 2 až 11 repeticemi 48 bp dlouhé sekvence. Jde o polymorfismus typu VNTR (variabilní počet tandemových repetit) (Ding *et al.*; 2002).

*DRD4* patří mezi nejdůležitější prozkoumané kandidátní geny a byla nalezena souvislost mezi výskytem dlouhých alel (6 a více opakování) a rysem osobnosti nazývaným „Novelty Seeking“ (vyhledávání nového) (Ebstein *et al.*, 1996; Benjamin *et al.*, 1996). Dalším důkazem této souvislosti je také studie provedená na knock-out myši s nefunkčním *DRD4* genem (*DRD4*<sup>-/-</sup>). Takové zvíře reaguje na nové podněty podstatně méně než myš *DRD4*<sup>+/+</sup> (Dulawa *et al.*, 1999). Dále je gen *DRD4* asociován s častým problémem v oblasti dětské psychiatrie – hyperkinetickým syndromem s poruchou pozornosti (ADHD) (Faraone *et al.*, 2005). U dětí s ADHD můžeme pozorovat zejména problémy se soustředěním se na daný úkol, s nadměrnou aktivitou a impulzivitou (Drtílková *et al.*, 2007). Genetika hraje

v rozvoji těchto vlastností klíčovou roli, heritabilita ADHD bývá odhadována ve výši až 80% (Thapar *et al.*; 2000).

Obdobný repetitivní polymorfismus genu *DRD4* byl identifikován i u ostatních druhů savců, například u koní (Momozawa *et al.*; 2005), primátů (Livak *et al.*, 1995) a psů (Niimi *et al.*, 1999). U hlodavců polymorfismus prokázán nebyl (O'Malley *et al.*; 1992).

V prvotní studii porovnávali Niimi *et al.* (1999) sekvence exonu 3 genu *DRD4* u dvou plemen psů – zlatých retrívrů a u plemene shiba. Byly objeveny čtyři alely lišící se počtem a pořadím 39 a 12 bp jednotek: 435, 549, 447a a 447b. Frekvence jednotlivých alel se mezi oběma plemeny významně lišila. V navazující studii rozšířili Niimi *et al.* (2001) spektrum plemen o šeltie a bigly. Podařilo se jim detekovat tři nové alely – 396, 486 a 498. Nejvyšší heterozygotnost vykazovalo plemeno shiba (53,6 %), nejnižších hodnot dosahovaly šeltie (25,0%). Na rozdíl od evropských plemen nebyly u japonské shiby nalezeny krátké alely 396 a 435, zatímco dlouhá alela 549 se vyskytovala poměrně často.

Osmou alelu 567 objevili Ito *et al.* (2004) a zjistili, že exon 3 vykazoval polymorfismus u všech 23 zkoumaných plemen psů. U každého plemene byl zjištěn výskyt dvou až sedmi alel, u žádného z nich však nebylo přítomno všech osm. Autoři rozdělili plemena podle frekvence alel exonu 3 do dvou hlavních skupin. Do skupiny A zařadili plemena okcidentálního původu s vysokou frekvencí alel 435 a 447a. Do skupiny B náležela orientální plemena s častým výskytem alel 447b, 498 a 549. Na rozdíl od skupiny A dosahovala skupina B vyššího průměrného skóre pro agresivitu a nižšího skóre pro reaktivitu. Dále se podařilo nalézt nový polymorfismus v exonu 1 založený na inzerci/deleci 24 bp. Většina ze sledovaných plemen měla obě alely *S* i *L* s výjimkou Shikoku inu a Hokkaido inu, kde se vyskytovala pouze alela *L*.

Polymorfismus byl také nalezen v oblasti intronu 2 genu *DRD4*. Alely *P* a *Q* se liší inzercí/deleci 17 bp. Obě alely byly detekovány téměř u všech sledovaných 28 plemen psů a u obou poddruhů vlka – vlka mongolského (*Canis lupus chanco*) i vlka evropského (*Canis lupus lupus*). Výjimku tvořilo korejské plemeno jindo, u kterého se podařilo zaznamenat výskyt pouze alely *Q*. Alela *P* převládala převážně u plemen okcidentálního původu a obou poddruhů vlka, kdežto alela *Q* byla častěji pozorována u plemen orientálních. Alela *Q* vlka evropského se liší od alely *Q* psa jednonukleotidovou substitucí, zatímco alely *P* i *Q* vlka mongolského a psa jsou totožné (Nara *et al.*, 2005). To odpovídá předchozím teoriím založených na studiu mitochondriální DNA, podle nichž domestikovaný pes pochází z východní Asie (Savolainen *et al.*, 2002).

Hejjas *et al.* (2007b) se zaměřili na studium vztahu mezi polymorfismem exonu 3 genu *DRD4* a aktivitou-impulzivitou německých ovčáků. V genotypu sledovaných psů tohoto plemene byly zjištěny alely *435* a *447a*. Jedinci byli rozděleni na základě vlivu různorodých podmínek prostředí odchovu do dvou skupin na psy „policejní“ a psy „mazlíčky“. Pro posouzení aktivity-impulzivity a pozornosti v obou skupinách byl použit dotazník pro rodiče dětí s ADHD (ADHD Rating Scale) upravený a validovaný pro majitele psů (Vas *et al.*, 2007). Skóre pro aktivitu-impulzivitou u policejních německých ovčáků, kteří měli alespoň jednu alelu *447a*, dosahovalo významně vyšších hodnot než u jedinců bez této alely. Tento rozdíl nebyl u psů zařazených do skupiny „mazlíčků“ pozorován. To může být způsobeno jednotnými podmínkami odchovu policejních psů (stejný druh výcviku, ustájení a obdobná úroveň stresu). U psů vychovávaných v rodinách je pravděpodobně genetický efekt polymorfismu *DRD4* maskován různorodými vnějšími podmínkami prostředí, jako je například přístup majitele, kvalita výcviku a podobně. Pohlaví ani věk psů neovlivňovalo výsledné skóre získané vyhodnocením dotazníku (Hejjas *et al.*, 2007b).

Lee *et al.* (2008) uvádějí, že polymorfismus exonu 3 genu pro dopaminový receptor D4 má vliv na bázlivost psů korejského plemene Sapsari. Podíl genotypu *DRD4* na fenotypové hodnotě znaku byl přibližně odhadnut na 2%, což je pouhý zlomek celkového genetického efektu zodpovědného za více než 20% z celkové fenotypové proměnlivosti.

## 3.5 Metody molekulární biologie

### 3.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) lze provádět amplifikaci genů a dalších sekvencí DNA *in vitro* (Snustad a Simmons, 2009). Tuto převratnou a jednoduchou metodu navrhl v roce 1983 biochemik Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1986), který ji nechal následující rok patentovat a obdržel za ni v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. Technika PCR výrazně urychlila pokrok ve studiu struktury genomů různých organismů. Umožňuje specificky amplifikovat jakoukoliv oblast genomu během několika hodin, pokud známe nukleotidové sekvence ležící v blízkosti této cílové oblasti (Saiki *et al.*, 1988). Amplifikaci obvykle provádí enzym DNA polymeráza. Významnou inovací představovalo použití termostabilní *Taq* polymerázy izolované z termofilní gramnegativní bakterie *Thermus aquaticus* (Innis *et al.*, 1988).

#### 3.5.1.1 Princip polymerázové řetězové reakce – PCR

Princip PCR popisuje řada autorů (např. Mullis *et al.* 1986; Saiki *et al.*, 1988; Sambrook *et al.*, 1989). Metoda zahrnuje tři základní kroky, které se mnohokrát opakují: denaturace templátové DNA, nasedání primerů, tzv. „annealing“, a prodlužování nově vznikajícího řetězce DNA.

V prvním kroku je DNA denaturována zahřátím na 92-95°C po dobu asi 30 sekund (Snustad a Simmons, 2009). Při této teplotě se poruší vodíkové můstky a výsledkem je vznik jednořetězcových molekul DNA (Brown, 2007). Jednořetězcové molekuly DNA jsou nutným substrátem pro enzymy DNA polymerázy (Sambrook *et al.*, 1989).

Ve druhém kroku se roztok denaturované templátové DNA ochladí na teplotu přibližně 50-60°C, což umožní hybridizaci s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů (Snustad a Simmons, 2009). Primer je krátký fragment jednořetězcové DNA komplementární ke specifickým oblastem templátové DNA (Saiki *et al.*, 1988). Optimální délka primerů je přibližně 18-24 bází (Griffin a Griffin, 1994). Primer poskytuje volnou 3' hydroxylovou skupinu potřebnou pro kovalentní navázání dalšího nukleotidu a následné prodlužování řetězce. Ideální teplota pro připojení primerů („annealing“ teplota) závisí na tom, z kolika a z jakých bází jsou složeny (Snustad a Simmons, 2009). Mezi základní parametry při výběru primerů patří: unikátnost sekvence primeru v rámci zkoumané molekuly DNA, délka primeru, teplota tání a obsah C a G, stabilita na konci 3' primeru, tendence ke vzniku sekundárních struktur a komplementarita mezi dvěma primery (Griffin a Griffin, 1994).

Ve třetím kroku zahřejeme templátovou DNA s navázanými primery na optimální teplotu pro zahájení polymerace (obvykle 72°C), což umožní zabudování volných nukleotidtrifosfátů do nově vznikajícího řetězce DNA na základě komplementarity (Sambrook *et al.*, 1989). Nyní máme čtyři vlákna molekuly DNA místo dvou původních vláken (Brown, 2007).

V následujícím cyklu se denaturují produkty vzniklé v prvním cyklu replikace a proces se mnohokrát opakuje, dokud není dosaženo požadovaného stupně amplifikace. Amplifikace je exponenciální, jedna dvoušroubovice DNA dá po 30 cyklech vzniknout více než miliardě kopií sekvence DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Nejprve se jako replikační enzym používala při PCR DNA polymeráza I z *E. coli*, která se během denaturačního kroku inaktivovala, a bylo nutné ji opětovně do reakce přidávat. Vylepšení přišlo s objevem termostabilních DNA polymeráz, které zůstávají během teplotně denaturačního kroku aktivní. Na rozdíl od většiny polymeráz, nemá *Taq*-polymeráza 3' → 5' korekční aktivitu, a tak produkuje při replikaci chyby s vyšší četností, než je obvyklé. Pokud je požadována vysoká přesnost, provádí se PCR s použitím termostabilních polymeráz vykazujících 3' → 5' korekční aktivitu, např. *Pfu* (z *Pyrococcus furiosus*) nebo *Tli* (z *Thermococcus litoralis*). Pomocí PCR nelze účinně amplifikovat fragmenty delší než 35 kb (Snustad a Simmons, 2009).

### 3.5.2 Restrikční štěpení PCR produktů

Nukleové kyseliny lze štěpit pomocí speciální skupiny enzymů nazývaných restrikční endonukleázy, jejichž objev (Smith a Wilcox, 1970) znamenal revoluci v molekulární biologii. Mnohé endonukleázy štěpí DNA zcela náhodně, ale restrikční endonukleázy typu II štěpí DNA pouze ve specifických sekvencích, tzv. restrikčních místech. Cílové místo je tvořené obvykle 4 až 8 nukleotidy. Tato sekvence je velmi často palindromatická. Palindromem rozumíme sekvenci párů nukleotidů, které se čtou stejně dopředu i pozpátku od centrální osy symetrie.

Restrikční endonukleázy jsou produktem různých mikroorganismů, jejichž biologickou funkcí je chránit genetický materiál před cizorodou DNA z jiných druhů, například před virovou DNA, kterou odbourávají. Všechna štěpná místa ve vlastní DNA jsou chráněna metylací jednoho nebo více nukleotidů v každé nukleotidové sekvenci, která je rozeznávána restrikční endonukleázou daného organismu. Dodnes bylo charakterizováno

a purifikováno již okolo 400 restrikčních enzymů majících v molekulární biologii široké využití (Brown, 2007; Snustad a Simmons, 2009).

Některé typy molekulární diagnostiky jsou založeny na testování přítomnosti nebo nepřítomnosti specifických míst pro štěpení restrikčními enzymy v testované molekule DNA. Alelu s mutací v restrikčním místě lze od standardní alely odlišit tak, že se daný úsek genu amplifikuje pomocí PCR, amplifikovaná DNA se štěpí příslušným enzymem a výsledné produkty restrikčního štěpení se vyhodnotí pomocí elektroforézy na agarózovém gelu, aby se prokázalo, zda amplifikovaný fragment byl nebo nebyl štěpen (Snustad a Simmons, 2009).

### **3.5.3 Elektroforetická separace fragmentů DNA**

Gelová elektroforéza je výkonnou technikou využívající rozdílů ve velikosti a elektrickém náboji k rozdělení makromolekul ve směsi. Molekuly DNA nesou negativní náboj, a proto migrují v elektrickém poli směrem k pozitivnímu pólu. Jejich náboj na jednotku hmotnosti je v podstatě stejný, takže se dělí v agarózových nebo polyakrylamidových gelech tvořících pórovitou síť téměř výhradně na základě své velikosti nebo konformace. Čím je molekula DNA menší, tím rychleji se gelem pohybuje. Velikost molekul DNA, které mohou být separovány, je dána složením gelu. Agarózové gely jsou vhodnější pro separaci velkých molekul (nad několik set nukleotidů), zatímco polyakrylamidové gely umožňují rozdělování menších molekul DNA, a to v rozmezí 1-300 bp. Na polyakrylamidovém gelu jsme schopni rozdělit molekuly lišící se jen jedním nukleotidem (Brown, 2007; Snustad a Simmons, 2009).

Aby bylo možné výsledky gelové elektroforézy pozorovat, je nutné gel obarvit látkou, která DNA zviditelní. K barvení DNA na agarózových a polyakrylamidových gelech se běžně používá ethidium bromid, který má silně mutagenní účinky. Pod ultrafialovým zářením jsou po obarvení jasně viditelné proužky, ukazující polohu DNA fragmentů různých velikostí. Z důvodu zdravotních rizik dnes mnoho laboratoří používá nemutagenní barviva nevyžadující k vizualizaci ultrafialové záření. Citlivější detekční metodou je autoradiografie. DNA je označena inkorporací radioaktivního markeru a vizualizována pomocí fotografického filmu (Snustad a Simmons, 2009). K barvení polyakrylamidového gelu jsou také používány ionty stříbra (Caetano-Anollés a Greshoff, 1994).

### **3.5.4 Polymorfismus konformace jednořetězcové DNA (SSCP)**

Mezi nejjednodušší, levné a velmi citlivé metody vyhledávání mutací patří technika označovaná SSCP (single strand conformation polymorphism, polymorfismus konformace jednořetězcové DNA). Jejím principem je elektroforéza fragmentů jednovláknové (ss) DNA

vhodné délky na nedenedurujícím polyakrylamidovém gelu při nízké teplotě a následná vizualizace. Za těchto podmínek se řetězec DNA sbalí do unikátní prostorové struktury. Vlákna DNA s odlišnou sekvencí nevytvářejí stejnou konformaci a liší se i rychlost, jakou putují v gelu (Sunnucks, 2000).

Konformace jednovláknového fragmentu DNA je dána intramolekulárními interakcemi uvnitř DNA sekvence, což umožňuje detekci mutací. Pomocí SSCP je možné často odlišit i záměnu jediné báze, protože i velmi malá změna v sekvenci nukleotidů může způsobit, že DNA vytvoří úplně jinou prostorovou strukturu. Uvádí se, že při práci s úsekem DNA dlouhým 100 – 300 bp lze pomocí SSCP zachytit až 99 % bodových mutací a u úseků dlouhých 300 - 400 bp účinnost klesá na 89 % (Hayashi, 1991).



## **4. MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1 Hodnocené genotypy**

Do sledované populace zvířat bylo zařazeno celkem 109 zástupců plemene bearded kolie obou pohlaví (62 fen a 47 psů). Jedinci pocházeli z osmi evropských států a byli narozeni v letech 1994 a 2008. U každého zařazeného psa byla poznamenána barva srsti dle údaje v rodokmenu. Přehled hodnocených zvířat je uveden v tabulce 10.

### **4.2 Izolace genomické DNA z buněk bukálních sliznic**

Vzorky DNA byly získány neinvazivní metodou pomocí stěrů z bukální sliznice psů sterilním cytologickým kartáčkem. Protože bylo nutné zamezit kontaminaci vzorku, zvíře nesmělo před odběrem přijímat alespoň dvě hodiny potravu. Kartáček byl vsunut do dutiny ústní a krouživými pohyby byla setřena vnitřní epitelální strana tváří. Během celé doby odběru bylo s kartáčkem manipulováno asepticky a po oschnutí byl vložen do sterilní polypropylénové zkumavky. Vzorky byly tímto způsobem uchovávány v mrazicím boxu při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pro vlastní izolaci genomické DNA byl použit kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, SRN) s postupem, který výrobce doporučuje pro izolaci z buněk bukálních sliznic.

### **4.3 Amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)**

#### **4.3.1 Přehled použitých primerů**

Pro analýzu genů *CBD103*, *TYRPI* a *DRD4* byly úspěšně použity primery, jejichž přehled je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled použitých primerů

Název primeru	Sekvence	Gen	Marker	Typ	Zdroj
<b>Ds23G-F</b>	5'-CTGTTCCAGGAAATGGGGGA-3'	<i>CBD103</i>	<i>Ds23G</i>	PCR	Oba primery navrženy při řešení diplomové práce
<b>Ds23G-R</b>	5'-TCTTTCTTCGGCAGCATTTT-3'				
<b>Dbez23G-F</b>	5'-CTGTTCCAGGAAATGGGATT-3'	<i>CBD103</i>	<i>Dbez23G</i>	PCR	Oba primery navrženy při řešení diplomové práce
<b>Dbez23G-R</b>	5'-CCAGGAGGCATTTTCACACT-3'				
<b>DEX5-F</b>	5'-ACCAATGGTGCAACGTCTTCCTGAACCG-3'	<i>TYRP1</i> - exon 5	<i>TYRP1</i> -331	PCR-RFLP	Schmutz <i>et al.</i> (2002)
<b>DEX5-R</b>	5'-GCCTTCCACTGTGTTTCGGAAACTG-3'				
<b>DEX5-F</b>	5'-ACCAATGGTGCAACGTCTTCCTGAACCG-3'	<i>TYRP1</i> - exon 5	<i>TYRP1</i> -345	PCR-RFLP	Schmutz <i>et al.</i> (2002)
<b>DEX5-R</b>	5'-GCCTTCCACTGTGTTTCGGAAACTG-3'				
<b>S41C-F</b>	5'-GGGAAGCATCTTCTTGTTC-3'	<i>TYRP1</i> - exon 2	<i>TYRP1</i> -41	PCR-SSCP	Oba primery navrženy při řešení diplomové práce
<b>S41C-R</b>	5'-TCTGCTATCACTGCCTCACA-3'				
<b>D4F5A</b>	5'-TTCTTCCTACCCTGCCCCGCTCATG-3'	<i>DRD4</i> - exon 3	<i>DRD4</i> - 1.první amplifikace	PCR	Ito <i>et al.</i> (2004)
<b>D4DogR5A</b>	5'-CCGCGGGGGCTCTGCAGGGTCG-3'				
<b>D4F5A</b>	5'-TTCTTCCTACCCTGCCCCGCTCATG-3'	<i>DRD4</i> - exon 3	<i>DRD4</i> - 2.první amplifikace	PCR	Ito <i>et al.</i> (2004)
<b>D4DogBR5A</b>	5'-TGGGCTGGGGGTGCCGTCC-3'				

## 4.3.2 Gen *beta-defensin 103* (*CBD103*)

### 4.3.2.1 Navržení markeru pro detekci mutace v lokusu pro *beta-defensin 103*

Na základě aminokyselinové sekvence nemutovaného proteinu *beta-defensinu 103*, který uvádějí Candille *et al.* (2007), byla pomocí databáze NCBI BLAST zjištěna sekvence mRNA odpovídající tomuto genu. Nalezená sekvence je uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2: Sekvence genu *CBD103* (NCBI DQ011972.1)

LOCUS	DQ011972	414 bp	mRNA	linear	MAM 10-NOV-2005
DEFINITION	Canis familiaris beta-defensin 103 ( <i>CBD103</i> ) mRNA, complete cds.				
ACCESSION	DQ011972				
VERSION	DQ011972.1 GI:66968819				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Canis lupus familiaris (dog)				
ORGANISM	<a href="#">Canis lupus familiaris</a> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia; Canidae; Canis.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 414)				
AUTHORS	Patil,A.A., Cai,Y., Sang,Y., Blecha,F. and Zhang,G.				
TITLE	Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract				
JOURNAL	Physiol. Genomics 23 (1), 5-17 (2005)				
PUBMED	<a href="#">16033865</a>				
REFERENCE	2 (bases 1 to 414)				
AUTHORS	Zhang,G.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (17-APR-2005) Department of Animal Science, Oklahoma State University, 212 Animal Science Building, Stillwater, OK 74078, USA				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..414 /organism="Canis lupus familiaris" /mol_type="mRNA" /sub_species="familiaris" /db_xref="taxon: <a href="#">9615</a> "				
<a href="#">gene</a>	1..414 /gene="CBD103"				
<a href="#">CDS</a>	114..317 /gene="CBD103" /codon_start=1 /product="beta-defensin 103" /protein_id=" <a href="#">AA59710.1</a> " /db_xref="GI:66968820" /translation="MRIYYLLLLLPLFLMPVPGNGGIINTLQRYRCRIRSGRCALLS CLPKEEQIGRCSSTGRKCCRKK"				
ORIGIN	114 atgagga 121 tctattacct tctcctcctg ttgcccttgc tgttcttgat gcctggtcca ggaaatgggg 181 gaattataaa taccctgcag aggtattatt gcagaataag gagcggctcg tgccgcttgc 241 tgagctgcct gccaaaggag gagcagatag gccgctgttc ttccactggc cgaaaatgct 301 gccgaagaaa gaaataaaaa aatccagaaa tgggatggga gcgttgtaaa gtgtgaaaat 361 gcctcctgga agtttataga agaaaaaccg aattaaatat ttttttttca aaag				





$\mu\text{M}$  dNTP, 0,32  $\mu\text{M}$  primer Dbez23G-F, 0,32  $\mu\text{M}$  primer Dbez23G-R a 2 mM tetramethylamonium axalát (Top Bio).

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) při následujících podmínkách: 1x (95°C - 3 minuty), 35x (94°C - 30 sekund, 54,7°C - 50 sekund, 72°C - 50 sekund), 1x (72°C - 10 minut). Produkty amplifikace byly separovány v 1,5% agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 1 hodiny. Elektroforeogramy byly vizualizovány ethidium bromidem a archivovány systémem GelDoc (BioRad) s programem QuantityOne (BioRad).

### **4.3.2.3 Sekvenační analýza ampliconu markeru *CBD103***

#### **Izolace fragmentu z gelu**

U čtyřech bearded kolií s rozdílnou barvou srsti byl získán PCR fragment o předpokládané velikosti 204 bp. U každého z genotypů bylo připraveno celkem 75  $\mu\text{l}$  PCR produktu. Separace ampliconů byla provedena v 1% agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 1,5 hodiny s cílem oddělení případných primerů-dimerů u vlastního ampliconu. Fragmenty byly vyříznuty z gelu sterilním skalpelem a DNA z nich byla vyizolována pomocí kitu MinElute PCR Purification Kit (Qiagen). Při izolaci byl dodržen postup uváděný výrobcem.

#### **Sekvenační analýza**

Pro stanovení sekvence byla použita metoda přímé sekvenace PCR produktu od Dbez23G-F a Dbez23G-R primeru. Sekvenace byla provedena u firmy BioGen (ČR) pomocí kapilární elektroforézy AbIPRISM 3110. Získané sekvence byly porovnány pomocí volně dostupného programu BioEdit verze 7.0.9.0. Byly určeny konsensus sekvence pro všechny čtyři hodnocené genotypy.

### **4.3.3 Identifikace mutací genu *TYRP1***

#### **4.3.3.1 Marker *TYRP1*-331 a *TYRP1*-345**

#### **Složení reakční směsi a podmínky amplifikace**

Optimalizovaná reakční směs o objemu 12,5  $\mu\text{l}$  obsahovala 50 ng templátové DNA, 0,7 U Dream *Taq*<sup>TM</sup> polymerázy (Fermentas) a 5  $\mu\text{g}$  BSA. Koncentraci reakčního pufru výrobce enzymu blíže nespecifikuje, pouze uvádí, že pufr obsahoval KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 2mM  $\text{MgCl}_2$ . Koncentrace ostatních složek byla následující: 200  $\mu\text{M}$  dNTP, 0,40  $\mu\text{M}$  primer DEX5-F, 0,4  $\mu\text{M}$  primer DEX5-R a 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) za následujících podmínek: 1x (95°C - 4 minuty), 30x (95°C - 50 sekund, 57,0°C - 50 sekund, 72°C - 50 sekund), 1x (72°C - 4 minut). Produkty amplifikace byly separovány v 1,5% agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 1 hodiny.

#### **PCR-RFLP detekce mutace způsobující vznik STOP kodónu v pozici 331. AK**

K 10,3 µl PCR produktu vzniklého při použití primerů DEX5-F a DEX5-R bylo přidáno 1,2 µl 10x O Buffer (Fermentas) a 5 U enzymu *AciI* (Fermentas). Digesce probíhala při 37°C po dobu 12 hodin. Restrikční fragmenty byly separovány v 3% agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 2 hodin. U nezmutované DNA byl ampikon o velikosti 121 bp štěpen na dva fragmenty o velikosti 93 bp a 28 bp. Jestliže se ampikon neštěpil, muselo dojít k zařazení stop kodónu.

#### **PCR-RFLP detekce mutace způsobující delecii prolinu v pozici 345. AK**

K 10,3 µl PCR produktu vzniklého při použití primerů DEX5-F a DEX5-R bylo přidáno 1,2 µl 10x G Buffer (Fermentas) a 5 U enzymu *MnII* (Fermentas). Digesce probíhala při 37°C po dobu 12 hodin. Restrikční fragmenty byly separovány v 3% agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 2 hodin. Ampikon o velikosti 121 bp byl štěpen na dva fragmenty o velikosti 73 bp a 48 bp u jedinců, u kterých nedošlo k delecii kodónu pro prolin. Přítomnost neštěpeného PCR produktu signalizovala delecii tripletu kódujícího aminokyselinu prolin.

#### **4.3.3.2 Marker *TYRPI-41***

##### **Navržení markeru pro detekci mutace v lokusu *TYRPI-41***

Na základě publikované sekvence NCBI XM 859450.1 exonu 2 genu *TYRPI* byla navržena dvojice primerů S41C-F a S41C-R, která amplifikuje fragment o velikosti 186 bp. Podle Schmutz *et al.* (2002) by v pozici 93. báze mělo dojít k substituci A za T, která má vést ke změně aminokyselinového složení peptidu způsobující hnědé zbarvení. Primery byly navrženy tak, aby ampikon vykazoval velikost do 200 bp, což je nezbytné pro detekci polymorfismů metodou SSCP. V následující tabulce je uvedena pozice primerů.





#### **4.3.4 Dopaminový receptor D4 (*DRD4*)**

##### **4.3.4.1 Exon 3 genu *DRD4* - první amplifikace**

###### **Složení reakční směsi a podmínky amplifikace**

Optimalizovaná reakční směs o objemu 12,5 µl obsahovala 50 ng templátové DNA, 1,25 U *Pfu* polymerázy (Fermentas) a 0,1 mg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 250 µM dATP, 250 µM dCTP, 250 µM dTTP, 125 µM dGTP, 7-deaza-dGTP 125 µM, 0,5 µM primer D4F5A, 0,5 µM primer D4DogR5A a 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) při následujících podmínkách: 1x (98°C - 2 minuty), 35x (98°C - 30 sekund, 65°C - 1 minuta, 74°C - 1 minuta), 1x (74°C - 10 minut). Výsledek amplifikace byl ověřen separací v 1,5% agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 2 hodin.

###### **Identifikace alel v lokusu *DRD4* pomocí sekvenační elektroforézy**

Vlastní polymorfismus byl detekován pomocí sekvenační elektroforézy. Metodický postup elektroforetické separace je uveden v příloze 4 diplomové práce. Tato technika umožňuje odlišit alely s následujícími velikostmi amplikonů: 396 bp, 435 bp, 447 bp, 486 bp, 498 bp, 549 bp, 576 bp. Terminologie označování alel podle jejich velikosti je převzata z práce Ito *et al.* (2004).

##### **4.3.4.2 Exon 3 genu *DRD4* - druhá amplifikace**

Alela označená jako 447 představuje v podstatě dvě možné sekvence odlišitelné další PCR amplifikací při použití jiného R primeru. Při této následné amplifikaci vznikají dva rozdílně velké produkty 150 bp (alela *447a*) a 162 bp (alela *447b*). Rovněž toto označení alel je převzato z práce Ito *et al.* (2004).

###### **Složení reakční směsi a podmínky amplifikace**

Optimalizovaná reakční směs o objemu 12,5 µl obsahovala 50 ng templátové DNA, 1,25 U *Pfu* polymerázy (Fermentas) a 0,1 mg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 250 µM dATP, 250 µM dCTP, 250 µM dTTP, 125 µM dGTP,

7-deaza-dGTP 125  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M primer D4F5A, 0,5  $\mu$ M primer D4DogBR5A a 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) při následujících podmínkách: 1x (98°C - 2 minuty), 35x (98°C - 30 sekund, 65°C – 1 minuta, 74°C – 1 minuta), 1x (74°C - 10 minut). Rozdíly mezi alelami 447a a 447b byly stanoveny separací v 3% agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 2,5 hodin.

#### **4.4 Zpracování dotazníku pro odhad psychických vlastností psů**

Pro posouzení aktivity-impulzivity a nepozornosti sledovaných jedinců byl použit ADHD dotazník validovaný pro majitele psů (Vas *et al.*, 2007), který obsahoval celkem 13 položek. Sedm z nich se týkalo posouzení aktivity a impulzivity (např. „Můj pes je divoký, hůře ovladatelný, když vyrazí vpřed, je těžké ho udržet“) a zbylých šest souviselo s nepozorností (např. „Je snadné upoutat pozornost mého psa, ale brzy ztratí zájem“). Majitel psa ohodnotil pozorovanou frekvenci projevů daného chování na stupnici 0 – 3. Skóre pro aktivitu-impulzivitě bylo vypočítáno jako součet majitelem uvedených hodnot u položek č. 4, 5, 6, 8, 9, 11 a 13 a skóre pro nepozornost bylo dáno součtem hodnot u zbývajících položek č. 1, 2, 3, 7, 10 a 12. Dotazník byl k dispozici on-line ve třech jazykových verzích (české, německé a anglické). Přesné znění dotazníku je přílohou 6 této práce.

#### **4.5 Bioinformatické zpracování dat a statistické hodnocení výsledků**

##### **4.5.1 Bioinformatické databáze a použité programy**

Informace o sekvencích studovaných genů byly získány z mezinárodní databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information) volně dostupné na internetové adrese <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pro porovnání sekvencí byla použita bioinformatická aplikace NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nacházející se na adrese <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> a program BioEdit verze 7.0.9.0 (Hall, 1999), který byl využit i pro nalezení konsensus sekvencí.

Pro návržení primerů byl použit program Primer3 Input v.0.4.0 autorů Rozen a Skaletsky (2000). Tento program je k dispozici na internetové adrese <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. Pro vyhledání restričních míst a nalezení PCR-RFLP markerů byl použit program Webcutter2.0 vytvořený Heimanem v roce 1997. K dispozici je na internetové adrese <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>.

## 4.5.2 Statistické vyhodnocení výsledků

### 4.5.3 Statistické hodnocení distribuce alel lokusu *TYRP1*

Pomocí programu TFPGA (Tools For Population Genetic Analyses) ver. 1.3 (Miller, 1997) byla provedena deskriptivní statistika hodnotící variabilitu lokusu *TYRP1*. Byl stanoven stupeň očekávané ( $H_E$ ) a pozorované ( $H_O$ ) heterozygotnosti. Hodnota  $H_E$  je teoretická hodnota frekvence heterozygotů, která by v populaci nastala při dosažení rovnovážného stavu podle Hardy-Weinbergova zákona.

### 4.5.4 Statistické hodnocení vztahu mezi distribucí alel exonu 3 genu *DRD4* a hodnotami získanými pomocí ADHD dotazníku

Deskriptivní statistika hodnotící variabilitu populací byla rovněž provedena pomocí programu TFPGA (Tools For Population Genetic Analyses) ver.1.3. (Miller, 1997). Pro tyto analýzy byly uměle vytvořeny skupiny jedinců tak, aby odpovídaly skutečným psychickým vlastnostem psů. Podle výsledného skóre pro nepozornost a aktivitu-impulzivitu byli jedinci rozděleni do třech skupin (A, B a C) na základě pravidel, která jsou patrná z tabulky 7. Pro hlubší analýzu byla vytvořena skupina D vzniklá sjednocením skupin A a B a skupina E sloučením skupin A a B.

Tabulka 7: Rozdělení do jednotlivých skupin na základě hodnot získaných pomocí ADHD dotazníku

Nepozornost		Aktivita-impulzivita	
Skupina	Skóre	Skupina	Skóre
A	<0; 2>	A	<0; 3>
B	<3; 8>	B	<4; 9>
C	<9; 18>	C	<10; 21>
D (B+C)	<3; 18>	D (B+C)	<4; 21>
E (A+B)	<0; 8>	E (A+B)	<0; 9>

Pomocí programu TFPGA byly u těchto skupin hodnoceny pozorované heterozygotnosti ( $H_O$  a  $H_E$ ), které se standardně používají v molekulárních populačních analýzách. Tento software byl také použit pro zpracování shlukové analýzy UPGMA s vyhodnocením na principu koeficientu podle Rogerse (1972) vyjadřujícího genetickou vzdálenost mezi výše zmíněnými uměle vytvořenými skupinami bearded kolií. Tyto koeficienty byly následně použity k sestavení kladogramů.

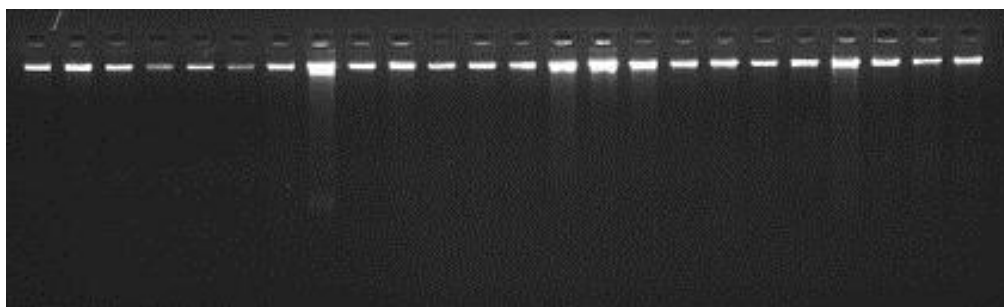
V každé skupině byla stanovena relativní frekvence alel exonu 3 genu *DRD4*. Rozdíly v zastoupení jednotlivých genotypů ve skupinách byly hodnoceny neparametrickým  $\chi^2$ -testem pomocí programu Statistica 8 CZ (StatSoft), který byl využit i pro provedení dvouvýběrového t-testu za účelem hodnocení rozdílů v průměrné hodnotě výsledného skóre pro aktivitu-impulzivitu a nepozornost mezi jednotlivými genotypy. Pro tuto analýzu byly vybrány genotypy, které vykazovaly vyšší četnost než 15 jedinců.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Izolace DNA

Parametry kvality i kvantity DNA získané izolací z buněk bukální sliznice byly výborné. Při namátkovém fotometrickém měření za použití UV spektrofotometru GeneQuant RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, Velká Británie) byla průměrná výtěžnost DNA z jednoho stěru u plemene bearded kolie 2200 ng DNA ( $V_k = 5,3 \%$ ). Průměrný poměr absorbancí A260/A280 byl 1,91 ( $V_k = 4,7 \%$ ). Parametry charakterizující kvantitu a kvalitu DNA nebyly blíže statisticky ověřeny, protože tuto část řešení práce lze považovat za zcela standardní předpoklad nezbytný pro následující analýzy.

Obrázek 5: Elektroforetické ověření kvality izolované DNA z bukálních buněk



### 5.2 Gen *CBD103*

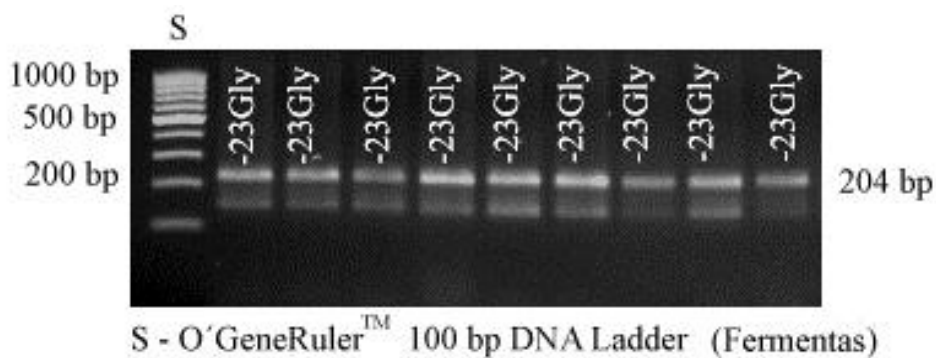
Pro plemeno bearded kolie je charakteristické melanistické zbarvení srsti, které je často kombinováno s bílými znaky. Všichni jedinci mají tedy zbarvení bez výskytu střídajících se proužků eumelaninu a feomelaninu po celé délce chlupu. Z literárního přehledu vyplývají dva genetické mechanismy kontroly melanismu u psů. Melanismus je u bearded kolí typicky řízen monogenně dominantně. Cílem této části diplomové práce bylo potvrdit hypotézu, že zbarvení jednotlivých chlupů bez proužkování je u bearded kolí řízeno dominantní mutací *CBD103* genu kódující *beta-defensin 103*.

#### 5.2.1 Detekce alel lokusu *CBD103*

V kapitole Materiál a metodika je uveden postup navržený dvou diagnostických PCR markerů, které jsou schopny odlišit delecí tripletu GGA kódujícího glycin. Tato delecce je zodpovědná za vznik dominantní alely *CBD103ΔG23* způsobující černé zbarvení. Na obrázku 6 je prezentován elektroforeogram PCR markerů při použití dvojice primerů Dbez23G-F a Dbez23G-R. Tento marker je dominantní a je schopen detekovat přítomnost alely, u které

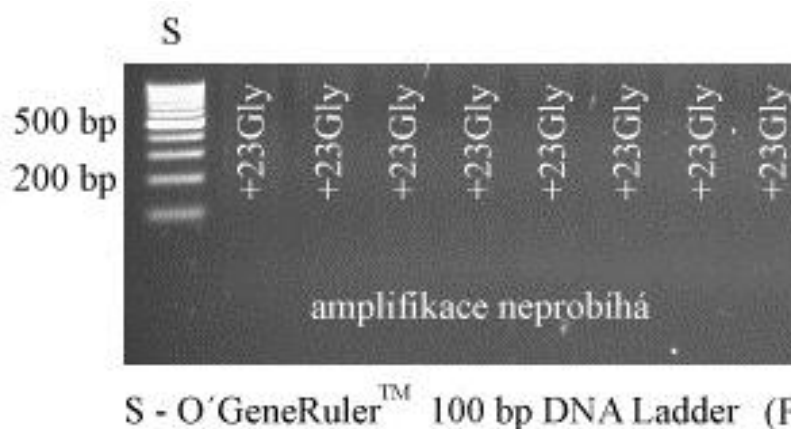
došlo k delecí tripletu kódujícího glycin. Z obrázku je zřejmé, že všechny bearded kolie mají ve svém genomu tuto zmutovanou alelu označenou na obrázku zápisem -23Gly.

Obrázek 6: Elektroforeogram PCR markeru lokusu *CBD103* při použití primerů Dbez23G-F a Dbez23G-R



Pro charakterizaci alelické sestavy je nutná amplifikace při použití primerů Ds23G-F a Ds23G-R. Výsledek tohoto hodnocení je uveden na obrázku 7, ze kterého vyplývá, že k amplifikaci nedošlo ani u jednoho z hodnocených zástupců bearded kolií.

Obrázek 7: Elektroforeogram PCR markeru lokusu *CBD103* při použití primerů Ds23G-F a Ds23G-R



Na základě porovnání obou výše uvedených obrázků lze předpokládat, že se u všech jedinců nachází vždy homozygotní sestava alel genu *CBD103* s delecí tripletu kódujícího glycin. Hodnocení všech psů je patrné ze souhrnné tabulky 10. Z této tabulky vyplývá, že hypotéza byla potvrzena u všech psů, kromě jediného, který vykazuje hnědé zbarvení s tříslivými znaky. Odůvodnění této výjimky bude zpracováno v diskuzi.

Protože populace byla v rámci této mutace homogenní, nebylo provedeno žádné statistické vyhodnocení z hlediska populační genetiky.

## 5.2.2 Sekvenační analýza PCR markeru genu *CBD103* při použití primerů Dbez23G-F a Dbez23G-R

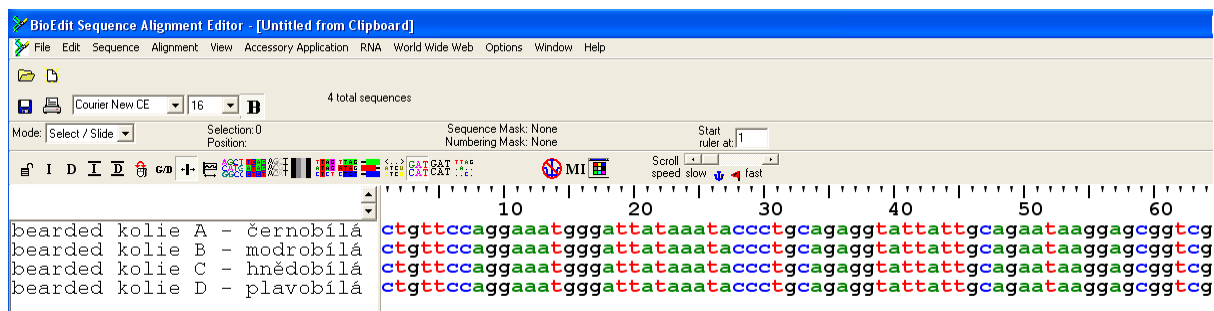
PCR marker vymezený dvojicí primerů Dbez23G-F a Dbez23G-R byl nově navrženým markerem v rámci řešení diplomové práce. Proto byla provedena sekvenační analýza získaného amplikonu. Pro sekvenaci byla vybrána černobílá, modrobílá, hnědobílá a plavobílá bearded kolie. U všech sekvenovaných zvířat byla získána zcela identická sekvence fragmentu o velikosti 204 bp uvedená v následující tabulce.

Tabulka 8: Sekvence PCR markeru genu *CBD103* při použití primerů Dbez23G-F a Dbez23G-R

```
5'-ctgttccaggaaatgggattataaacctgcagaggtattattgcagaataaggagcggtcggtgcgccttgctgagctgcctg  
ccaaaggaggagcagataggccgctgttcttccactggccgaaaatgtgcccgaagaagaaataaaaaaacagaaatgggatg  
ggagcgttgtaaagtgtaaaatgcctcctgg-3'
```

Na obrázku 8 je provedeno porovnání sekvencí všech čtyřech hodnocených psů pomocí programu BioEdit verze 7.0.9.0 (Hall, 1999).

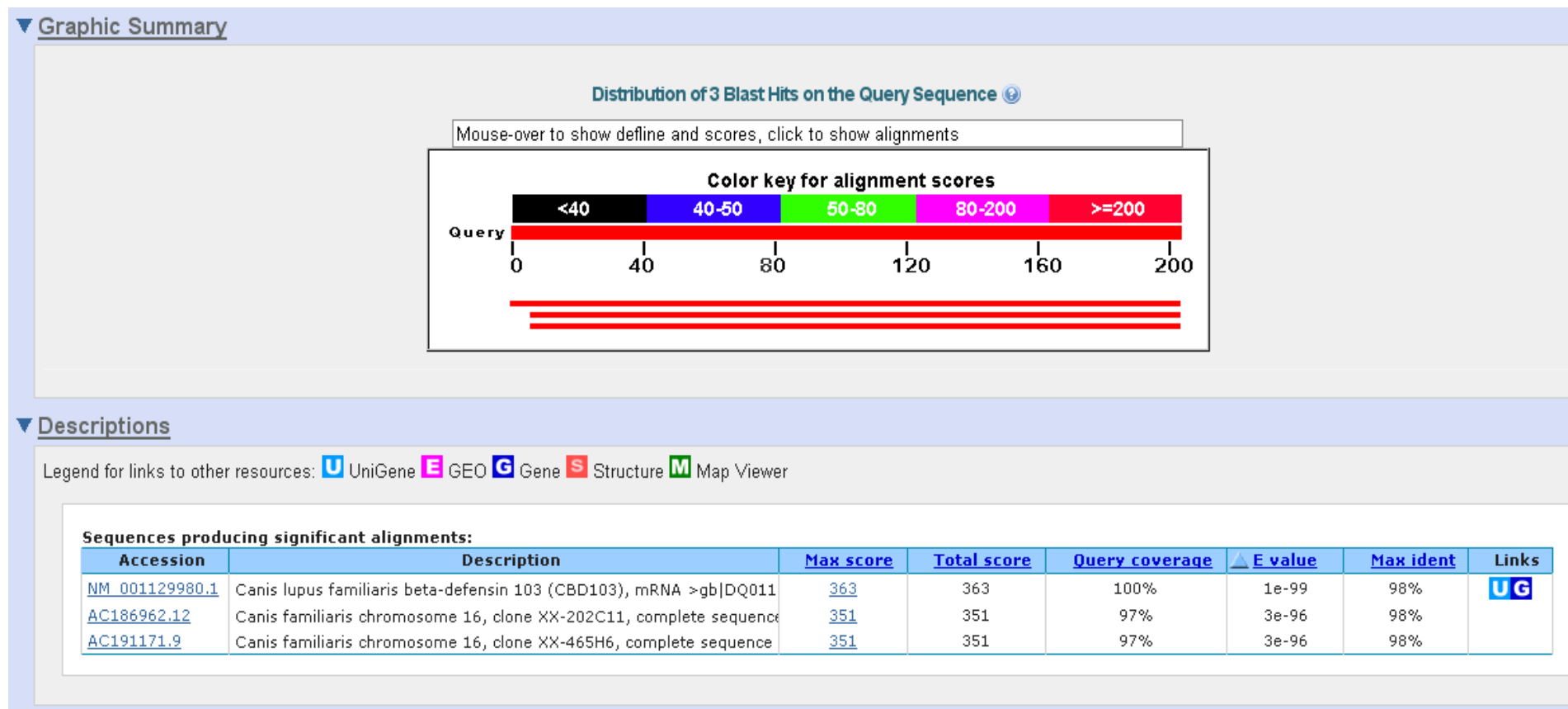
Obrázek 8: Multialignment sekvencí PCR amplikonu při použití primerů Dbez23G-F a Dbez23G-R



Získaná sekvence byla porovnána s mezinárodní nukleotidovou databází NCBI BLAST. Výsledek této analýzy je zobrazen v tabulce 9. Je zřejmé, že nalezené sekvence vykazovaly maximální stupeň homologie s položkou databáze označenou číslem NM\_001129980.1, která odpovídá mRNA genu *CBD103*. Z této tabulky je rovněž patrná 3 nukleotidová delece, která je příčinou vzniku kauzální mutace vedoucí ke vzniku dominantní černé.

Na obrázku 9 je provedeno bližší porovnání získané sekvence rovněž za pomoci databáze NCBI BLAST. Tato položka databáze s číslem NM\_001129980.1 byla použita pro navržení primerů. Z obrázku lze usuzovat, že v mezinárodní databázi NCBI je uložena sekvence alely genu *CBD103* bez trinukleotidové delece.

Obrázek 9: Výsledek porovnání nalezené sekvence markeru genu *CBD103* při použití primerů Dbez23G-F a Dbez23G-R s databází NCBI BLAST





Tabulka 9: Porovnání sekvence ampliconu při použití primeru při použití primerů Dbez23G F a Dbez23G-R s databází NCBI BLAST

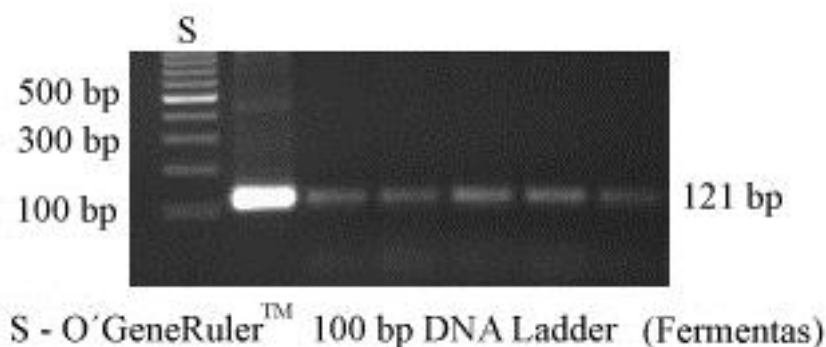
<a href="#">ref NM_001129980.1 </a>	<b>UG</b>	Canis lupus familiaris beta-defensin 103 ( <i>CBD103</i> ), mRNA
<a href="#">gb DQ011972.1 </a>	<b>UG</b>	Canis familiaris beta-defensin 103 ( <i>CBD103</i> ) mRNA, complete cds Length=414
<a href="#">GENE ID: 100170103</a> <i>CBD103</i>   beta-defensin 103 [Canis lupus familiaris] (10 or fewer PubMed links)		
Score = 363 bits (196), Expect = 1e-99		
Identities = 204/207 (98%), Gaps = 3/207 (1%)		
Strand=Plus/Plus		
Query	1	CTGTTCCAGGAAATGGG---ATTATAAATACCCTGCAGAGGTATTATTGCAGAATAAGGA 57
Sbjct	163	CTGTTCCAGGAAATGGGGGAATTATAAATACCCTGCAGAGGTATTATTGCAGAATAAGGA 222
Query	58	GCGGTCGGTGC GCCTTGCTGAGCTGCCTGCCAAAGGAGGAGCAGATAGGCCGCTGTTCTT 117
Sbjct	223	GCGGTCGGTGC GCCTTGCTGAGCTGCCTGCCAAAGGAGGAGCAGATAGGCCGCTGTTCTT 282
Query	118	CCACTGGCCGAAAATGCTGCCGAAGAAAGAAATaaaaaaaaTCCAGAAATGGGATGGGAGC 177
Sbjct	283	CCACTGGCCGAAAATGCTGCCGAAGAAAGAAATAAAAAAATCCAGAAATGGGATGGGAGC 342
Query	178	GTTGTAAAGTGTGAAAATGCCTCCTGG 204
Sbjct	343	GTTGTAAAGTGTGAAAATGCCTCCTGG 369

### 5.3 Gen *TYRPI*

#### 5.3.1 Detekce alel *TYRPI*-331 a *TYRPI*-345 na principu PCR-RFLP

V hodnocené populaci bearded kolií se podařilo detekovat všechny tři známé mutace lokusu *TYRPI* způsobující hnědé zbarvení kůže a srsti. Celkem bylo genotypováno 109 bearded kolií a zjištěný genotyp zcela odpovídal jejich fenotypu, což je patrné z tabulky 10. Na obrázku 10 je znázorněn elektroforeogram monomorfního PCR produktu představujícího amplifikovanou část 5. exonu *TYRPI*, ve které se nacházejí potenciální bodové mutace vedoucí ke vzniku hnědé barvy srsti.

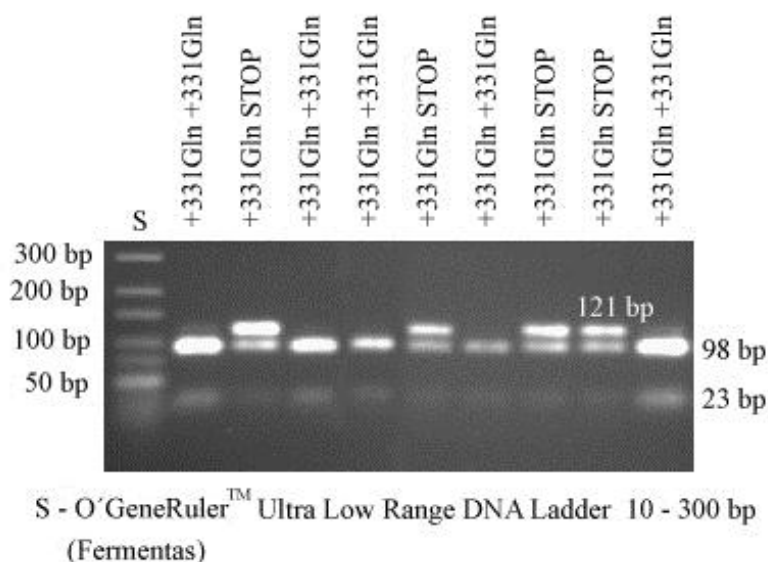
Obrázek 10: Elektroforeogram PCR monomorfního ampliconu markeru *TYRPI* před restrikčním štěpením



Na následujících obrázcích jsou uvedeny vzorové elektroforeogramy PCR-RFLP markerů, které umožňují detekovat mutace na principu restričního štěpení.

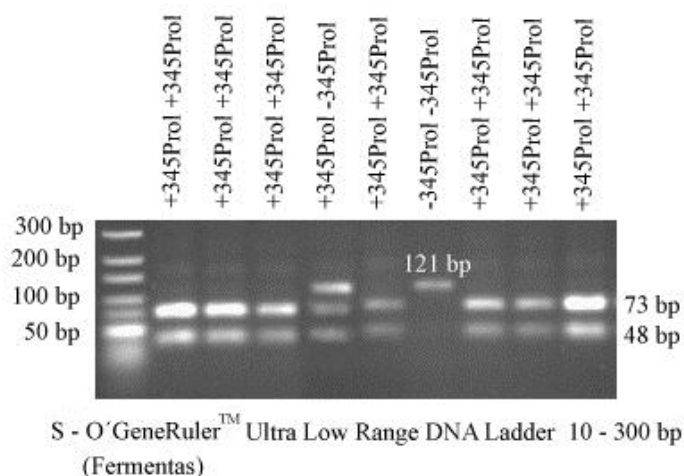
Vzorový elektroforeogram pro detekci bodové mutace, která ovlivnila restriční místo pro enzym *AciI*, je prezentován na obrázku 11. U jedinců s nemutovanou sekvencí *TYRPI* genu je v pozici 331. aminokyseliny zabudován glycin. Tato alela je na obrázku znázorněna zápisem +331Gln. Bodová mutace vede ke vzniku stop kodónu, který způsobuje vznik prematurní mRNA. Zmíněná mutace alely je na obrázku 11 znázorněna zápisem STOP. Jedinci, u kterých je například uveden genotyp +331Gln STOP, jsou z pohledu této mutace heterozygotní. Výsledky hodnocení všech jedinců jsou uvedeny v tabulce 10.

Obrázek 11: Elektroforeogram PCR-RFLP markeru *TYRPI-331* po restričním štěpení



Vzorový elektroforeogram PCR-RFLP detekce polymorfismu v lokusu *TYRPI-345* po restričním štěpení enzymem *MnII* znázorňuje obrázek 12. U jedinců bez bodové mutace je v pozici 345. aminokyseliny zabudován prolin. Tato alela je na obrázku 12 označena jako +345Prol. Bodová mutace, která může ve finále vést ke vzniku hnědého pigmentu, je založena na principu delece tripletu kódujícího prolin. Tato zmutovaná alela je na obrázku označena jako -345Prol. Jedinec, který je na obrázku 12 popsán jako +345Prol-345Prol, je z pohledu této mutace heterozygotem. Výsledky hodnocení všech jedinců jsou uvedeny v tabulce 10.

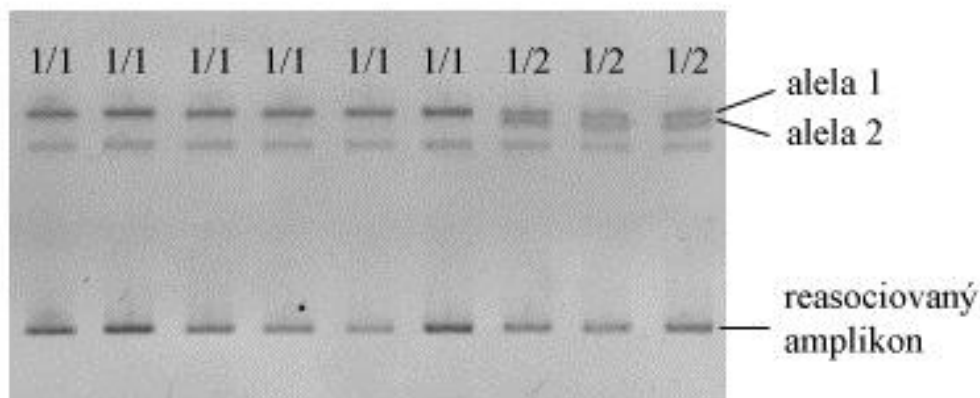
Obrázek 12: Elektroforeogram PCR-RFLP markeru *TYRP1-345* po restriktivním štěpení



### 5.3.2 Detekce alely *TYRP-41* na principu PCR-SSCP

Vzorový elektroforeogram SSCP separace amplikonu exonu 2 genu *TYRP1* o velikosti 186 bp, který může obsahovat další z potencionálních mutací vedoucí ke hnědému zbarvení, je zobrazen na obrázku 13. Tato mutace je založena na substituci A za T v pozici 93. nukleotidu nezpůsobující změnu restriktivního místa pro žádnou ze známých restriktivních endonukleáz. Velikost amplikonu byla ověřena separací v 2% agarózovém gelu. Předpoklad, že u tohoto amplikonu nelze detekovat žádný délkový polymorfismus, byl potvrzen. Oproti tomu je při separaci v podmínkách SSCP naopak možné pozorovat dva jednovláknové konformační polymorfismy lišící se elektroforetickou mobilitou.

Obrázek 13: Elektroforeogram PCR-SSCP markeru *TYRP1-41*



Fragment s menší mobilitou je na obrázku 13 označen číslem 1. Fragment s větší mobilitou je na obrázku označen číslem 2. Lze předpokládat, že tento fragment odpovídá vlásence s výše zmíněnou substitucí, která může být příčinou vzniku hnědého zbarvení u některých bearded kolíí. Je třeba si uvědomit, že na vzniku černého nebo hnědého zbarvení se však nepodílí jen tento lokus *TYRP-41*, ale výsledné zbarvení je výsledkem interakcí všech lokusů *TYRP1*. Výsledky hodnocení všech jedinců jsou uvedeny v souhrnné tabulce 10.

### 5.3.3 Interakce mezi hodnocenými lokusy *TYRP1* a jejich vliv na výsledné zbarvení srsti

Výše popsané mutace v podstatě představují vznik nefunkčního *tyrosinase-related proteinu 1*. Teoreticky stačí, aby v tomto proteinu proběhla alespoň jedna z uvedených mutací, a protein neplní svou funkci. Pro vznik jedince s hnědým zbarvením je nutné, aby alespoň k jedné z těchto mutací došlo na obou homologních chromozómech. Proto musí u černobílých a modrobílých jedinců heterozygotních ve dvou nebo třech hodnocených polymorfních místech být všechny tyto mutace umístěny na jednom z dvojice homologních chromozómů. Avšak lokalizaci mutací z tohoto pohledu není možné zvoleným metodickým postupem prokázat. Celkové vyhodnocení interakcí těchto tří lokusů je uvedeno v tabulce 10. Mezi skutečným zbarvením srsti a výsledkem molekulární analýzy byla zjištěna plná korelace. V diplomové práci však nebyly studovány geny způsobující ředění zbarvení z černého na modré a z hnědého na plavé. Tudiž mají z pohledu studovaných genů modří jedinci stejné genetické založení jako černí a plaví jako hnědí.

Tabulka 10 – 1. část: Přehled analyzovaných genotypů a jejich hodnocení vybranými markery

Č.	Jméno psa	Pohlaví	Barva srsti	Genotypy				Genotyp dle Dostála (2007)
				<i>CBD103</i>	<i>TYRP1-331</i>	<i>TYRP1-345</i>	<i>TYRP1-41</i>	
1	Breaksea November Mist	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
2	Warwick Black Vanilka	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
3	Celtsdale Secret Star	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
4	Vinnetou Black Vanilka	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
5	Breaksea Flash Gordon	P	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
6	Hillbilly Molly Malone	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
7	Sergeant Pepper's Unique Like Paul	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PA</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
8	Sergeant Pepper's Woodstock	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>

Tabulka 10 – 2. část: Přehled analyzovaných genotypů a jejich hodnocení vybranými markery

Č.	Jméno psa	Pohlaví	Barva srsti	Genotypy				Genotyp dle Dostála (2007)
				<i>CBD103</i>	<i>TYRP1-331</i>	<i>TYRP1-345</i>	<i>TYRP1-41</i>	
9	Sergeant Pepper's Vivid Black Girl	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>P\Delta</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
10	Aijana von der Teufelsbande	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>P\Delta</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
11	Everton From Peers Of Miner's Lake	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>P\Delta</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
12	Josephine From Peers Of Miner's Lake	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
13	Colours Of Snuggle Dogs Britget	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
14	Love Magic Vanilka	P	hnědobílá s pálením	<i>G/G</i>	<i>QX</i>	<i>P\Delta</i>	<i>1/2</i>	<i>bb</i>
15	Sergeant Pepper's Venture Of My Life	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
16	Celtsdale Sunny Side Up	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
17	Celtsdale Search for a Star	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
18	Kindle Passion Sans-Soucis	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
19	Kindle Passion's Joy a Pride	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
20	Celtsdale So Sweet At Nonchalance	F	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
21	Kindle Passion Taliska	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
22	Iluze od Emy Destinové	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
23	Nobility Natural Beauty	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
24	Purple Hill's Arwen	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
25	Night Bird Černý Faun	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>P\Delta</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
26	Amazing Grace The I a Tt Revue	F	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
27	Gillaber Balnacraft	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
28	Brambledale Bubbles	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
29	Ramsgrove Roadrunner	P	černobílá s pálením	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
30	Grace Von Der Rohrbachau	F	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
31	Gretchen Von Der Rohrbachau	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
32	Philemon Paparazzi	P	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>

Tabulka 10 – 3. část: Přehled analyzovaných genotypů a jejich hodnocení vybranými markery

Č.	Jméno psa	Pohlaví	Barva srsti	Genotypy				Genotyp dle Dostála (2007)
				<i>CBD103</i>	<i>TYRPI-331</i>	<i>TYRPI-345</i>	<i>TYRPI-41</i>	
33	Our Own Surprise Indian Moon	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
34	Holmsland-Klit Finest Chocolate Chip	P	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
35	Pahari Presenting Papageno	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
36	Zotti-Floppy Toppolino	P	plavobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
37	Moonhill Dream Your Dream	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
38	Ailli Blue Hawart	F	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
39	Woolpack's Oriental Spicy Pie	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
40	Andělka ze Srdce Šumavy	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
41	Alistair's Free And Easy	P	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
42	Anemolly Blue Bohemia Harmony	F	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
43	Shinuba's Oceanic Goddess	F	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
44	Angel Face Anarinya	F	černobílá s pálením	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
45	All About Me Kiaora	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
46	Halloween Kiaora	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
47	Hendrix Kiaora	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
48	Firstprizebears Enfield	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
49	Filippo Z Vilete Bohemia	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
50	For Fans Only Kiaora	P	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
51	Fiorela Z Vilete Bohemia	F	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
52	Miner's Lake Moviestar	P	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
53	Kryšpín Vanilka	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
54	Bartholdi Emiel Regis	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
55	Astříčka Malý Vousáček	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
56	Breaksea Mar di Gras	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PΔ</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
57	Chuligánka od Emy Destinové	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
58	Karkulín od Emy Destinové	P	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>

Tabulka 10 – 4. část: Přehled analyzovaných genotypů a jejich hodnocení vybranými markery

Č.	Jméno psa	Pohlaví	Barva srsti	Genotypy				Genotyp dle Dostála (2007)
				<i>CBD103</i>	<i>TYRP1-331</i>	<i>TYRP1-345</i>	<i>TYRP1-41</i>	
59	Natterjack Jay Kay	P	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
60	Shinuba's Loud'n Proud	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
61	Demmi M. Brown z Knížecích Sadů	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
62	Nobility Natural Blonde	F	plavobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>P\Delta</i>	<i>1/2</i>	<i>bb</i>
63	Amber Jet Anarynia	P	černobílá s pálením	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
64	Cecilka Chlupatý Hopan	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
65	Barborka Chlupatý Hopan	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
66	Corrina Au Royaume D'endjy	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
67	Yankee Black Vanilka	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
68	Mayflower's Nathalie at Dea Dro	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
69	Audi Go Black Deline	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
70	Balza Black Aladin	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
71	Chicco Vanilka	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
72	Philemon Lights Of Sherry Lane	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
73	Philemon Occasion	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
74	Odin de Chester	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
75	Spice Of Life "Chatterbox" Caprice	F	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>P\Delta</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
76	Siggans Felicia	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>P\Delta</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
77	Natterjack Just Czeching	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
78	Westmilwunda Starlight Xpress	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
79	B'eastern Bunny Kiaora	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
80	Bonny and Clyde's de Cacharel	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
81	Sammy Lee Black Von Der Augustinerhöhe	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
82	Vallarens Ulla-Bella	F	modrobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
83	Erin Z Vilete Bohemia	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
84	Ulla Black Livie's Von Der Silbermine	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>

Tabulka 10 – 5. část: Přehled analyzovaných genotypů a jejich hodnocení vybranými markery

Č.	Jméno psa	Pohlaví	Barva srsti	Genotypy				Genotyp dle Dostála (2007)
				<i>CBD103</i>	<i>TYRP1-331</i>	<i>TYRP1-345</i>	<i>TYRP1-41</i>	
85	Tiffany My Only One in Brown of Happy Family	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
87	Lucy's Kassie Black Von Der Silbermine	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
87	Lucy's Kassie Black Von Der Silbermine	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
88	Indián od Emy Destinové	P	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
89	Hadrián od Emy Destinové	P	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
90	Benedikt Vanilka	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
91	Bonny And Clyde's Sexy Eyes	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
92	Charleston Luna Luck	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
93	Conie Brown z Knížecích sadů	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
94	Ája Brown z Knížecích sadů	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PΔ</i>	<i>1/2</i>	<i>bb</i>
95	Berúthiel Emiel Regis	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
96	Hau-Beauty Zizu	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
97	Cherry Parfait Of Smartness	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
98	Bambina Di Black Panas	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
99	Qurina Du Chateau Du Lac	F	plavobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
100	Breaksea Allegro	P	plavobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
101	Breaksea Andromeda For Karmeliann	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
102	Breaksea Captain Scarlet	P	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
103	Bendale Special Times	P	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>XX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>bb</i>
104	Breaksea Masquerade	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PΔ</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
105	Bendale Meant to Be	P	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/2</i>	<i>Bb</i>
106	Breaksea Bewitched	F	hnědobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PΔ</i>	<i>2/2</i>	<i>bb</i>
107	Breaksea Paint it Black for Karmeliann	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QQ</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>BB</i>
108	Arnika Malý Vousáček	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>
109	Philemon Sweet Lady Moonfellow	F	černobílá	$\Delta/\Delta$	<i>QX</i>	<i>PP</i>	<i>1/1</i>	<i>Bb</i>



### 5.3.4 Populační analýza frekvencí alel a genotypů studovaných lokusů *TYRPI* genu

V rámci diplomové práce bylo studováno plemeno bearded kolie, u něhož je chovatelskými řády povoleno libovolné křížení barevných rázů. Z tohoto hlediska se můžeme na plemeno v roce 2010 dívat jako na populaci. Čistokrevná plemenitba je založena na selekci rodičů, kteří musí splňovat podmínky chovnosti. Takovýto zásah člověka do reprodukce populace může teoreticky vést k inbreedingu, který může narušovat i frekvence alel hodnocených markerů. Vzhledem k možnému křížení všech barevných rázů byla následující statistická analýza zpracována u všech jedinců bez ohledu na zbarvení srsti. U každého lokusu byly stanoveny frekvence původní a mutované alely prezentované v tabulce 11. Pomocí programu TFPGA ver. 1.3 (Miller, 1997) byly stanoveny hodnoty pozorované heterozygotnosti ( $H_O$ ) a očekávané heterozygotnosti ( $H_E$ ). Tyto výsledky jsou rovněž uvedeny v tabulce 11. Hodnota  $H_E$  odpovídá teoretické hodnotě heterozygotnosti, která by v populaci nastala v případě platnosti Hardy-Weinbergova zákona. Pozorovaná heterozygotnost byla velice blízká očekávané hodnotě. Obecně platí, že intenzivní příbuzenská plemenitba vede k homozygotizaci populace. Tento fakt se odrazil v nízkých hodnotách heterozygotnosti v lokusech *TYRPI-345* a *TYRPI-41*. Tato problematika bude dále rozvedena v kapitole Diskuse.

Tabulka 11: Relativní frekvence alel a heterozygotnost lokusu *TYRPI* u sledovaných jedinců plemene bearded kolie

Lokus	n	Frekvence alel		$H_E$	$H_O$
		<i>Q</i>	<i>X (b<sup>s</sup>)</i>		
<i>TYRPI-331</i>	109	0,5321	0,4679	0,5002	0,5138
		<i>P</i>	<i>A (b<sup>d</sup>)</i>		
<i>TYRPI-345</i>	109	0,9404	0,0596	0,1127	0,1193
		<i>I</i>	<i>2 (b<sup>c</sup>)</i>		
<i>TYRPI-41</i>	109	0,9128	0,0872	0,1599	0,1560

n = počet genotypovaných jedinců,  
 $H_E$  = očekávaná heterozygotnost,  $H_O$  = pozorovaná heterozygotnost

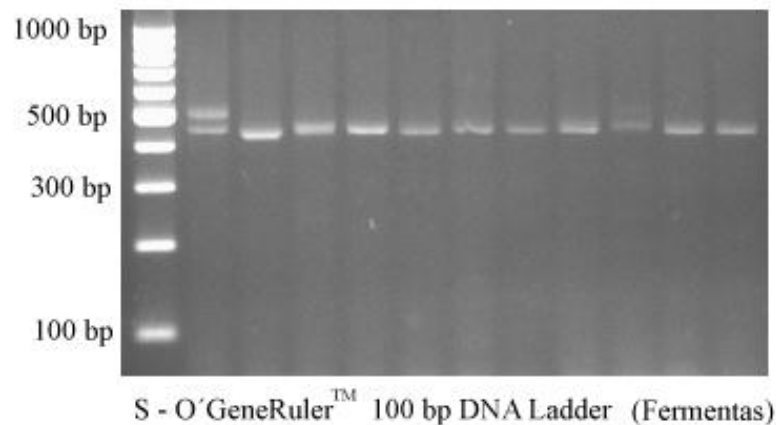
Terminologie označování alel je převzata z práce Schmutz *et al.* (2002). V závorce je uvedena i terminologie, kterou používá Schmutz a Berryere (2007).

## 5.4 Hodnocení lokusu *DRD4*

### 5.4.1 Detekce alel exonu 3 genu *DRD4*

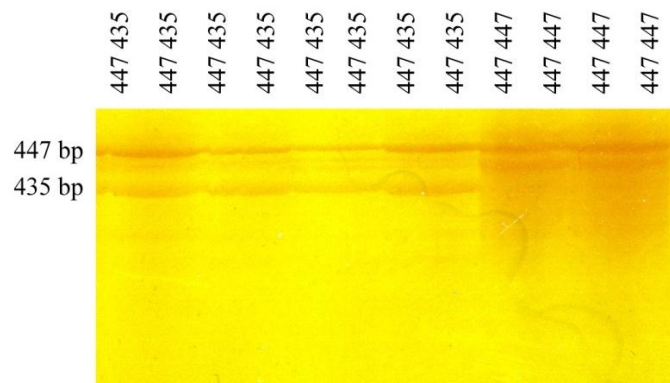
Výsledek amplifikace, který byl ověřen separací v 1,5% agarózovém gelu, je uveden na obrázku 14.

Obrázek 14: Elektroforeogram separace PCR amplikonu markeru exonu 3 genu *DRD4* na agarózovém gelu při použití primerů D4DogR5A a D4F5A



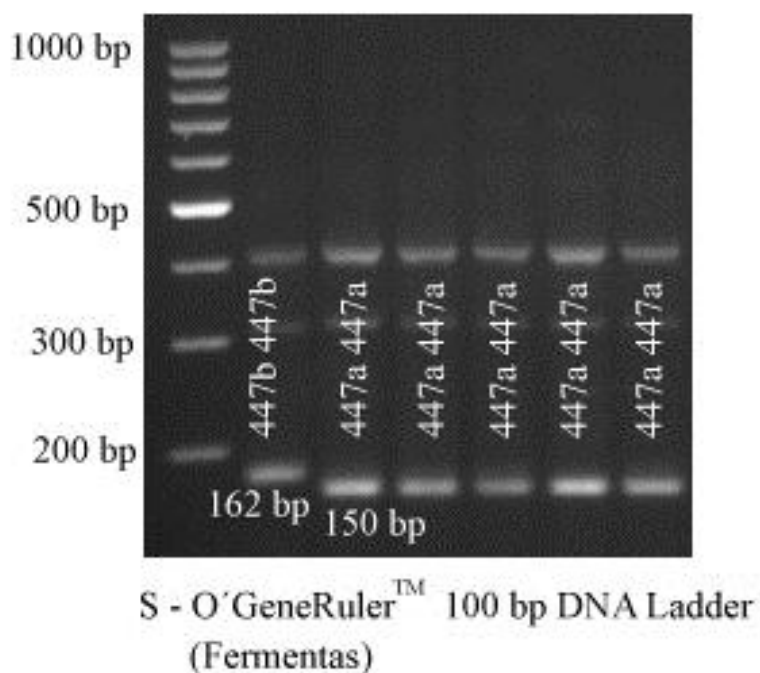
Z obrázku jsou sice patrné polymorfismy amplifikovaných fragmentů, ale správné stanovení velikosti jednotlivých alel nebylo možné. Proto byla optimalizována separace PCR produktů pomocí sekvenční cely s následným barvením ionty dusičnanu stříbrného. Molekuly DNA jsou v denuračním gelu separovány v jednořetězcové formě a dochází k rozvolnění potenciálních sekundárních struktur. Tato strategie se ukázala jako výhodná a nezbytná pro správné posouzení polymorfismů multialelického lokusu *DRD4*. Na obrázku 15 je uveden vzorový elektroforeogram tohoto způsobu identifikace alel.

Obrázek 15: Elektroforeogram separace PCR amplikonu markeru exonu 3 genu *DRD4* na sekvenční cele v polyakrylamidovém gelu



Pro odlišení alely *447a* a *447b* byla použita další PCR amplifikace při použití jiného R- primeru. Vzorový elektroforeogram je prezentován na obrázku 16.

Obrázek 16: Elektroforeogram separace PCR ampliconů markeru exonu 3 genu *DRD4* na agarózovém gelu při použití primerů D4DogBR5A a D4F5A



Pro vyhodnocení vlivu jednotlivých alel markeru exonu 3 genu *DRD4* na chování jednotlivých zvířat bylo nutné zpracovat dotazník uvedený v kapitole Materiál a metody. Z celkového počtu 109 psů byli majitelé ochotni poskytnout hodnocení pouze 65 jedinců. Řada majitelů si nepřála zveřejnit konkrétní výsledné skóre svých psů. Z těchto důvodů budou v následující tabulce uvedeni jednotliví psi pod anonymními kódy.

Tabulka 12 – 1. část: Přehled analyzovaných genotypů a výsledných skóre ADHD dotazníku

Kód psa	Genotyp Exon 3 genu <i>DRD4</i>	Skóre pro nepozornost	Skóre pro aktivitu-impulzivitu
BC001	435/498	2	1
BC002	435/498	X	X
BC003	435/447a	12	12
BC004	435/447a	10	11
BC005	435/447a	9	6
BC006	435/447a	7	7
BC007	435/447a	6	5
BC008	435/447a	6	6

Tabulka 12 – 2. část: Přehled analyzovaných genotypů a výsledných skóre ADHD dotazníku

<b>Kód psa</b>	<b>Genotyp Exon 3 genu DRD4</b>	<b>Skóre pro nepozornost</b>	<b>Skóre pro aktivitu-impulzivitu</b>
BC009	435/447a	6	8
BC010	435/447a	6	9
BC011	435/447a	6	3
BC012	435/447a	3	11
BC013	435/447a	3	4
BC014	435/447a	2	3
BC015	435/447a	2	2
BC016	435/447a	2	9
BC017	435/447a	1	3
BC018	435/447a	0	8
BC019	435/447a	X	X
BC020	435/447a	X	X
BC021	435/447a	X	X
BC022	435/447a	X	X
BC023	435/447a	X	X
BC024	435/447a	X	X
BC025	435/447a	X	X
BC026	435/447a	X	X
BC027	435/447a	X	X
BC028	435/447a	X	X
BC029	435/447b	X	X
BC030	435/447b	X	X
BC031	447a/447a	16	15
BC032	447a/447a	11	14
BC033	447a/447a	11	12
BC034	447a/447a	9	10
BC035	447a/447a	9	15
BC036	447a/447a	8	7
BC037	447a/447a	8	9
BC038	447a/447a	7	11
BC039	447a/447a	7	9
BC040	447a/447a	7	0
BC041	447a/447a	6	9
BC042	447a/447a	6	8
BC043	447a/447a	5	3
BC044	447a/447a	5	1
BC045	447a/447a	5	9
BC046	447a/447a	5	1
BC047	447a/447a	5	6
BC048	447a/447a	4	6

Tabulka 12 – 3. část: Přehled analyzovaných genotypů a výsledných skóre ADHD dotazníku

<b>Kód psa</b>	<b>Genotyp Exon 3 genu DRD4</b>	<b>Skóre pro nepozornost</b>	<b>Skóre pro aktivitu-impulzivitu</b>
BC049	447a/447a	4	14
BC050	447a/447a	4	9
BC051	447a/447a	4	4
BC052	447a/447a	4	7
BC053	447a/447a	3	7
BC054	447a/447a	3	9
BC055	447a/447a	3	7
BC056	447a/447a	3	5
BC057	447a/447a	2	5
BC058	447a/447a	2	5
BC059	447a/447a	2	4
BC060	447a/447a	2	6
BC061	447a/447a	2	7
BC062	447a/447a	2	5
BC063	447a/447a	1	3
BC064	447a/447a	1	3
BC065	447a/447a	1	10
BC066	447a/447a	1	5
BC067	447a/447a	1	9
BC068	447a/447a	0	4
BC069	447a/447a	0	0
BC070	447a/447a	X	X
BC071	447a/447a	X	X
BC072	447a/447a	X	X
BC073	447a/447a	X	X
BC074	447a/447a	X	X
BC075	447a/447a	X	X
BC076	447a/447a	X	X
BC077	447a/447a	X	X
BC078	447a/447a	X	X
BC079	447a/447a	X	X
BC080	447a/447a	X	X
BC081	447a/447a	X	X
BC082	447a/447a	X	X
BC083	447a/447a	X	X
BC084	447a/447a	X	X
BC085	447a/447a	X	X
BC086	447a/447a	X	X
BC087	447a/447a	X	X
BC088	447a/447a	X	X

Tabulka 12 – 4. část: Přehled analyzovaných genotypů a výsledných skóre ADHD dotazníku

Kód psa	Genotyp Exon 3 genu <i>DRD4</i>	Skóre pro nepozornost	Skóre pro aktivitu-impulzivitu
BC089	447a/447a	X	X
BC090	447a/447b	9	6
BC091	447a/447b	8	8
BC092	447a/447b	6	6
BC093	447a/447b	2	3
BC094	447a/486	X	X
BC095	447a/498	15	21
BC096	447a/498	X	X
BC097	447a/498	X	X
BC098	447a/498	X	X
BC099	447a/498	X	X
BC100	447a/498	X	X
BC101	447b/447b	2	9
BC102	447b/486	X	X
BC103	447b/498	0	0
BC104	447b/498	0	10
BC105	447b/498	0	5
BC106	447b/498	X	X
BC107	447b/498	X	X
BC108	447b/498	X	X
BC109	447b/498	X	X

X= u daného jedince se nepodařilo získat vyplněný dotazník

V rámci všech hodnocených bearded kolií bylo detekováno celkem 5 alel. U žádného z jedinců s alelou 486 se nepodařilo získat vyplněný dotazník. Terminologie označování alel podle jejich velikosti je převzata z práce Ito *et al.* (2004). Získaná data byla zpracována z hlediska populační genetiky programem TFPGA. Výsledky hodnocení jsou prezentovány v tabulce 13, která je rozdělena na dvě části – na skupinu psů s vyhodnoceným dotazníkem a na všechny psy hodnocené molekulárním markerem. Vzhledem k tomu, že tyto dvě skupiny (V a Q) jsou pouze odrazem ochoty majitelů poskytnout potřebné údaje, nelze z rozdílů frekvencí alel a heterozygotností vyvozovat žádné závěry. Pro posouzení variability plemene z hlediska tohoto markeru jsou směrodatnější údaje plynoucí z hodnocení všech zvířat. Pozorovaná heterozygotnost byla velice blízká očekávané hodnotě, jež by nastala při platnosti Hardy-Weinbergova zákona.

Tabulka 13: Relativní frekvence alel a heterozygotnost markeru exonu 3 genu *DRD4* u sledovaných jedinců plemene bearded kolie

Skupina	n	Frekvence alel					$H_E$	$H_O$
		435	447a	447b	486	498		
V	109	0,1376	0,7110	0,0734	0,0092	0,0688	0,4675	0,4495
Q	65	0,1308	0,7615	0,0692	0,0000	0,0385	0,3967	0,3846

n = počet genotypovaných jedinců,  
V = všichni sledovaní jedinci, Q = jedinci s vyplněným ADHD dotazníkem,  
 $H_E$  = očekávaná heterozygotnost,  $H_O$  = pozorovaná heterozygotnost

#### 5.4.2 Hodnocení ADHD dotazníku

Ke zpracování se podařilo získat 65 vyplněných dotazníků (60 %). Skóre pro nepozornost a aktivitu-impulzivitu bylo vypočítáno u 33 fen a 32 psů s průměrným věkem 4 roky a 11 měsíců. Všichni sledovaní psi žijí v domácnosti svých majitelů. Tabulka 14 charakterizuje výsledná skóre obou psychických vlastností.

Tabulka 14: Výsledné skóre pro nepozornost a aktivitu-impulzivitu a získané pomocí ADHD dotazníku

Parametr	Skóre pro nepozornost	Skóre pro aktivitu-impulzivitu
$x_{\min}$	0	0
$x_{\max}$	16	21
$\bar{x}$	4,678	6,908
s	3,662	4,057
$V_k$ [%]	78,298	58,733

$x_{\min}$  = nejnižší získané skóre,  $x_{\max}$  = nejvyšší získané skóre,  $\bar{x}$  = aritmetický průměr,  
s = směrodatná odchylka,  $V_k$  = variační koeficient

#### 5.4.3 Vztah mezi stupněm nepozornosti a polymorfismem markeru exonu 3 genu *DRD4*

##### A. Kategorizace hodnocených psů podle stupně nepozornosti

Podle výsledného skóre pro nepozornost byli jedinci rozděleni do třech skupin (A, B a C). Pro hlubší analýzu byla vytvořena skupina D vzniklá sjednocením skupin A a B a skupina E sloučením skupin A a B. Tabulka 15 popisuje relativní frekvenci alel a hodnoty očekávaných a pozorovaných heterozygotností. Tyto údaje lze chápat pouze jako charakteristiky uměle vytvořených skupin A až E. Nelze na ně pohlížet jako na subpopulace plemene, protože k plemenitbě jsou používáni psi bez ohledu na příslušnost ke skupinám. Z těchto důvodů nemělo smysl získané koeficienty heterozygotnosti detailněji porovnávat.

Pro následující statistické analýzy byly použity frekvence alel. Vlastní statistické zpracování bude uvedeno v následující části diplomové práce.

Tabulka 15: Porovnání relativních frekvencí alel a heterozygotnosti markeru exonu 3 genu *DRD4* u jednotlivých skupin stanovených na základě hodnoty skóre pro nepozornost

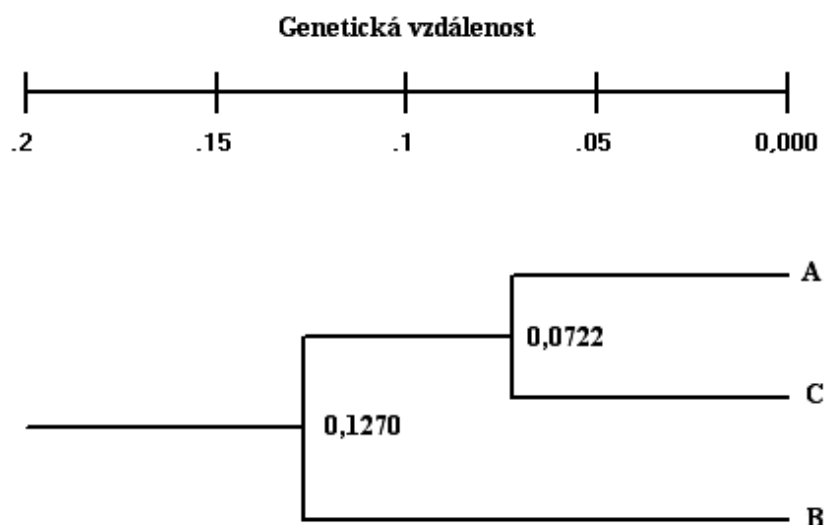
NEPOZORNOST								
Skupina	Skóre	n	Frekvence alel				$H_E$	$H_O$
			435	447a	447b	498		
A	<0; 2>	24	0,1250	0,6667	0,1250	0,0833	0,5284	0,4167
B	<3; 8>	32	0,1250	0,8438	0,0313	0,0000	0,2758	0,3125
C	<9; 18>	9	0,1667	0,7222	0,0556	0,0556	0,4706	0,5556
D (B+C)	<3; 18>	41	0,1341	0,8171	0,0366	0,0122	0,3168	0,3659
E (A+B)	<0; 8>	56	0,1250	0,7679	0,0714	0,0357	0,3919	0,3571

n = počet genotypovaných jedinců,  
 $H_E$  = očekávaná heterozygotnost,  $H_O$  = pozorovaná heterozygotnost

#### B. Populační analýza markeru z pohledu stupně nepozornosti

Pomocí programu TFPGA byla zpracována shluková analýza UPGMA s vyhodnocením na principu koeficientu podle Rogerse (1972). Výsledky této analýzy jsou prezentovány v grafu 3. Číselné koeficienty uvedené u uzlů kladogramu vyjadřují genetickou vzdálenost mezi uměle vytvořenými skupinami bearded kolií podle hodnocení jejich nepozornosti.

Graf 3: Kladogram UPGMA analýzy markeru exonu 3 genu *DRD4* pro nepozornost





Z kladogramu vyplývá, že minimální genetická vzdálenost (0,0722) byla zjištěna mezi skupinami jedinců A a C, u nichž na základě dotazníků byly zjištěny maximální rozdíly ve stupni nepozornosti.

C. Hodnocení vlivu frekvence skutečných genotypů a alel na zařazení jedinců do kategorií podle stupně nepozornosti

Distribuce genotypů v jednotlivých skupinách byla porovnána  $\chi^2$ -testem. Tabulka 16 podává souhrnný přehled o výsledcích neparametrického  $\chi^2$ -testu při porovnávání skupin zvířat blíže charakterizovaných v tabulce 15. Pro analýzy byly použity všechny alely včetně alel s minoritním výskytem.

Tabulka 16: Porovnání distribucí genotypů markeru exonu 3 genu *DRD4*  $\chi^2$ -testem v závislosti na skupinách stanovených na základě hodnoty skóre pro nepozornost

<b>A</b>	-	-	-
<b>B</b>	$\chi^2 = 7,347$ P = 0,19610	-	-
<b>C</b>	$\chi^2 = 5,604$ P = 0,46893	$\chi^2 = 4,619$ P = 0,20196	-
<b>D (B+C)</b>	$\chi^2 = 9,808$ P = 0,13298	-	-
<b>E (A+B)</b>	-	-	$\chi^2 = 8,187$ P = 0,22475
<b>Skupiny</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>

Z tabulky 16 jednoznačně vyplývá, že na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v zastoupení jednotlivých genotypů ani u jedné z dvojice porovnávaných skupin. Pokud se v této tabulce zaměříme na pravděpodobnosti, které vyjadřují stupeň shody frekvencí genotypů mezi skupinami, potom nejnižší pravděpodobnost (P = 0,13298) byla zjištěna mezi skupinou A a skupinou D. Při porovnávání skupiny A a C je patrná největší podobnost (P = 0,46893). Tento výsledek plně koresponduje s populační studií zpracovanou programem TFPGA, která je prezentována kladogramem uvedeným v grafu 3.

Distribuce alel v jednotlivých skupinách byly také porovnány  $\chi^2$ -testem. Tabulka 17 podává souhrnný přehled o výsledcích neparametrického  $\chi^2$ -testu při porovnávání skupin zvířat blíže charakterizovaných v tabulce 15.

Tabulka 17: Porovnání distribucí alel markeru exonu 3 genu *DRD4*  $\chi^2$ -testem v závislosti na skupinách stanovených na základě hodnoty skóre pro nepozornost

<b>A</b>	-	-	-
<b>B</b>	$\chi^2 = 9,828^*$ P = 0,02009	-	-
<b>C</b>	$\chi^2 = 0,954$ P = 0,81226	$\chi^2 = 4,218$ P = 0,23886	-
<b>D (B+C)</b>	$\chi^2 = 8,3218^*$ P = 0,03982	-	-
<b>E (A+B)</b>	-	-	$\chi^2 = 0,443$ P = 0,92684
Skupiny	A	B	C

Z tabulky 17 je zřejmé, že byly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  zjištěny statisticky významné rozdíly v zastoupení jednotlivých alel mezi skupinami A a B, stejně tak jako mezi skupinami A a D. Očekávané rozdíly mezi skupinami A a C, které se maximálně lišily z hlediska výsledků dotazníku, nebyly na alelické úrovni potvrzeny. Pravděpodobnost shody poměrných zastoupení alel mezi skupinami A a C dosáhla hodnoty P = 0,81226. Tento výsledek rovněž odpovídá prvotní populační analýze, kde podobnost vyjádřena kladogramem byla rovněž nejvyšší mezi skupinami A a C.

**D. Hodnocení vlivu poměru alely 447a ku ostatním alelám na zařazení jedinců do kategorií podle stupně nepozornosti**

Hejjas *et al.* (2007b) zjistili statisticky významný vliv alely 3a, které odpovídá alela 447a, na stupeň aktivity a impulzivitu německých ovčáků. Z těchto důvodů byla získaná data kategorizována tak, aby mohl být ověřen vliv poměrného zastoupení alely 447a vůči ostatním alelám na chování psů. Frekvence alel zpracovaných podle tohoto schématu jsou uvedeny v tabulce 18.

Tabulka 18: Porovnání relativních frekvencí alely 447a exonu 3 genu DRD4 ku ostatním alelám u jednotlivých skupin stanovených na základě hodnoty skóre pro nepozornost

NEPOZORNOST				
Skupina	Skóre	n	Frekvence alel	
			447a	ostatní alely
A	<0; 2>	24	0,6667	0,3333
B	<3; 8>	32	0,8438	0,1563
C	<9; 18>	9	0,7222	0,2778
D (B+C)	<3; 18>	41	0,8171	0,1829
E (A+B)	<0; 8>	56	0,7679	0,2321

n = počet genotypovaných jedinců

V tabulce 19 jsou sumarizovány výsledky statistického hodnocení  $\chi^2$  testem.

Tabulka 19: Porovnání distribuce alely 447a exonu 3 genu DRD4 ku ostatním alelám  $\chi^2$ -testem v závislosti na skupinách stanovených na základě hodnoty skóre pro nepozornost.

A	-	-	-
B	$\chi^2 = 4,825^*$ P = 0,02805	-	-
C	$\chi^2 = 0,186$ P = 0,66603	$\chi^2 = 1,388$ P = 0,23871	-
D (B+C)	$\chi^2 = 3,772$ P = 0,05213	-	-
E (A+B)	-	-	$\chi^2 = 0,178$ P = 0,67324
Skupiny	A	B	C

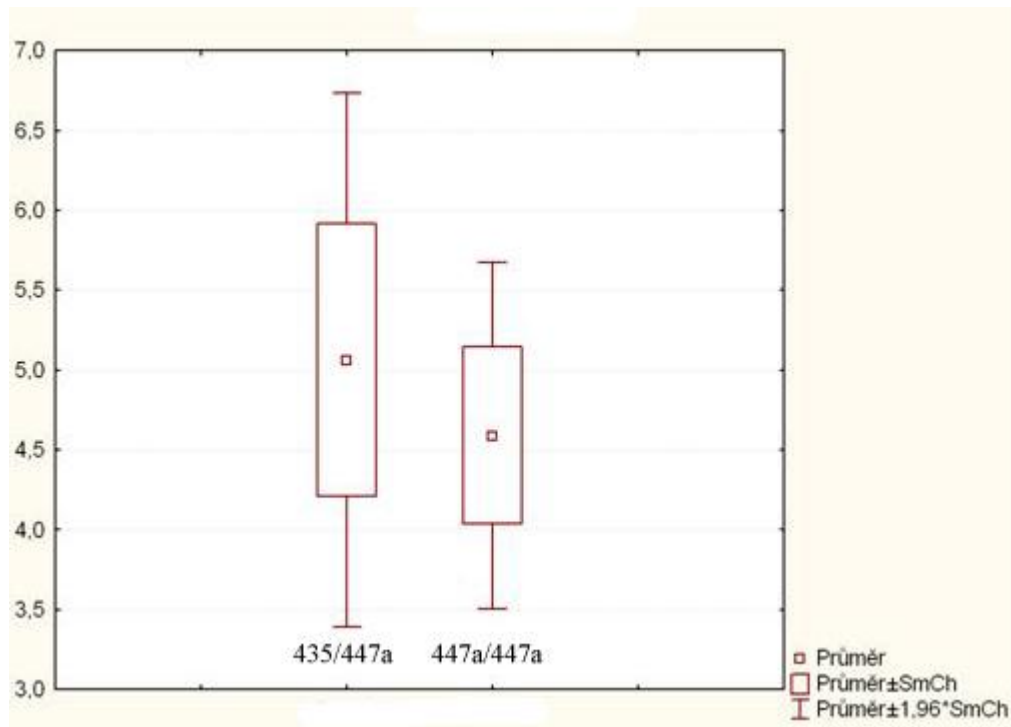
V této analýze byly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  zjištěny statisticky významné rozdíly v zastoupení pouze mezi skupinami A a B. Skupiny A a B však nepředstavovaly extrémní rozdíly v nepozornosti.

E. Hodnocení rozdílů v průměrné hodnotě výsledného skóre pro nepozornost mezi genotypy 435/447a a 447a/447a

Během řešení diplomové práce byla také provedena statistická analýza pomocí dvouvýběrového t-testu, který rovněž použili Hejjas *et al.* (2007b). Pro tuto analýzu byly vybrány genotypy vykazující vyšší četnost než 15 jedinců. Z tabulky 12 vyplývá, že tuto námi stanovenou podmínku splnily genotypy 435/447a (16 psů) a 447a/447a (39 psů). Ostatní kombinace alel byly zastoupeny v minoritních počtech, a proto nebyly pro analýzy použity. Průměrné skóre pro nepozornost u genotypu 435/447a bylo 5,0625 a u genotypu 447a/447a dosahovalo hodnoty 4,5897. Pomocí programu Statistica 8 CZ byl zpracován dvouvýběrový

t-test, ve kterém se hodnota testovacího kritéria rovnala  $t = 0,4617$ . Lze tudíž konstatovat, že rozdíly mezi průměry skóre pro nepozornost genotypů *435/447a* a *447a/447a* nejsou na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  statisticky významné. Výsledek statistické analýzy dokumentuje rovněž graf 4.

Graf 4: Krabicový graf vyjadřující rozdíly mezi průměrným skórem pro nepozornost u genotypů *435/447a* a *447a/447a*



#### 5.4.4 Vztah mezi stupněm aktivity-impulzivity a polymorfismem markeru exonu 3 genu *DRD4*

##### A. Kategorizace hodnocených psů podle stupně nepozornosti

Na základě výsledného skóre pro aktivitu-impulzivitu byli jedinci rozděleni také do třech skupin (A, B a C). Pro detailnější analýzu byla opět vytvořena skupina D vzniklá sjednocením skupin A a B a skupina E sloučením skupin A a B. V tabulce 20 jsou stejně jako u hodnocení aktivity uvedeny relativní frekvence alel i pozorované a očekávané heterozgotnosti. Rovněž i v tomto případě je nutné na získané koeficienty pohlížet pouze jako na hodnoty charakterizující uměle vytvořené skupiny psů. Skupiny A až E nelze z hlediska genetiky považovat za populace či subpopulace.

Tabulka 20: Porovnání frekvencí alel a heterozygotnosti markeru exonu 3 genu *DRD4* u jednotlivých skupin stanovených na základě hodnoty skóre pro aktivitu-impulzivitu

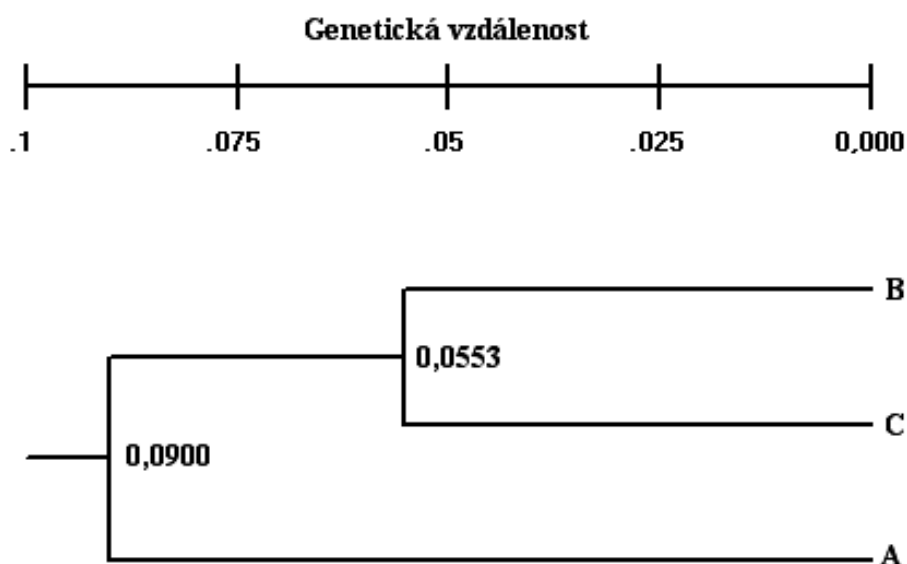
AKTIVITA-IMPULZIVITA								
Skupina	Skóre	n	Frekvence alel				H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>
			435	447a	447b	498		
A	<0; 3>	14	0,1786	0,6786	0,0714	0,0714	0,5159	0,5000
B	<4; 9>	38	0,1184	0,7895	0,0789	0,0132	0,3611	0,3421
C	<10; 21>	13	0,1154	0,7692	0,0385	0,0769	0,4031	0,3846
D (B+C)	<4; 21>	51	0,1176	0,7843	0,0686	0,0294	0,3691	0,3529
E (A+B)	<0; 9>	52	0,1346	0,7596	0,0769	0,0288	0,4020	0,3846

n = počet genotypovaných jedinců,  
H<sub>E</sub> = očekávaná heterozygotnost, H<sub>O</sub> = pozorovaná heterozygotnost

### B. Populační analýza markeru z pohledu stupně aktivity-impulzivity

Pomocí programu TFPGA byla zpracována shluková analýza UPGMA s vyhodnocením na principu koeficientu podle Rogerse (1972). Výsledky této analýzy jsou prezentovány v grafu 5. Číselné koeficienty uvedené u uzlů kladogramu vyjadřují genetickou vzdálenost mezi uměle vytvořenými skupinami bearded kolií podle hodnocení jejich aktivity-impulzivity

Graf 5: Kladogram UPGMA analýzy markeru exonu 3 genu *DRD4* pro aktivitu-impulzivitu



Z kladogramu vyplývá, že minimální genetická vzdálenost (0,0553) byla zjištěna mezi skupinami jedinců B a C. Z hlediska vyhodnocení dotazníku můžeme tyto dvě skupiny vyhodnotit jako více aktivní a impulzivní. Je třeba vzít v potaz absolutní hodnotu Rogersova koeficientu, který mezi skupinami B a C dosáhl hodnoty odpovídající 5,53% genetické vzdálenosti. Skupina se od skupin B a C lišila pouze na úrovni 9%. Tyto rozdíly nelze považovat za vysoké.

C. Hodnocení vlivu frekvence skutečných genotypů a alel na zařazení jedinců do kategorií podle stupně aktivity-impulzivity

Distribuce genotypů v jednotlivých skupinách byla porovnána  $\chi^2$ -testem. Tabulka 21 podává souhrný přehled o výsledcích neparametrického  $\chi^2$ -testu při porovnávání skupin zvířat blíže charakterizovaných v tabulce 21. Pro analýzy byly použity všechny alely včetně alel s minoritním výskytem.

Tabulka 21: Porovnání distribucí genotypů markeru exonu 3 genu *DRD4*  $\chi^2$ -testem v závislosti na skupinách stanovených na základě hodnoty skóre pro aktivitu-impulzivitu

<b>A</b>	-	-	-
<b>B</b>	$\chi^2 = 4,026$ P = 0,54562	-	-
<b>C</b>	$\chi^2 = 3,177$ P = 0,67274	$\chi^2 = 4,930$ P = 0,42453	-
<b>D (B+C)</b>	$\chi^2 = 4,878$ P = 0,55955	-	-
<b>E (A+B)</b>	-	-	$\chi^2 = 15,578$ P = 0,21138
<b>Skupiny</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>

Z tabulky 21 jednoznačně vyplývá, že na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v zastoupení jednotlivých genotypů ani u jedné z dvojice porovnávaných skupin. Překvapivým zjištěním bylo, že distribuce genotypů se nejvíce podobala (P = 0,67274) mezi skupinami A a C, které měly být teoreticky nejodlišnější.

Distribuce alel v jednotlivých skupinách byly také porovnány  $\chi^2$ -testem. Tabulka 22 podává souhrný přehled o výsledcích neparametrického  $\chi^2$ -testu při porovnávání skupin zvířat blíže charakterizovaných v tabulce 20.

Tabulka 22: Porovnání distribucí alel markeru exonu 3 genu *DRD4*  $\chi^2$ -testem v závislosti na skupinách stanovených na základě hodnoty skóre pro aktivitu-impulzivitu

<b>A</b>	-	-	-
<b>B</b>	$\chi^2 = 3,305$ P = 0,34698	-	-
<b>C</b>	$\chi^2 = 0,786$ P = 0,85282	$\chi^2 = 3,152$ P = 0,36871	-
<b>D (B+C)</b>	$\chi^2 = 1,957$ P = 0,58137	-	-
<b>E (A+B)</b>	-	-	$\chi^2 = 1,756$ P = 0,62460
<b>Skupiny</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>

Z tabulky 22 jednoznačně vyplývá, že na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v zastoupení jednotlivých alel ani u jedné z dvojice porovnávaných skupin. Statistické hodnocení zpracované na úrovni frekvence alel plně odpovídalo hodnocení na úrovni genotypů. Maximální podobnost v distribuci alel byla rovněž zjištěna mezi skupinami A a C (P = 0,85282), které vykazovaly největší rozdíly v aktivitě-impulzivě.

**D. Hodnocení vlivu poměru alely 447a ku ostatním alelám na zařazení jedinců do kategorií podle stupně aktivity-impulzivity**

Tento typ zpracování dat vycházel rovněž ze závěrů Hejjas *et al.* (2007b), kteří zjistili statisticky významný vliv alely 3a, resp. 447a, na stupeň aktivity a impulzivity německých ovčáků. Proto byla získaná data kategorizována tak, aby mohl být ověřen vliv poměrného zastoupení alely 447a vůči ostatním alelám na chování psů. Frekvence alel zpracovaných podle tohoto schématu jsou uvedeny v tabulce 23.

Tabulka 23: Porovnání frekvencí alely 447a exonu 3 genu *DRD4* ku ostatním alelám u jednotlivých skupin stanovených na základě hodnoty skóre pro aktivitu-impulzivitu

<b>AKTIVITA-IMPULZIVITA</b>				
<b>Skupina</b>	<b>Skóre</b>	<b>n</b>	<b>Frekvence alel</b>	
			<b>447a</b>	<b>ostatní alely</b>
<b>A</b>	<0; 3>	14	0,6786	0,3214
<b>B</b>	<4; 9>	38	0,7895	0,2105
<b>C</b>	<10; 21>	13	0,7692	0,2308
<b>D (B+C)</b>	<4; 21>	51	0,7843	0,2157
<b>E (A+B)</b>	<0; 9>	52	0,7596	0,2404

n = počet genotypovaných jedinců,

V tabulce 24 jsou sumarizovány výsledky statistického hodnocení  $\chi^2$ -testem.

Tabulka 24: Porovnání distribuce alely 447a exonu 3 genu *DRD4* ku ostatním alelám  $\chi^2$ -testem v závislosti na skupinách stanovených na základě hodnoty skóre pro aktivitu-impulzivitu

<b>A</b>	-	-	-
<b>B</b>	$\chi^2 = 1,378$ P = 0,24041	-	-
<b>C</b>	$\chi^2 = 0,552$ P = 0,45737	$\chi^2 = 0,047$ P = 0,82850	-
<b>D (B+C)</b>	$\chi^2 = 1,353$ P = 0,24481	-	-
<b>E (A+B)</b>	-	-	$\chi^2 = 0,011$ P = 0,91804
<b>Skupiny</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>

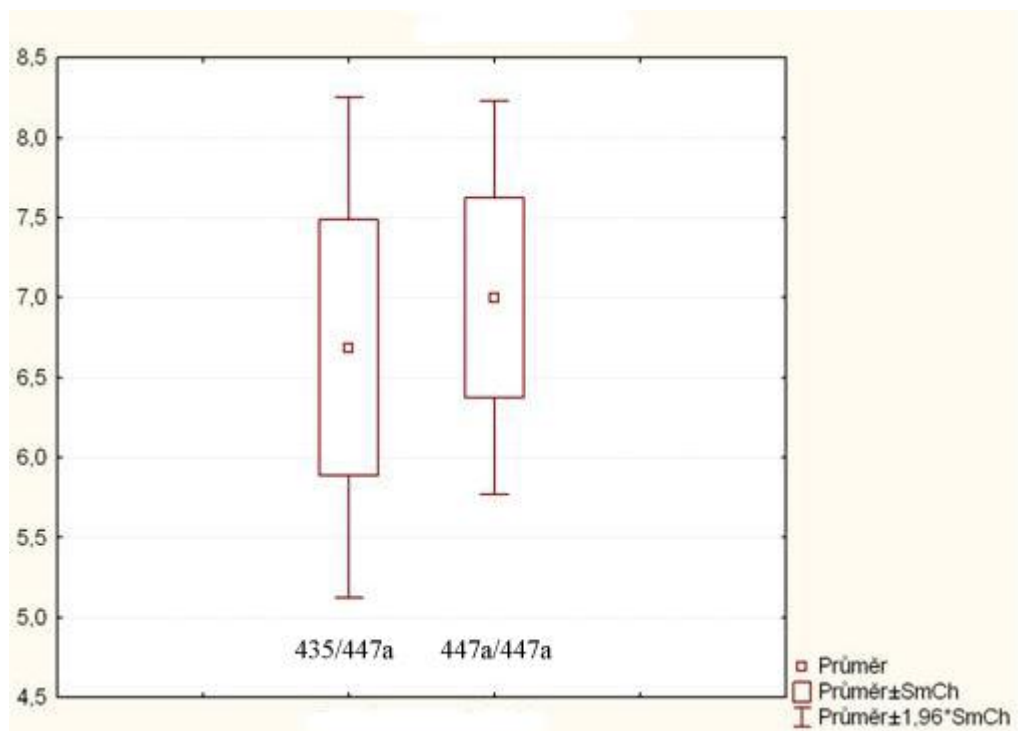
I při této analýze nebyly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  nalezeny statisticky významné rozdíly v zastoupení jednotlivých alel ani u jedné z dvojice porovnávaných skupin. Největší podobnost (P = 0,91804) byla zjištěna mezi distribucemi alel skupin E a C, které představují méně aktivní a výrazně aktivní psy.

E. Hodnocení rozdílů v průměrné hodnotě výsledného skóre pro aktivitu-impulzivitu mezi genotypy 435/447a a 447a/447a

Během řešení diplomové práce byla opět provedena statistická analýza pomocí dvouvýběrového t-testu, který použili Hejjas *et al.* (2007b). Pro tuto analýzu byly vybrány genotypy vykazující vyšší četnost než 15 jedinců, tj. genotypy 435/447a (16 psů) a 447a/447a (39 psů). Ostatní kombinace alel byly zastoupeny v minoritních počtech, a proto nebyly pro analýzy použity. Průměrné skóre pro aktivitu-impulzivitu u genotypu 435/447a bylo 6,6875 a pro genotypy 447a/447a dosahovalo hodnoty 7,0000. Pomocí programu Statistica 8 CZ byl zpracován dvouvýběrový t-test, ve kterém se hodnota testovacího kritéria rovnala  $t = -0,2826$ . I v tomto případě lze konstatovat, že rozdíly mezi průměry skóre pro aktivitu-impulzivitu genotypů 435/447a a 447a/447a nejsou na hladině významnosti  $\alpha=0,05$  statisticky významné. Výsledek statistické analýzy dokumentuje rovněž graf 5



Graf 5: Krabicový graf vyjadřující rozdíly mezi průměrným skórem pro aktivitu-impulzivitu u genotypů *435/447a* a *447a/447a*



## 6. DISKUSE

### 6.1 Počet hodnocených zvířat

Pro správné hodnocení variability molekulárních markerů je zásadní, aby se podařilo získat dostatečný počet vzorků DNA reprezentativních pro cílovou populaci. V případě psů se může jednat o nelehký úkol. Komplikace plynou především z neochoty majitelů poskytnout vzorek svého psa z nejrůznějších důvodů. Mezi obavy chovatelů patří například možnost zneužití vzorku. Dále se jedná o strach z poškození dobrého jména chovatelské stanice či konkrétního chovného jedince. Tomu lze zabránit prezentací výsledků anonymní formou. Počet zpracovaných vzorků je také limitován finančními možnostmi řešitele a časovou náročností projektu.

V práci Schmutz *et al.* (2002), kteří se zabývali efekty genů *TYRP1* a *MC1R* na výsledné zbarvení srsti psů, bylo hodnoceno celkem sto jedinců 29 různých plemen psů. Při studii mutace genu *CBD103* způsobujícího dominantně černé zbarvení srsti vyhodnotili Candille *et al.* (2007) vzorky pocházející od 454 psů 38 plemen.

Při porovnávání polymorfismu exonu III genu *DRD4* u čtyř plemen psů bylo genotypováno 38 bíglů, 30 zlatých retrívrů, 40 šeltií a 28 jedinců plemene shiba (Niimi, 2001). Ito *et al.* (2004) analyzovali v obdobné studii vzorky pocházející od 1535 příslušníků 23 různých plemen psů. Nejvíce zastoupeným plemenem bylo plemeno shiba se 192 jedinci. Hejjas *et al.* (2007b) se zaměřili na studium variability exonu 3 genu *DRD4* v rámci jednoho plemene. Zvolili plemeno německý ovčák, jehož chov je po celém světě velmi rozšířen, a vyhodnotili soubor 241 jedinců.

Variabilita plemene bearded kolie nebyla doposud pomocí výše uvedených molekulárních markerů zkoumána. Díky osobním kontaktům s představiteli chovatelských klubů i jednotlivými chovateli se pro řešení této diplomové práce podařilo získat kolekci celkem 109 vzorků od zástupců plemene bearded kolie pocházejících z různých evropských zemí (Česká Republika, Slovensko, Německo, Rakousko, Polsko, Francie, Švýcarsko a Velká Británie).

Pro hodnocení vztahu mezi polymorfismem markeru exonu 3 genu *DRD4* a psychickými vlastnostmi psů bylo třeba získat majitelem vyplněný ADHD dotazník, což se podařilo u 65 jedinců (60 %). Hejjas *et al.* (2007b) měli k dispozici tato data o 189 německých ovčácích z celkového počtu 241 (78%).

## 6.2 Izolace DNA

Pro odběr vzorků DNA byla vybrána metoda stěru buněk z bukální sliznice psů pomocí sterilního cytologického kartáčku. Tato metoda je zcela neinvazivní a nevyžaduje asistenci veterinárního lékaře. Tento způsob odběru vyžaduje ovladatelnost a dobrou socializaci zvířat. Standard plemene popisuje bearded kolii jako spolehlivého pracovního psa, bez známek nervozity nebo agresivity, což se v praxi potvrdilo. Naprostá většina zvířat snášela proceduru bez problémů. Sběr vzorků byl prováděn většinou na výstavách psů, kde musí být předvádění jedinci zvyklí na kontrolu chrupu rozhodčím. Často tedy nebyla nutná ani asistence majitele při držení psa. Další podmínkou bylo zamezit zvířeti alespoň dvě hodiny před odběrem přijímat potravu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. Podle Oberbauer *et al.* (2003) může být DNA izolovaná z cytologických kartáčů skladována při  $-20^{\circ}\text{C}$  po dobu mnoha let a každý kartáček poskytuje množství DNA potřebné na více než 200 PCR reakcí.

Jinou vhodnou metodou, která by připadala v úvahu, je izolace DNA z chlupových cibulek. Odběr chlupů by měl být teoreticky jednodušší zejména u méně krotkých zvířat. U bearded kolií je však tento postup obtížný, protože se chlupy snadno přetrhnou nebo se podaří získat jen vylínalou srst. V obou případech neobsahuje srst potřebnou chlupovou cibulkou. Výťažnost získané DNA je oproti předchozímu postupu malá.

Největší výtěžnosti se dosahuje při izolaci DNA ze vzorků krve. Odběr však smí provádět pouze veterinární lékař a jde o invazivní metodu, která může psa i jeho majitele stresovat. Navíc musí nejprve dojít k oholení srsti v místě vpichu jehly, což nepřichází u výstavních jedinců v úvahu. V úvahu by přicházelo využít část krve původně odebrané k diagnostickým účelům.

Hejjas *et al.* (2007b) izolovali DNA pouze z buněk bukální sliznice získaných stěrem pomocí cytologického kartáčku. Ito *et al.* (2004) a Niimi *et al.* (2004) využili vzorky jak buněk bukální sliznice, tak i vzorky krve. Schmutz *et al.* (2002) navíc připravili cDNA ze vzorků kůže odebrané biopsií. Oberbauer *et al.* (2003) ověřovali možnost využití odstřižených kusů drápů a zjistili, že poskytují množství DNA dostatečné pro tisíce PCR reakcí a navíc se původní tkáň snadno skladuje.

Pro vlastní izolaci genomické DNA byl použit kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, SRN) s postupem doporučeným výrobcem. Tato metoda je poměrně rychlá a DNA získaná tímto způsobem byla použitelná pro následující PCR analýzy a vykazovala výborné parametry kvality i kvantity, což je patrné z elektroforeogramu na obrázku 5 v kapitole

Výsledky. Navíc zaručuje na rozdíl od tradiční fenol-chloroformové purifikační metody sterilitu a stabilní složení použitých roztoků.

Ito *et al.* (2004) použili kit QIAamp (Quiagen, USA). Hejjas *et al.* (2007b) izolovali DNA pomocí kitu Genra DNA Purification kit. Schmutz *et al.* (2002) a Niimi *et al.* (2004) způsob izolace DNA neuvádějí. Fenol-chloroformovou purifikační metodu použili pro izolaci DNA z části tkání vlků a kojetů Vilá *et al.* (1999).

### 6.3 Genetika zbarvení srsti u bearded kolií

Zbarvení srsti je významnou součástí exteriéru psa. Jak už bylo výše zmíněno, výzkumem jednotlivých barevných variant srsti bearded kolií se na molekulární úrovni doposud nikdo nezabýval. Standard plemene povoluje v podstatě libovolný odstín černé nebo hnědé barvy srsti s bílými znaky v daném rozsahu, přičemž pigmentace pysků, okrajů víček a nosní houby má odpovídat barvě srsti. Dále se mohou na obočí, vnitřní straně uší, na lících, pod kořenem ocasu a na končetinách objevovat tríslově zbarvené znaky (pálení). Většinou jsou takto zbarvení jedinci označováni jako trikolorní, evidence této barvy je však nedůsledná, do plemenné knihy se často zapisuje pouze barva základní, tj. černobílá, hnědobílá, modrobílá a plavobílá.

Zmínky o možném způsobu dědičnosti zbarvení konkrétně u tohoto plemene se objevují v několika pramenech. Autoři se většinou shodují, že za hnědobílé zbarvení s hnědýmnosem je u bearded kolií zodpovědná recesivní alela *b* v homozygotní sestavě (Willis, 1989; Collis a Jones, 1992; Moorhouse, 1993; Rieseberg a McKinney, 1997) a že u plemene existuje gen často označovaný písmenem *G*, jehož dominantní alela způsobuje postupné světlání srsti. Barevný odstín recesivních homozygotů *gg* zůstává po celý život stejný (Willis, 1989; Isabell, 2002). Sporným bodem je především plavobílé zbarvení srsti. Willis (1989) a Isabell (2002) tvrdí, že plavá barva může být způsobena buď alelou *a<sup>y</sup>* lokusu *agouti* nebo alelou *e* lokusu *extension*. Willis (1989) se spíše přiklání k první variantě (*a<sup>y</sup>*) s odkazem na původ plemene. Podle autorů majících zkušenost s chovem bearded kolií vzniká plavé zbarvení zředěním hnědé (Collis a Jones, 1992; Moorhouse, 1993; Rieseberg a McKinney, 1997). Zředění je řízené recesivní alelou *d* lokusu *dilution* stejným způsobem, jakým vzniká z černé srsti modrá (Rieseberg a McKinney, 1997).

Černobílá barva srsti je u bearded kolií nejčastější a údaje o barvách narozených štěňat svědčí o monogenně dominantním způsobu dědičnosti. Na rozdíl od jiných druhů zvířat je u psů dominantní dědičnost černého zbarvení řízena na molekulární úrovni jinak než mutací

genu *MC1R*. Pravou příčinou je mutace genu *CBD103* kódujícího protein beta-defensin 103 způsobující delecí glycinu ( $\Delta G23$ ) v druhém exonu (Candille *et al.*, 2007).

Jedním z cílů této diplomové práce bylo potvrdit hypotézu, že je zbarvení u bearded kolií kontrolováno právě tímto mechanismem. Z výsledků je patrné, že až na jednu výjimku, se u hodnocených jedinců všech barev nachází vždy homozygotní sestava alel genu *CBD103* s delecí tripletu kódující glycin. Pes, u kterého nebyla v genu *CBD103* detekována delece glycinu, vykazuje hnědé zbarvení s pálením. Podle Schmutz a Berryere (2007) závisí barva psů s genotypem  $k^y/k^y$  na jejich *ASIP* genotypu, tudíž by měl být tento jedinec homozygotní pro alelu  $a^l$  způsobující eumelanistické (černé, hnědé, modré nebo plavé) zbarvení s pálením. V kódující sekvenci genu *ASIP* nebyla dosud zjištěna žádná mutace způsobující tento fenotyp. Předpokládaná alela se tedy pravděpodobně liší v jedné z oblastí promotoru. Dalším možným vysvětlením je, že je v genu *CBD103* u tohoto jedince přítomný jiný typ mutace, který nebyl zvolenou technikou detekován a tato mutace má stejný efekt – změněnou funkci *beta-defensinu 103*.

Mezi hodnocenými jedinci se však nacházeli i tři černobílí s pálením, u nichž delece glycinu v genu *CBD103* nalezena byla. Je tedy možné, že u tohoto plemene existuje ještě další mechanismus kontrolující pálení. Tento znak se velice těžko v populaci sleduje, protože je jeho evidence nedůsledná. Navíc není pálení v dospělosti většinou patrné. Zmíněný hnědobílý pes s pálením byl dosud použit v chovu dvakrát a je otcem štěňat v černobílé, hnědobílé a plavobílé barvě bez pálení. Z černobílých jedinců s pálením byl v chovu použit pouze jeden pes, který je otcem 30 štěňat všech barev opět bez pálení. Štěňata pocházejí od pěti různých fen. Z těchto dat je možné usoudit, že v obou případech jde o recesivní způsob dědičnosti.

Zmutovaný protein beta-defensin 103 se váže na receptor *MC1R* a brání tím působení agouti proteinu. Melanocyty proto produkují pouze černý nebo hnědý eumelanin a nedochází k tvorbě žlutého feomelaninu. Tento fakt odporuje teorii Willise (1989) a Isabell (2002), kteří se domnívají, že je plavá barva řízena alelou  $a^y$  lokusu agouti. V rámci výzkumu Katedry genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU byla optimalizována rovněž detekce alely *e* na molekulární úrovni. Pro tyto experimenty byla použita plemena psů s typicky červenou barvou srsti (irský setr, pudl apricot). Hodnoceny byly i hnědé a plavé bearded kolie, alela *e* u nich však zjištěna nebyla. Vzhledem k tomu, že detekce alely *e* nebyla součástí řešení mé diplomové práce, uvádím toto zjištění pouze jakou doplňující součástí diskuse. Nejpravděpodobnější se tedy zdá

být kontrola plavého zbarvení pomocí alely *d* lokusu *dilution* způsobující řídké rozvrstvení hnědých granulí pigmentu.

Drögemüller *et al.* (2007) objevili mutaci v nekódujícím exonu 1 genu pro *melanophilin* (*MLPH*) vykazující asociaci se zředěným zbarvením u sedmi různých plemen psů. Bearded kolie nebyly v rámci této studie zkoumány, a tak není dosud jasné, zda se tato mutace podílí na vzniku plavobílého a modrobílého zbarvení i u nich.

Ve své práci jsem se dále zaměřila na hodnocení polymorfismu genu *TYRP1* v populaci bearded kolií. Schmutz *et al.* (2002) popisují tři různé alely *TYRP1*. Alela *b<sup>s</sup>* obsahuje předčasný stop kodón v exonu 5, u alely *b<sup>d</sup>* došlo k delecí jednoho prolinového zbytku rovněž v exonu 5 a u alely *b<sup>c</sup>* k jednonukleotidové substituci v exonu 2 způsobující záměnu aminokyseliny. Uvádějí, že jakákoliv kombinace dvou těchto alel je příčinou hnědě zbarvené srsti. Vyzorovali totiž, že se u žádného z černých psů, jejichž DNA analyzovali, neobjevovala více než jedna ze zmíněných mutací v heterozygotním stavu. Z toho usuzují, že pokud jsou v genu *TYRP1* u jedince přítomné dvě různé mutace, vyskytují se většinou každá na jiném homologním chromozómu.

Do mého souboru bearded kolií ale patřilo celkem deset černobílých nebo modrobílých jedinců heterozygotních ve dvou hodnocených polymorfních místech. Tyto mutace u nich musí tedy být umístěny na jednom z dvojice homologních chromozómů. Lokalizaci mutací z tohoto pohledu však nebylo možné zvoleným metodickým postupem prokázat. Jedince s černou nebo modrou barvou srsti, který by měl ve svém genomu všechny tři známé mutace genu *TYRP1* umístěné pravděpodobně na jednom z homologních chromozómů, se detekovat nepodařilo. Pro vznik jedince s hnědým zbarvením je tedy nutné, aby alespoň jedna z mutací proběhla na obou homologních chromozómech.

U plemene bearded kolie jsou dle mých výsledků přítomny všechny tři známé alely způsobující hnědé zbarvení. Nejčastěji byla hnědá barva srsti způsobena alelou *b<sup>s</sup>*. U některých jiných plemen, kde jsou hnědí jedinci běžní, se přítomnost všech tří alel prokázat nepodařila (Schmutz *et al.*, 2002).

V České republice bylo až do roku 2005 chovatelským řádem přesně dáno, které barvy bylo možné mezi sebou křížit a které ne. Černá barva se mohla kombinovat se všemi ostatními, hnědá se všemi barvami kromě plavé a modrá pouze s černou nebo hnědou. Plavý jedinec se mohl použít pouze ve spojení s černým. V současné době tato pravidla již neplatí a mohou se uskutečňovat spojení v libovolné kombinaci barev, stejně tak jako v ostatních zemích světa.

Chovatelé po celém světě ale často vyhledávají určitá spojení z pohledu barev více než jiná. Vazdová (2003) uvádí, že v České republice byly mezi lety 1981-2000 nejvíce v rodičovských párech zastoupeny černobílé matky (55,7 %) a černobílí otcové (64,7 %). Hnědí jedinci se využívali podstatně méně (18,5 % matek a 24,6 % otců) a nejméně potomků měly plavobílé bearded kolie, představovaly pouhé 3,2 % matek a 1,6 % otců. Z celkového počtu narozených štěnat za toto období tvořila černá barva 59,5%, hnědá 23,2%, modrá 12,9% a plavá 4,4%. Příčin upřednostňování konkrétních barev nad jinými může být hned několik. Ve výstavním kruhu je nejžádanější barva černobílá (Collis a Jones, 1992; Vazdová 2003). Plavé bearded kolie se vystavují pouze zřídka. Svědčí o tom i fakt, že v celé historii plemene byl v zemi původu titul šampion udělen pouze jediné plavé bearded kolii – feně Romalia Rafaelle v roce 1984 (Partridge, 2005). Naopak zájemci, kteří neplánují štěně vystavovat či na něm chovat, často preferují vzácnější barvy, jako je modrá nebo plavá. Z těchto důvodů chovatelé často vybírají chovné páry tak, aby uspokojili momentální poptávku. Proto je výhodné znát u chovných jedinců genotyp příslušných genů ovlivňujících zbarvení, který lze zjistit například testovacím křížením. Zajímavá by mohla být i možnost určení genotypu pomocí genetického testu, pokud by byl dostupný.

Výše uvedené zásahy chovatelů do reprodukce plemene může narušovat frekvence alel hodnocených markerů. U plemene navíc došlo po druhé světové válce k takzvanému bottleneck efektu (efekt hrdla láhve), při kterém dochází k silnému poklesu genetické proměnlivosti v důsledku dramatického snížení velikosti populace (Isabell, 2002). Tento fakt se pravděpodobně odrazil v nízkých hodnotách heterozygotnosti v lokusech *TYRP1-345* a *TYRP-41*.

#### **6.4 Polymorfismus genu pro dopaminový receptor D4 (*DRD4*) a jeho vztah k chování psů**

*DRD4* je gen, jehož produkt ovlivňuje postsynaptické působení dopaminu. U mnoha druhů savců vykazuje vysoký stupeň polymorfismu a patří mezi kandidátní geny ovlivňující psychické vlastnosti lidí i zvířat. U psů se podařilo detekovat VNTR polymorfismus v exonu 3 (Niimi *et al.*, 1999) a bodový polymorfismus v exonu 1 (Ito *et al.*, 2004) a intronu 2 (Nara *et al.*, 2005).

Z osmi známých alel exonu 3 genu *DRD4* se u bearded kolíí podařilo detekovat celkem pět. Ito *et al.* (2004) pozorovali u každého z 23 hodnocených plemen výskyt dvou až sedmi alel, u žádného z nich však nebylo přítomno všech osm. Nejvíce různých alel bylo přítomno u plemene shiba. Toto japonské plemeno je známé svojí vysokou genetickou diverzitou (Niimi

*et al.*, 2001). Nejméně alel bylo nalezeno u papilonů. U celkem sedmi plemen byly detekovány tři různé alely, do této skupiny patřila i početná plemena, jako například zlatí retrívři, labradorští retrívři, malí knírači a toy pudlové. Z pohledu počtu alel se tedy zdá být variabilita tohoto lokusu u bearded kolií lehce nadprůměrná.

Pozorovaná heterozygotnost (0,4495) byla velice blízká očekávané hodnotě (0,4675), která by nastala při platnosti Hardy-Weinbergova zákona. V práci Ito *et al.* (2004), která se zabývá rozdíly v distribuci alel exonu 3 genu *DRD4* u 23 plemen psů, se hodnoty očekávané heterozygotnosti pohybovaly od 0,149 do 0,745. Nižší hodnota heterozygotnosti může být opět odrazem bottleneck efektu, k němuž u plemene došlo po druhé světové válce (Isabell, 2002). Podle Parker *et al.* (2004) dosahovala očekávaná heterozygotnost u plemene bearded kolie spočítaná na základě frekvence alel 75 SNP osmé nejnižší hodnotě z celkem 60 hodnocených plemen.

Nejvyšší frekvenci výskytu vykazovaly u bearded kolií alely 447a (0,7110) a 435 (0,1376). Alely 447b a 498 byly zastoupeny podstatně méně a nejnižší četnost byla pozorována u alely 486 (0,0092). Ito *et al.* (2004) přisuzují plemenům s vysokou frekvencí alel 435 a 447a okcidentální původ. Orientální plemena mají podle něj vyšší zastoupení alel 447b, 498 a 549. Toto zařazení se zdá být odpovídající, protože bearded kolie nepatří mezi plemena vytvořená v poměrně blízké minulosti a vyvíjela se na území Velké Británie přirozeně po mnoho století (Moorhouse, 1993).

Ito *et al.* (2004) dále uvádějí, že skupina s vyšší četností alel 447b, 498 a 549 dosahovala vyššího průměrného skóre pro agresivitu a nižšího skóre pro reaktivitu než skupina s vysokou frekvencí alel 435 a 447a. I v tomto případě lze s autorem souhlasit, protože podle plemenného standardu mají být bearded kolie pozorným, aktivním, spolehlivým a inteligentním pracovním psem, bez známek nervozity nebo agresivity. Žádný z mnou hodnocených psů navíc neprojevil při odběru vzorků bukalní sliznice sebemenší náznak agresivity.

Pro posouzení povahových vlastností hodnocených bearded kolií byl použit ADHD dotazník upravený a validovaný pro majitele psů (Vas *et al.*, 2007), který byl pro tyto účely použit v pracích Hejjas *et al.* (2007b) a Hejjas *et al.* (2007a). Průměrné skóre pro nepozornost dosahovalo hodnoty 4,678 a průměr skóre pro aktivitu-impulzivitu byl 6,908. Velice podobné hodnoty získali u německých ovčáků i Hejjas *et al.* (2007b). Tito autoři rozdělili hodnocené německé ovčáky na základě vlivu různorodých podmínek prostředí odchovu do dvou skupin na psy „policejní“ a psy „mazlíčky“. Všechny bearded kolie však byly odchovávané za



podobných podmínek, žijí v domácnosti svých majitelů a nejsou využívány pro pracovní účely, proto je nebylo třeba z tohoto pohledu dělit do skupin.

Hejjas *et al.* (2007b) zaznamenali významně vyšší skóre pro aktivitu-impulzivitu u policejních německých ovčáků, kteří měli alespoň jednu alelu 447a. Tento rozdíl nebyl u psů zařazených do skupiny „mazlíčků“ pozorován, což si vysvětluje působením různorodých vnějších podmínek prostředí, jako je například přístup majitele, kvalita výcviku a podobně. U policejních psů jsou často podmínky odchovu i výcviku jednotné. V následující studii provedené na belgických ovčácích se však vliv genotypu na výsledné skóre pro aktivitu-impulzivitu ani nepozornost neprokázal (Hejjas *et al.*, 2007a).

Z kapitoly Výsledky je patrné, že také u bearded kolií žádná ze zvolených statistických analýz neprokázala vztah mezi stupněm nepozornosti či aktivity-impulzivita a polymorfismem markeru exonu 3 genu *DRD4*. Očekávané rozdíly v zastoupení genotypů či alel mezi skupinami jedinců, které se maximálně lišily z hlediska výsledků dotazníku, nebyly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  pozorovány. Vliv na chování bearded kolií nebyl prokázán ani při porovnání poměrného zastoupení alely 447a vůči ostatním alelám. Mezi jedinci s největšími rozdíly ve stupni nepozornosti a aktivity-impulzivita byla dále pomocí Rogersova koeficientu zjištěna minimální genetická vzdálenost. Dále byl ověřen vliv poměrného zastoupení alely 447a vůči ostatním alelám na chování psů. Rozdíly mezi průměry skóre pro nepozornost ani mezi průměry skóre pro aktivitu-impulzivitu nebyly u genotypů 435/447a a 447a/447a na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  statisticky významné.

I v případě lidí byl v některých studiích polymorfismus genu *DRD4* asociován s psychickými vlastnostmi či (Ebstein *et al.*, 1996; Benjamin *et al.*, 1996, Faraone *et al.*, 2005), zatímco jiné práce tento vztah vyvracejí (Castellanos *et al.*, 1998; Vandenberg *et al.*, 1997). Pozornost je zaměřena i na jiné kandidátní geny související s dopaminovým, noradrenalinovým a serotoninovým neurotransmiterním systémem. Jde především o geny pro transportéry a receptory těchto transmiterů a geny pro některé enzymy (Drtílková *et al.*, 2007).

Hejjas *et al.* (2007a) identifikovali VNTR polymorfismus u psů v genech pro tyrosin hydroxylázu (*TH*), dopaminový transportér (*DAT*) a dopamin-betahydroxylázu (*DBH*). Z výsledků autorky vyplývá, že existuje asociace mezi polymorfismem exonu 1 genu *DRD4*, genu *DBH* a *DAT* a nepozorností u plemene belgický ovčák tervueren. Van den Berg *et al.* (2005) studovali strukturu a variabilitu tří genů serotoninového neurotransmiterního systému u psů – genu pro serotoninový receptor 1A (*htr1A*), genu pro serotoninový receptor 2A

(*htr2A*) a genu pro serotoninový transportér (*slc6A4*). Abnormality metabolismu serotoninu v mozku by mohly být příčinou agresivního chování u psů.

Ze současných poznatků vyplývá, že k variabilitě chování psů a rozmanitosti jejich psychických vlastností pravděpodobně přispívají polymorfismy většího množství kandidátních genů. Nelze ale opomenout vliv interakce s faktory vnějšího prostředí, jako je například způsob chovu, výživy, socializace a výcviku.

## 7. ZÁVĚR

Během řešení diplomové práce byly získány výsledky jak metodického, tak i vědeckého charakteru. Mezi důležité metodické výsledky je možné zařadit všechny výstupy optimalizačních experimentů, které byly nezbytné pro detekci konkrétních alel všech studovaných genů. Závěry vyplývající z metodické části diplomové práce je možné shrnout do následujících bodů:

- Izolace pomocí kitu NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, SRN) se ukázala být vhodnou metodou získání DNA v potřebné kvalitě i kvantitě pro následné detekce polymorfismů studovaných genů.
- Dvojice navržených PCR markerů umožnila jednoznačně detekovat trinukleotidovou delecii v *CBD103* genu. Sekvenační analýzou bylo potvrzeno, že se opravdu jedná o delecii tripletu kódujícího glycin.
- Metoda PCR SSCP byla vhodným nástrojem pro odlišení alel se substitucí v exonu 2 lokusu *TYRPI*, kterou nelze identifikovat pomocí restričního štěpení. Na základě konformačního polymorfismu jednovláknové DNA byly detekovány dvě alely, které v interakcích s ostatními mutacemi genu *TYRPI* prokazatelně ovlivňovaly výsledné zbarvení srsti bearded kolíí.
- Pro amplifikaci PCR markeru jednotlivých alel exonu 3 genu *DRD4* byla použita *Pfu* polymeráza v kombinaci s 7-deaza-dGTP, což se ukázalo být nezbytné pro amplifikaci fragmentu s tendencí vytvářet sekundární struktury.
- Pro detekci jednotlivých alel exonu 3 genu *DRD4* bylo nutné použít sekvenační elektroforézu a amplicony separovat v denaturačním prostředí.

Výše uvedené metodické závěry byly nezbytným předpokladem pro následné hodnocení vzorku populace bearded kolíí a pro ověření všech hypotéz zmíněných v kapitole 2 této práce. Tyto vědecké výsledky jsou shrnuty v následujících bodech:

- U všech 109 hodnocených psů, s výjimkou jednoho, byla zjištěna přítomnost delecie tří nukleotidů v genu *CBD103* vedoucí ke vzniku dominantního eumelanistického zbarvení srsti. Mutace byla u všech jedinců přítomna v homozygotní sestavě. Tento výsledek odpovídá chovatelské praxi, kde se u plemene bearded kolie nevyskytuje

žluté ani vlkošedé agouti zbarvení. Jediná výjimka se týkala hnědého psa s pálením, který mohl být teoreticky nositelem jiného typu mutace *CBD103* genu.

- Byla prokázána asociace kombinace tří kauzálních mutací *TYRP1* genu s černým, resp. hnědým eumelanistickým zbarvením. Získané výsledky plně korespondovaly i s rodokmeny hodnocených zvířat, popřípadě se zbarvením srsti jejich potomků.
- Výsledkem populační studie bylo zjištění, že u markerů *TYRP-345* a *TYRP-41* došlo k snížení heterozygotnosti, což lze vysvětlit poklesem genetické variability vlivem efektu hrdla láhve, k němuž u plemene došlo po druhé světové válce
- V rámci hodnoceného vzorku populace bearded kolií bylo nalezeno celkem 5 různých alel exonu 3 genu *DRD4*, přičemž alely *447a* a *498* se vyskytovaly pouze s minoritními frekvencemi. Nejvyšších četností dosahovaly alely *435* a *447a*, což lze považovat za typické pro evropská plemena psů.
- Na základě dotazníkového šetření byl charakterizován stupeň nepozornosti a aktivity-impulzivity u 65 psů, jejichž majitelé byli ochotni spolupracovat na výzkumu genetické determinace chování bearded kolií. Pomocí neparametrického  $\chi^2$ -testu ani dvouvýběrového t-testu nebyla potvrzena statisticky významná závislost mezi frekvencí alel, resp. genotypů a výsledným skórem jak pro nepozornost, tak i pro aktivitu-impulzivitu.

## 8. SEZNAM LITERATURY

- Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P., Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 10 (2), 77-81.
- Benjamin, J., Li, L., Patterson, C., Greenberg, B. D., Murphy, D. L., & Hamer, D. H. 1996. Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. *Nature Genetics*, 12 (1), 81-84.
- Berryere, T. G., Kerns, J. A., Barsh, G. S., & Schmutz, S. M. 2005. Association of an Agouti allele with fawn or sable coat colour in domestic dogs. *Mammalian Genome*, 16 (4), 262-272.
- Box, N. F., Wyeth, J. R., Mayne, C. J., O'Gorman, L. E., Martin, N. G., Sturm, R. A. 1998. Complete sequence and polymorphism study of the human TYRP1 gene encoding tyrosinase-related protein 1. *Mammalian Genome*, 9 (1), 50-53.
- Brown, T. A. 2007. Klonování genů a analýza DNA: Úvod, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 389 s.
- Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P. 1994. Staining nucleic acids with silver an alternative to radioisotopic and fluorescent labelling. *Promega Notes Magazine*, 45 (1), 13-18.
- Candille, S. I., Kaelin, C. B., Cattanach, B. M., Yu, B., Thomson, D. A., Nix, M. A., Kerns, J. A., Schmutz, S. M., Millhauser, G. L.; Barsh, G. S. 2007. A  $\beta$ -Defensin Mutation Causes Black Coat Color in Domestic Dogs. *Science*, 318 (5855), 1418-1423.
- Castellanos, F. X., Lau, E., Tayebi, N, Lee, P., Long, R. E., Giedd, J. N., Sharp, W., Marsh, W. L., Walter, J. M., Hamburger, S. D., Ginns, E. I., Rapoport, J. L., Sidransky, E.. 1998. Lack of an association between a dopamine-4 receptor polymorphism and attention-deficit/hyperactivity disorder: genetic and brain morphometric analyses. *Molecular Psychiatry*, 3 (6), 431-434.
- Clutton-Brock, J. 1995. Origins of The dog: domestication and early history, in Serpell, J. (ed.), *The Domestic Dog: its evolution, behaviour and interactions with people*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 7-20.
- Collis, J., Jones, P. 1992. *The Complete Bearded Collie*, Ringpress, Letchworth, p. 160.
- Coppinger, R., Coppinger L. 2001. *Dogs: A New Understanding of Canine Origin, Behaviour, and Evolution*, The University of Chicago Press, Chicago, p. 352.
- Coppinger, R., Schneider, R. 1995. Evolution of Working Dogs, in Serpell, J. (ed.), *The Domestic Dog: its evolution, behaviour and interactions with people*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 21-47.
- Ding, Y. C., Chi, H. C., Grady, D. L., Morishima, A., Kidd, J. R., Kidd, K. K., Flodman, P., Spence, M. A., Schuck, S., Swanson, J. M., Zhang, Y., Moyzis, R. K. 2002. Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (1), 309-314.
- Dostál, J. 2007. *Genetika a šlechtění psů*, Dona, České Budějovice, 260 s.

- Drögemüller, C., Philipp, U., Haase, B., Günzel-apel, A. R., Leeb, T. 2007. A Noncoding Melanophilin Gene (MLPH) SNP at the Splice Donor of Exon 1 Represents a Candidate Causal Mutation for Coat Color Dilution in Dogs. *Journal of Heredity*, 98 (5), 468-73.
- Drtílková, I., Šerý, O., Balaščíková, B., Theiner, P., Uhrová, A., Žáčková, M. 2007. *Hyperkinetická porucha / ADHD*, Galén, Praha, 268 s.
- Dulawa, S. C., Grandy, D. K., Low, M. J., Paulus, M. P., Geyer, M. A. 1999. Dopamine D4 Receptor-knock-out mice exhibit reduce exploration of novel stimuli. *Journal of Neuroscience*, 19, 9550-9556.
- Ebstein, R. P., Novick, O., Umansky, R., Priel, B., Osher, Y., Blaine, D., Bennett, E. R., Nemanov, L., Katz, M., Belmaker, R. H. 1996. Dopamine D4 receptor (DRD4) exon III polymorphism associated with the human personality of Novelty Seeking. *Nature Genetics*, 12 (1), 78-80.
- Everts, R. E., Rothuizen, J., van Oost, B. A. 2000. Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (MC1R) in Labrador and golden retrievers with yellow coat colour. *Animal Genetics*, 31 (3), 194–199.
- Faraone, S. V., Perlis, R. H., Doyle, A. E., Smoller, J. W., Gorlanick, J. J., Holmgren, M. A., Sklar, P. 2005. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, 57 (11), 1313-1323.
- Freinkel, R. K., Woodley, D. T. 2001. *The Biology of the Skin*, The Parthenon Publishing Group Inc., New York, p. 432.
- Griffin, H. G., Griffin, A. M. 1994. *PCR Technology – Current Innovations*, PCR Press, London, p. 370.
- 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.
- Hancock, D. 2006. Bearding the sheepdog. *Dogs Monthly*, 24 (9), 15-19.
- Heiman, M. 1997. [program] Webcutter 2.0. [cit. 2010-04-09]. Dostupné z: <<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>>
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA. *Genome Research*, 1 (1), 34-38.
- Hearing, V. J. 2005. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *Journal of Dermatological Science*, 37 (1), 3-14.
- Hearing, V. J., Tsukamoto, K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB Journal*, 5 (14), 2902-2909.
- Hejjas, K., Vas, J., A., Kubinyi, E., Sasvari-Szekely, M., Miklosi, Ronai, Z. 2007a. Novel repeat polymorphisms of the dopaminergic neurotransmitter genes among dogs and wolves. *Mammalian Genome*, 18 (12), 871-879.
- Hejjas, K., Vas, J., Topal, J., Szantai, E., Ronai, Z., Szekely, A., Kubinyi, E., Horvath, Z., Sasvari-Szekely, M., Miklosi, A. 2007b. Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs. *Animal Genetics*, 38 (6), 629-633.

- Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., Brow, M. A. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (24), 9436-9440.
- Isabell, J. 2002. *Genetics: An Introduction for Dog Breeders*, Alpine, Loveland, p. 322.
- Ito, H., Nara, H., Inoue-Murayama, M., Shimada, M. K., Koshimura, A., Ueda, Y., Kitagawa, H., Takeuchi, Y., Mori, Y., Murayama, Y., Morita, M., Iwasaki, T., Ota, K., Tanabe, Y., Ito, S. 2004. Allele Frequency Distribution of the Canine Dopamine Receptor DR Gene Exon III and I in 23 Breeds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66 (7), 815-820.
- Jackson, I. J. 1988. A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (12), 4392-4396.
- Jackson, I. J. 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat colour. *Annual Review of Genetics*, 28 (1), 189-217.
- Kerns, J. A., Cargill, J. E., Clark, L. A., Candille, S. I., Berryere, T. G., Olivier, M., Lust, G., Todhunter, R. J., Schmutz, S. M., Murphy, K. E., Barsh, G. S. 2007. Linkage and Segregation Analysis of Black and Brindle Coat Color in Domestic Dogs. *Genetics*, 176 (3), 1679-1689.
- Kerns, J. A., I., C. S., Berryere, T. G., Cargill, E. J., Murphy, K. E., Schmutz, S. M. 2004. Characterization of the dog Agouti gene and identification of a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mammalian Genome*, 15 (10), 798-808.
- Kerns, J. A., Olivier, M., L. G., & Barsh, G. S. 2003. Exclusion of Melanocortin-1 Receptor (Mc1r) and Agouti as Candidates for Dominant Black in Dogs. *Journal of Heredity*, 94(1), 75-79.
- Kleinová, I. 2001. 20 let chovu Bearded kolíí v Čechách. *Fauna*, 12 (10), 34-35.
- Lee, C., Kim, C., Shin, S., Shin, D., Kang, J., Park, C. 2008. The Dopamine D4 Receptor Polymorphism Affects the Canine Fearfulness. *Animal Cells and Systems*, 12 (2), 77-83.
- Little, C. C. 1957. *The Inheritance of Coat Colour in Dogs*. Comstock, Ithaca, p. 194.
- Livak, K. J., Rogers, J., Lichter, J. B. 1995. Variability of dopamine D4 receptor (DD4) gene sequence within and among nonhuman primate species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (2), 427-431.
- Miller, M. P. 1997. [program] Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. [cit. 2010-04-09]. Dostupné z < <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm> >.
- Mills, M. G., Patterson, L. B. 2009. Not just Black and white: Pigment pattern development and evolution in vertebrates. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20 (1), 72-81.
- Missale, C., R., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G. 1998. Dopamine Receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 78 (1), 189-225.
- Momozawa, I., Takeuchi, Y., Kusunose, R., Kikusui, T., Mori, Y. 2005. Association between equine temperament and polymorphism in dopamine D4 receptor gene. *Mammalian Genome*, 16 (7), 538-534.

- Moorhouse, K. S. 1993. Talking about... "Beardies", Rivers Media Services Ltd., Hereford, p. 236.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, E. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 (1), 263-273.
- Nara, H., Inoue-Murayama, M., Koshimura, A., Sugiyama, A., Muryama, Y., Maejima, M., Ueda, Y., Ito, H., Randi, E., Kim, H., Ha, J., Kitawaga, H., Takeuchi, Y., Mori, Y., Iwasaki, T., Morita, M., Ota, K., Ito, S. 2005. Novel polymorphism of the canine dopamine receptor D4 gene intron II region. *Animal Science Journal*, 76 (1), 81-86.
- Newton, J. M., Wilkie, A. L., He, L., Jordan, A. S., Barsh, G. S. 2000. Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mammalian Genome*, 11 (1), 24-30.
- Niimi, Y., Inoue-Murayama, M., Kato, K., Matsuura, N., Murayama, Y., Ito, S., Momoi, Y., Konno, K., Iwasaki, T. 2001. Breed Differences in Allele Frequency of the Dopamine Receptor D4 Gene in Dogs. *The Journal of Heredity*, 92 (5), 433-436.
- Niimi, Y., Inoue-Murayama, M., Murayama, Y., Ito, S., Iwasaki, T. 1999. Allelic variation of the D4 dopamine receptor polymorphic region in two dog breeds, Golden Retriever and Shiba. *Journal of Veterinary Medical Sciences*, 61 (12), 1281-1286.
- Nobis, G. 1979. Der älteste Haushund lebte vor 14 000 Jahren. *UMSHAU*, 19, 610.
- Oberbauer, A.M., Grossman D.I., Eggleston, M. L., Irion, D. N., Schaffer, A. L., Pedersen, N. C., Belanger, J. M. 2003. Alternatives to Blood as a Source of DNA for Large-scale Scanning Studies of Canine Genome Linkages. *Veterinary Research Communications*, 27 (1), 27-38.
- O'Malley, K. L., Harmon, S., Tang, L., Todd, R. D. 1992. The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure and demonstration of expression in the cardiovascular system. *The New Biologist*, 4 (2), 136-146.
- Parker, H. G., Kim, L. V., Sutter, N. B., Carlson, S., Lorentzen, T. D., Malek, T. B., Johnson, G. S., DeFrance, H. B., Ostrander, E. A., Kruglyak, L. 2004. Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog. 304 (5674), 1160 – 1164.
- Partridge, B. 2005. Bearded Collie Club Golden Jubilee, Bearded Collie Club, York, p. 164.
- Rieseberg, B., McKinney, B. J. 1997. *Beardie Basics*, Alpine Publishing, Loveland, p. 120.
- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance, in *Studies in genetics VII*. Publ. 7213. Univ. of Texas, Austin, pp. 145–153.
- Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132, 365-386.
- Ruvinsky, A., Sampson, J. 2001. *The Genetics of the Dog*, CABI, Wallingford, p. 576.
- Saiki, R. K., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., A., Erlich H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839), 487-491.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. (Second edition), Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, p. 1659.
- Savolainen, P., Zhang, Y. P., Luo, J., Lundeberg, J., Leitner, T. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298 (5598), 1610-1613.



- Schmutz, S. M., Berryere, T. G. 2007. Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review. *Animal Genetics*, 38 (6), 539-549.
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Goldfinch A. D. 2002. TYRP1 and MC1R genotypes and their effects on coat color in dogs. *Mammalian Genome*, 13 (7), 380-387.
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Barta, J. L., Reddick, K. D., Schmutz, J. K. 2007. Agouti sequence polymorphisms in coyotes, wolves and dogs suggest hybridization. *Journal of Heredity*, 98 (4), 351-355.
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Ellinwood, N. M., Kerns, J. A., Barsh, G. S. 2003. MC1R studies in dogs with melanistic mask or brindle pattern. *Journal of Heredity*, 94 (1), 69-73.
- Smith, H. O., Wilcox, K. 1970. Restriction endonuclease from *Haemophilus influenzae*. *Journal of Molecular Biology*, 51 (2), 379-391.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. 2009. *Genetika*, Masarykova Univerzita, Brno, 864 s.
- Sunnucks, P., Wilson, A. C., Beheregaray, L. B., Zenger, K., French, J. T. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9, 1699–1710.
- Thapar, A., Harrington, R., Ross, K., McGuffin, P. 2000. Does the definition of ADHD affect heritability? *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 39 (12), 1528-1536.
- Thomson Gray, D. J. 1891. *The Dogs of Scotland: Their Varieties, History, Characteristics, and Exhibition Points*. James P. Mathew & Co., Edinburgh, p. 215
- van den Berg, L., Kwant, L., Hestand, M. S., van Oost, B. A., Leegwater, A. J. 2005. Structure and Variation of Three Canine Genes Involved in Serotonin Binding and Transport: The Serotonin Receptor 1A Gene (*htr1A*), Serotonin Receptor 2A Gene (*htr2A*), and Serotonin Transporter Gene (*slc6A4*). *Journal of Heredity*, 96 (7), 786-796.
- Vandenbergh, D. J., Zonderman, A. B., Wang, J., Uhl, G. R., Costa, P. T. 1997. No association between novelty seeking and dopamine D4 receptor (*D4DR*) exon III seven repeat alleles in Baltimore Longitudinal Study of Aging participants. *Molecular Psychiatry*, 2 (5), 417-419.
- Vas, J., Topal, J., Pech, E., Miklosi, A. 2007. Measuring attention deficit and activity in dogs: A new application and validation of a human ADHD questionnaire. *Applied Animal Behavior Science*, 103 (1-2), 105-117.
- Vazdová, P. 2003. *Bearded Collie*, Plot, Praha, 159 s.
- Vilá, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276 (5319), 1687-1689.
- Vilá, C., Amorim, I. R., Leonard, R. A., Posada, D., Castroviejo, J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, K. A., Ellegren, H., Wayne, R. K. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, 8 (19), 2089-2103.
- Volková, D. 2010. Přehled vrhů za rok 2009, in *Ročenka KCHBC 2006*, KCHBC, Praha s. 6.
- Volková, D. 2009. Přehled vrhů za rok 2008, in *Ročenka KCHBC 2006*, KCHBC, Praha s. 6.
- Volková, D. 2008. Přehled vrhů za rok 2007, in *Ročenka KCHBC 2006*, KCHBC, Praha s. 6.

- Volková, D. 2007. Přehled vrhů za rok 2006, in Ročenka KCHBC 2006, KCHBC, Praha s. 6.
- Volková, D. 2006. Přehled vrhů za rok 2005 in Ročenka KCHBC 2005, KCHBC, Praha, s. 6.
- Volková, D. 2005. Přehled vrhů za rok 2004 in Ročenka KCHBC 2004, KCHBC, Praha, s. 4.
- Volková, D. 2004. Přehled vrhů za rok 2003 in Ročenka KCHBC 2003, KCHBC, Praha, s. 4.
- Volková, D. 2003. Přehled vrhů za rok 2002 in Ročenka KCHBC 2002, KCHBC, Praha, s. 4.
- Volková, D. 2002. Přehled vrhů za roky 1999 – 2001 in Ročenka KCHBC 1999, 2000, 2001, KCHBC, Praha, s. 4-6.
- Wayne, R. K. 1993. Molecular evolution of the dog family. *Trends in Genetics*, 9 (6), 217-224.
- Willis, M. B. 1989. *Genetics of the Dog*. H. F. & G. Witherby Ltd., London, p. 417.
- Willison, G. O. 1971. *The Bearded Collie*, Bath Press, Avon, p. 66.
- Winge, O. 1950. *Inheritance in Dogs with Special Reference to the Hunting Breeds*. Comstock, Ithaca, p. 153.
- Yamaguchi, Y., Itami, S., Watabe, H., Yasumoto, K., Abdel-Malek, Z. A., Kubo, T. 2004. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *Journal of Cell Biology*, 165 (2), 275-285.
- Young, A., Bannasch, D. 2006. Morphological Variation in the Dog, in Ostrander, U. Giger, & K. Lindblad-Toh, *The Dog and its Genome*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 584.

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$\alpha$ MSH	melanocyty stimulující hormon
ADHD	hyperkinetický syndrom s poruchou pozornosti
AK	aminokyselina
ASIP	<i>agouti signal peptid</i>
bp	počet párů bází v molekule nukleové kyseliny
BSA	bovinní sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
<i>CBD103</i>	beta-defensin 103
<i>CBD103ΔG23</i>	dominantní alela genu <i>CBD103</i> s delecí glycinu
cDNA	molekula DNA získaná reverzní transkripcí z molekuly RNA (Complementary DNA)
CFA	autosomální chromozóm psa
<i>DAT</i>	dopaminový transportér
dATP	deoxyadenosin-5'-trifosfát
<i>DBH</i>	dopamin-betahydroxyláz
dCTP	deoxycytidin-5'-trifosfát
dGTP	deoxyguanin-5'-trifosfát
DHI	5,6-dihydroxyindol
<i>DKK1</i>	<i>dickkopf 1</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid-5'-trifosfát (obecně)
DOPA	3,4-dihydroxyfenilalanin
DQ	dopachinon
<i>DRD4</i>	dopaminový receptor D4
dTTP	deoxytymidin-5'-trifosfát
EDTA	disodná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové
<i>ERI</i>	<i>endothelin 1</i>
FAPPZ ČZU	Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze
F-primer	přímý primer
H <sub>E</sub>	očekávaná heterozygotnost
H <sub>O</sub>	pozorovaná heterozygotnost
<i>htr1A</i>	serotoninový receptor 1A
<i>htr2A</i>	serotoninový receptor 2A
<i>MC1R</i>	<i>melanocortin 1 receptor</i>
<i>MITF</i>	<i>microphthalmia-associated transcription factor</i>
<i>MLPH</i>	<i>melanophilin</i>
mRNA	messenger RNA, též mediátorová nebo informační RNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	metoda využívající délkového polymorfismu restričních fragmentů analyzované DNA
SSCP	polymorfismus konformace jednořetězcové DNA (single strand conformation polymorphism)

<i>Pfu</i>	termostabilní polymeráza pocházející z <i>Pyrococcus furiosus</i>
PKA	proteinkináza A
<i>R96C</i>	recesivní alela <i>ASIP</i>
R-primer	zpětný primer
<i>SILV</i>	gen kódující protein <i>Pmel 17</i>
<i>slc6A4</i>	serotoninový transportér
ssDNA	jednořetězcová molekula DNA (Single Stranded DNA)
<i>Taq</i>	termostabilní polymeráza pocházející z <i>Thermus aquaticus</i> .
TBE	tris-borátový pufr (Sambrook et al., 1989)
TFPGA	program Tools For Population Genetic Analyses
TH	gen pro tyrosin hydroxylázu
<i>Tli</i>	termostabilní polymeráza pocházející z <i>Thermococcus litoralis</i>
<i>TYRP1</i>	<i>tyrosinase-related protein 1</i>
<i>TYRP2</i>	<i>tyrosinase-related protein 2</i>
<i>TYRP1-331</i>	marker exonu 5 genu <i>TYRP1</i>
<i>TYRP1-345</i>	marker exonu 5 genu <i>TYRP1</i>
<i>TYRP1-41</i>	marker exonu 2 genu <i>TYRP1</i>
UPGMA	shluková analýza (Unweighted Pair Group Method for Arithmetic Averages)
$V_k$	variační koeficient
VNTR	variabilní počet tandemových repetit

# PŘÍLOHY

## Příloha č. 1 - Plemenný standard

### Bearded kolie (FCI standard č. 271 z 1. 12. 1989)

**Skupina: 1**

**Sekce: 1 - ovčáci**

**Země původu:** Velká Británie / 24. 06. 1987

**Celkový vzhled:** štíhlý, šlachovitý, aktivní pes; jeho délka přesahuje kohoutkovou výšku zhruba v poměru 5 : 4 měřeno od předního okraje prsní kosti až po vrchol sedací kosti. Feny mohou být poněkud delší. Přes robustní stavbu těla by měl být pes postaven dostatečně vysoko a neměl by působit těžkým dojmem. Charakteristickým znakem tohoto plemene je čilý a zvědavý výraz.

**Charakteristika:** pozorný, činorodý, sebejistý a aktivní pes.

**Povaha:** spolehlivý, inteligentní pracovní pes, bez známek nervozity nebo agresivity.

**Hlava a lebka:** hlava ve správném poměru k velikosti těla. Lebka široká, plochá a kvadratická. Vzdálenost mezi stopem a týlním hrbolem odpovídá šířce hlavy mezi otvory uší. Tlama je silná a její délka odpovídá vzdálenosti stopu od týlního hrbolu. Působí celkovým dojmem psa se silnou tlamou a lebkou, jež poskytuje velký prostor pro mozek. Přiměřený stop. Nosní houba velká a kvadratická, většinou černá, u modrých a hnědých psů však obvykle odpovídá barvou barvě srsti. Nosní houba a pysky jednobarevné, bez teček nebo skvrn. Pigmentace pysků a okrajů víček odpovídá barvě nosní houby.

**Oči:** barevným tónem jsou sladěny s barvou srsti. Široko posazené a velké, měkké a láskyplné, nevystupují. Obočí klenuté nahoru a dopředu, jeho délka však není taková, aby překrývalo oči.

**Uši:** středně velké a visící. Při vzbuzeu pozornosti se jejich nasazení zvedne až na úroveň temene, nesmí se však přesahovat. Díky nim se zdá lebka širší.

**Tlama / skus:** zuby velké a bílé. Silné čelisti, pokud možno se dokonalým pravidelným a úplným nůžkovým skusem, přičemž horní řada řezáků přesahuje těsně přes dolní řadu a zuby jsou v čelistech posazeny šikmo. Klešťový skus je povolen, ale není žádoucí.

**Krk:** přiměřeně dlouhý, svalnatý a lehce klenutý.

**Hrudní končetina:** plece uložené dobře šikmo nazad. Končetiny rovné a svislé, se silnými kostmi, celé pokryté chundelatou (huňatou) srstí. Přední nadprstí lehce pružné, ale bez známek slabosti.

**Trup:** Délka hřbetu plyne z délky hrudního koše, ne z délky beder. Hřbet rovný, žebra dobře klenutá, ale ne sudovitá. Bederní partie silná, hrudní koš hluboký, se spoustou místa pro srdce a plíce.

**Pánevní končetina:** dobře osvalené se silnými lýtky, dobře úhlenými koleny a hluboko postavenými hlezny. Zadní nadprstí je v pravém úhlu k podložce a v normálním postoji se nachází na svislici, spuštěné z vrcholu sedací kosti.

**Tlapy:** oválné s dobře vyplněnými pružnými polštářky. Prsty klenuté a dobře uzavřené, dobře kryté srstí i mezi polštářky.

**Ocas:** hluboko nasazený, bez zálohu a nezatočený, tak dlouhý, aby poslední obratel ocasu dosahoval nejméně k hleznu. Ve stoje nebo v pohybu nízko nesený se špičkou, otočenou vzhůru, při rychlejším pohybu i rovně nesený. Nikdy nenesen nad hřbetem. Pokryt bohatou srstí.

**Chody / pohyb:** plynulý, stejnoměrný, pružný a prostorný i při minimální vynaložené námaze.

**Osrstění:** dvojité, s jemnou, huňatou a hustou podsadou. Krycí srst hladká, tvrdá, silná a huňatá. Krycí srst není vlnitá ani kučeravá, třebaže velmi lehká zvlněnost je povolena. Délka a hustota srsti dostačuje k tomu, aby poskytovala ochranu a dobře uplatnila tvary psa, nesmí však být tak bohatá, aby stírala přirozené linie těla. Srst se nesmí nijak zkracovat. Hřbet nosu je pokryt srstí spoře, srst je po stranách poněkud delší a stačí právě tak k pokrytí pysků. Na lících, dolních pyscích a na bradě se délka srsti směrem k hrudi prodlužuje a tvoří typický vous.

**Barva:** břidlicově šedá, rezavě plavá, černá, modrá, všechny odstíny šedé, hnědé a pískové, s bílými odznaky nebo bez nich. Jsou-li v osrstění bílé znaky, vyskytují se na tlamě, jako lysinka na temeni, na špičce ocasu, na hrudi, na bžích a na tlapách. Má-li jedinec bílý límec, nesmí nasazení bílé srsti přesahovat přes plece. Bílá by se na vnější straně pánevních končetin neměla vyskytovat nad hlezny. Lehce tříslově zbarvené znaky jsou povoleny na obočí, vnitřní straně uší, na lících, pod kořenem ocasu a na končetinách na přechodu mezi bílou a základní barvou.

**Velikost / hmotnost:** Ideální kohoutková výška: psi: 53 až 56 cm  
feny: 51 až 53 cm

Při hodnocení by měla mít přednost celková kvalita a proporce, přehnané odchylky od ideální velikosti by se však neměly podporovat.

**Vady:** Všechny odchylky od výše uvedených bodů by se měly posuzovat jako vady, jejichž hodnocení musí být v přesném poměru k velikosti odchylky.

**Poznámka:** psi musí vykazovat dvě viditelně normálně vyvinutá varlata, nacházející se zcela v šourku.

## Příloha č. 2 - Odběr vzorku DNA ze sliznice dutiny ústní

**Obrázek 17 - Odběr vzorku DNA ze sliznice dutiny ústní** - provádí se výtěrem sliznice dutiny ústní minimálně dvě hodiny po příjmu krmiva, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. Rukou zdvihneme horní pysk psa a kartáček přiložíme na vnitřní stranu pysku psa.



**Obrázek 18 - Odběr vzorku DNA ze sliznice dutiny ústní** - horní pysk poté pustíme tak, aby kartáček zůstal mezi vnitřní stranou pysku a dásní. Kartáčkem pohybujeme asi 20 – 30krát tam a zpět a zároveň s ním pomalu otáčíme.





## **Příloha č. 3 – Agarózová gelová elektroforéza**

### **Příprava agarózového gelu:**

1. Odvážit potřebné množství agarózy (Serva, SRN, pro molekulární biologii) podle požadované koncentrace gelu.
2. Rozpustit ve 250 ml pufru 1xTBE v Erlenmayerově baňce s úzkým hrdlem.
3. Rozvařit v mikrovlnné troubě.
4. Na magnetickém míchadle ochladit na teplotu 60°C a poté přidat 12,5 µl zásobního roztoku ethidium bromidu (Sigma, USA) a důkladně rozmíchat.
5. Naplnit gelovou vanu, jejíž čelní stěny byly utěsněny v odlévacím stojanu
6. Ponechat polymerizovat při laboratorní teplotě 1 hodinu.

Poznámka: Veškeré operace s roztokem ethidium bromidu a s gelovým roztokem, který ethidium bromid obsahuje, je nutno provádět v ochranných latexových rukavicích.

### **Příprava vzorků pro separaci**

1. 0,7 µl vzorkového pufru
2. 10 µl PCR produktu odebraného pod hladinou minerálního oleje nebo shodný objem izolované DNA ředěné na koncentraci 100µg.µl<sup>-1</sup>
3. důkladně promíchat v mikrozkušavce o objemu 0,5ml

### **Sestavení elektroforetické cely a nanesení vzorků**

1. Z polymerizovaného gelu odstranit hřeben a gel i s nosičem vyjmout z odlévacího stojanu
2. Gel i s nosičem vložit do elektroforetické vany.
3. Převrstvit 1500ml elektrodového pufru (hladina pufru musí být přibližně 2mm nad povrchem gelu).
4. Speciálně vyčleněnou pipetou nanášet připravené vorky pod hladinu pufru.

Poznámka: Veškeré operace s gelem a elektrodovým pufrem, který obsahuje ethidium bromid, a vlastní nanášení vzorků je nutno provádět vždy v ochranných latexových rukavicích.

## **Roztoky a jejich složení:**

### **Vzorkový pufr (Sambrook *et al.*, 1989)**

- 0,25 % bromfenolové modři - sodná sůl (Serva, SRN)
- 0,25 % xylencyanolové modři FF (Sigma, USA)
- 15,0 % ficolu (Sigma, USA)
- vše rozpustit ve sterilní 2x deionizované H<sub>2</sub>O
- uchovávat při 4°C

### **10xTBE pufr (Sambrook *et al.*, 1989)**

- 450 mM Tris-kyselina boritá (Sigma, USA), pH 8,0
- 10 mM EDTA (Sigma, USA)
- uchovávat při 4°C

### **1xTBE pufr (Sambrook *et al.*, 1989)**

- naředit 10xTBE pufr 1x deionizovanou H<sub>2</sub>O
- uchovávat při 4°C

### **Zásobní roztok ethidium bromidu (Sambrook *et al.*, 1989)**

- 10 mg ethidium bromidu (Sigma, USA)
- 1 ml sterilní 2x deionizované H<sub>2</sub>O
- při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných rukavicích
- uchovávat ve tmě při teplotě 4°C

### **Elektrodový pufr**

- 1500 ml 1xTBE
- 75 µl zásobního roztoku ethidium bromidu
- při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných rukavicích
- pufr je určen pro okamžité použití.

## **Příloha č. 4 – Sekvenační elektroforéza**

### **Příprava vzorků pro separaci**

1. 5 µl PCR produktu
2. 5 µl denaturačního nanášecího pufru podle Benbouza *et al.* (2006).
3. Vlastní denaturace probíhala při teplotě 96°C po dobu 5 minut. Denaturované vzorky byly okamžitě umístěny na led a uchovávány v mrazáku až do nanášení na separační gel.

### **Příprava sekvenační cely Sequi-Gen GT (Bio-Rad, USA)**

1. Samostatné sklo elektroforézy se ošetří roztokem Silanu (3-(metakryloxypropyl)-trimethoxysilan).
2. Na druhé sklo s pufrovou komorou se nanáší 1ml roztoku Sigma-Cote (Sigma, SRN).
3. Sestavení sekvenační cely.
4. Nalítí gelového roztoku a zasunutí hřebenu.
5. Polymerizace gelu trvá přibližně 1,5 hodiny.
6. Naplnění elektroforézní cely 1x TBE pufrem a zahřátí gelu na teplotu 50°C.
7. Nanášení vzorků o objemu 5 µl.
8. Elektroforetická separace po dobu 7 hodin při konstantní hodnotě výkonu 70 W.

### **Barvení sekvenačního gelu**

Barvení sekvenačního gelu se provádí s gelem přichyceným na skle v důsledku aplikace silanizačního roztoku.

1. Fixace fragmentů DNA na gel inkubací ve fixačním roztoku po dobu 5 minut za mírného třepání.
2. Inkubace skla s gelem v barvicím roztoku po dobu 7 minut.
3. Opláchnutí gelu 1x deionizovanou vodou.
4. Vyvíjení gelu v roztoku vývojky dokud nejsou patrné fragmenty DNA (cca 10 minut).
5. Zastavení vyvíjecí reakce inkubací ve fixačním roztoku po dobu 5 minut.
6. Vysušení gelu na skle a následná digitalizace.

### **Roztoky a jejich složení:**

#### **Denaturační nanášecí pufr podle Benbouza *et al.* (2006)**

40 ml obsahuje:

- 38,19 ml formamidu (99,5%)
- 400 µl 1M NaOH
- 1,41 ml sterilní 2x deionizovaná H<sub>2</sub>O
- 20 mg bromfenolové modři - sodná sůl (Serva, SRN)
- 20 mg xylencyanolové modři FF (Sigma, USA)

#### **Silanizační roztok**

- 1 ml čistého nedenaturovaného ethanolu (96%)
- 5 µl ledové kyseliny octové (99%)
- 3 µl Silanu (3-(metakryloxypropyl)-trimethoxysilan)

#### **Roztok na přípravu 6 % polyakrylamidového denaturačního gelu**

100 ml roztoku obsahuje:

- 15 ml 40% směsi s poměrem akrylamidu : bis-akrylamidu 19:1
- 10 ml 10x TBE
- 42 g močoviny (výsledná koncentrace močoviny je 8 M)

Aby došlo k polymerizaci, je nutné při konečné přípravě přidat:

- 833 µl 10% persíranu amonného
- 50 µl Temeđu

Poznámka: při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných latexových rukavicích

#### **Fixační roztok podle Benbouza *et al.* (2006)**

- 5 ml ledové kyseliny octové
- 100 ml čistého nedenaturovaného ethanolu (96%)
- 895 ml 1x deionizovaná H<sub>2</sub>O

#### **Barvicí roztok**

- 1,5 g AgNO<sub>3</sub>
- 1000 ml 1x deionizované H<sub>2</sub>O
- Těsně před použitím přidat 3 ml formaldehydu

Poznámka: připravit vždy čerstvý, používat vždy ochranné latexové rukavice

## **Příloha č. 5 – Metoda PCR-SSCP**

### **Příprava vzorků pro separaci**

1. 7  $\mu$ l PCR produktu
2. 7  $\mu$ l denaturačního nanášecího pufru podle Benbouza *et al.* (2006).
3. Vlastní denaturace probíhala při teplotě 96°C po dobu 5 minut. Denaturované vzorky byly okamžitě umístěny na led a uchovávány v mrazáku až do nanášení na separační gel.

### **Příprava gelu, systém DCode (Bio-Rad, USA)**

1. Sestavení dvojice skel představujících formu pro odlití gelu.
2. Příprava gelového roztoku a zasazení hřebců.
3. Polymerizace gelu po dobu přibližně 1 hodinu.
4. Nanášení vzorků o objemu 14  $\mu$ l.
5. Separace v 0,5 x TBE při konstantní teplotě 4°C po dobu 4 hodin při konstantní hodnotě výkonu 30 W.

### **Barvení sekvenačního gelu**

Po ukončení separace provedeme samostatné barvení gelu bez skla následujícím způsobem:

1. Fixace fragmentů DNA na gel inkubací ve fixačním roztoku po dobu 5 minut za mírného třepání.
2. Inkubace skla s gelem v barvicím roztoku po dobu 7 minut.
3. Opláchnutí gelu 1x deionizovanou vodou.
4. Vyvíjení gelu v roztoku vývojky dokud nejsou patrné fragmenty DNA (cca 10 minut).
5. Zastavení vyvíjecí reakce inkubací ve fixačním roztoku po dobu 5 minut.
6. Obarvený gel je inkubován po dobu 3 hodin v 30% roztoku glycerolu a následně je vysušen mezi dvěma celofánovými foliemi

### **Roztoky a jejich složení:**

#### **Denaturační nanášecí pufr podle Benbouza *et al.* (2006)**

40 ml obsahuje:

38,19 ml formamidu (99,5%)

400  $\mu$ l 1M NaOH

1,41 ml sterilní 2x deionizovaná H<sub>2</sub>O  
20 mg bromfenolové modři - sodná sůl (Serva, SRN)  
20 mg xylencyanolové modři FF (Sigma, USA)

### **Zásobní roztok na přípravu 8 % polyakrylamidového nedenačného gelu**

240 ml roztoku obsahuje:

48 ml 40% směsi s poměrem akrylamidu : bis-akrylamidu 37,5:1  
12 ml 10x TBE  
24 ml glycerolu (výsledná koncentrace glycerolu je 10%)

Aby došlo k polymerizaci, je nutné při konečné přípravě přidat:

2400 µl 10% persíranu amonného  
240 µl Temedu

Doplnit 1x deionizovanou H<sub>2</sub>O do objemu 240 ml.

Poznámka: při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných latexových rukavicích

### **Fixační roztok podle Benbouza *et al.* (2006)**

5 ml ledové kyseliny octové  
100 ml čistého nedenačrovaného ethanolu (96%)  
895 ml 1x deionizovaná H<sub>2</sub>O

### **Barvicí roztok**

1,5 g AgNO<sub>3</sub>  
1000 ml 1x deionizované H<sub>2</sub>O  
Těsně před použitím přidat 3 ml formaldehydu

Poznámka: připravit vždy čerstvý, používat vždy ochranné latexové rukavice

## Příloha č. 6 - ADHD dotazník validovaný pro majitele psů

### Dotazník pro majitele psů, kterým byl odebrán vzorek DNA

Otázky v dotazníku jsou zaměřeny na schopnost psa se soustředit a jeho aktivitu a impulzivitu.

Jméno psa (dle PP): \_\_\_\_\_

Pohlaví:       pes    fena      Datum narození psa: \_\_\_\_\_

<b>Prosím vyznačte jak často projevuje Váš pes následující chování:</b>		<b>Nikdy</b>	<b>Občas</b>	<b>Často</b>	<b>Velmi často</b>
1.	Můj pes má potíže s učením, protože je nepozorný nebo je jeho pozornost snadno odvedena jinými podněty:	0	1	2	3
2.	Je snadné upoutat pozornost mého psa, ale brzy ztratí zájem:	0	1	2	3
3.	Soustředit se na cvik nebo hru je pro mého psa obtížné:	0	1	2	3
4.	Můj pes opouští místo, kde měl zůstat:	0	1	2	3
5.	Můj pes neumí být v klidu, je těžké ho uklidnit:	0	1	2	3
6.	Můj pes je neposedný:	0	1	2	3
7.	Zdá se, že pes často neposlouchá, i když ví, že na něj někdo mluví:	0	1	2	3
8.	Můj pes je divoký, hůře ovladatelný, když vyrazí vpřed, je těžké ho udržet:	0	1	2	3
9.	Můj pes by si pořád hrál a běhal:	0	1	2	3
10.	Lehké úkoly vyřeší můj pes snadno, ale často má problémy se složitými cviky, i když je zná a často s ním byly procvičovány:	0	1	2	3
11.	Ve vykonávání cviků selhává, protože má tendenci reagovat zbrkle:	0	1	2	3
12.	Pozornost mého psa může být snadno rozptýlena	0	1	2	3
13.	Neumí čekat, protože nemá kontrolu nad sebou samým:	0	1	2	3