

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Detekce mutace genu *VPS13B* zodpovědné za syndrom
uvězněných neutrofilů u vybraných plemen psů
využívaných pro asistenční aktivity**

Bakalářská práce

Autor práce: Lucie Zemanová

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Detekce mutace genu *VPS13B* zodpovědné za syndrom uvězněných neutrofilů u vybraných plemen psů využívaných pro asistenční aktivity" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15.4.2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za pomoc při vypracování této práce a za jeho odborné znalosti, které jsem mohla využít při psaní této bakalářské práce, dále bych chtěla poděkovat Ing. Daniele Čílové, která mi byla nápomocná v laboratoři a která mi vždy pomohla a vše ochotně vysvětlila.

Detekce mutace genu *VPS13B* zodpovědné za Syndrom uvězněných neutrofilů u vybraných plemen psů využívaných pro asistenční aktivity

Souhrn

Tato bakalářská práce na téma „Detekce mutace genu *VPS13B* zodpovědné za syndrom uvězněných neutrofilů u vybraných plemen psů využívaných pro asistenční aktivity“ začíná literární rešerší dané problematiky a následně pokračuje experimentální částí, která byla provedena na katedře genetiky a šlechtění.

V literární rešerši je majoritní část zaměřena na Syndrom uvězněných neutrofilů a na Cohenův syndrom. Oba tyto syndromy jsou způsobeny mutací stejného genu a z tohoto důvodu je pes vhodným genetickým modelem pro výzkum lidského onemocnění. Z literární rešerše je jednoznačné, že Syndrom uvězněných neutrofilů je autozomálně recesivní onemocnění a je způsobeno deleční mutací 4 bází (GTTT) na 13. chromozomu v exonu 19. Tato mutace se objevuje pouze u plemene border kolie. Syndrom uvězněných neutrofilů způsobuje velmi závažné poruchy jedinců, pro které je ve většině případů toto onemocnění letální. Pokud jedinci s touto mutací přežijí první týdny života, žijí pouze velmi krátký a nekvalitní život. Trpí průjmy, horečkami, zvracením a také mají typické “fretkoidní“ protažené tlamy.

Experimentální část je zaměřena na izolaci DNA z bukových stěrů jedinců plemen border kolie, zlatý retrívr, labradorský retrívr a Nova Scotia duck tolling retrívr, vytvoření PCR markerů a následnou sekvenaci získaných PCR amplikonů.

Výsledky experimentální části potvrdily hypotézy, že kauzální mutace je ovlivněna plemennou příslušností a lze ji snadno identifikovat sekvenací PCR amplikonů.

Klíčová slova: pes domácí, *Canis lupus f. familiaris*, Syndrom uvězněných neutrofilů, *VPS13B*, mutace, PCR, sekvenace

Detection of *VPS13B* gene mutation responsible for Trapped neutrophil syndrome in selected dog breeds used for assistance activities

Summary

This bachelor thesis „Detection of *VPS13B* gene mutation responsible for Trapped neutrophil syndrome in selected dog breeds used for assistance activities“ starts with theoretical part and continue with experimental part, which had done in Department of genetics and breeding.

The theoretical part is focused on Trapped neutrophil syndrome and Cohen syndrome. Both of these syndromes are caused by mutation of same gene and this is the reason, why a dog is a suitable genetic model for human disease research. Based on the theoretical part is obvious that Trapped neutrophil syndrome is a autosomal recessive genetic disease and is caused by deletion of 4 bases (GTTT) on 13th chromosome in 19th exon. This mutation is only in border collie breed. The Trapped neutrophil syndrome causes very serious problems and for individuals these problems may be lethal. If they survive, they have a very poor quality life. They have diarrhoea, pyrexia, vomite and have a typical facial „ferret-like“ snout.

The experimental part is focused on isolation DNA from buccal mucosa of border collie breed, golden retriever, labrador retriever and Nova Scotia duck tolling retriever, than it is focused on design PCR markers and sequencing PCR amplicons.

The experimental results had confirmed hypothesis that the causal mutation is affected by pedigree and it is easy to identificate it by sequencing PCR amplicons.

Keywords: dog, *Canis lupus f. familiaris*, Trapped neutrophil syndrome, *VPS13B*, mutation, PCR, sequencing

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíl práce.....	10
2.1. Vědecké hypotézy	10
2.2. Konkrétní cíl práce	10
3. Literární rešerše.....	11
3.1. Pes domácí a jeho domestikace	11
3.1.1. Domestikace psa	11
3.1.2. Pes domácí	11
3.2. Genom psa	12
3.3. Častá plemena psů využívaná pro asistenční aktivity.....	13
3.3.1. Border kolie (BOC).....	13
3.3.1.1. Popis plemene BOC.....	13
3.3.1.2. Typická onemocnění plemene BOC.....	14
3.3.2. Německý ovčák (NO)	14
3.3.2.1. Popis plemene NO	14
3.3.2.2. Typická onemocnění plemene NO	14
3.3.3. Labradorský retrívr (LR).....	15
3.3.3.1. Popis plemene LR.....	15
3.3.3.2. Typická onemocnění plemene LR.....	15
3.3.4. Zlatý retrívr (GR).....	16
3.3.4.1. Popis plemene GR	16
3.3.4.2. Typická onemocnění plemene GR	16
3.4. Laboratoře a poskytované metody	16
3.5. PCR reakce	18

3.5.1.	Základní informace.....	18
3.5.2.	Princip PCR reakce.....	18
3.5.3.	Reakční fáze amplifikace.....	19
3.6.	Syndrom uvězněných neutrofilů	19
3.6.1.	Popis genetického onemocnění.....	19
3.6.2.	Studie syndromu a základní poznatky	20
3.6.3.	Příznaky syndromu.....	21
3.6.4.	Testování psů	21
3.7.	Cohenův syndrom	23
3.7.1.	Objevení Cohenova syndromu a jeho studie	23
3.7.2.	Vývoj jedince s Cohenovým syndromem	25
4.	Metodika	26
4.1.	Plemena využívaná pro asistenční aktivity a vybraná ke genetickému testování ...	26
4.2.	Izolace DNA z bukalních sliznic.....	32
4.3.	Posouzení kvality a kvantity izolované DNA	34
4.4.	Navržení PCR primerů VPS13B-CZU1-F a VPS13B-CZU1-R pro detekci deleční mutace s využitím kapilární elektroforézy	35
4.5.	Navržení PCR primerů VPS13B-CZU2-F a VPS13B-CZU2-R pro sekvenaci exonu 19 genu <i>VPS13B</i>	36
4.6.	Podmínky amplifikace exonu 19 genu <i>VPS13B</i> s využitím primerů VPS13B-CZU1-F a VPS13B-CZU1-R	38
4.7.	Podmínky amplifikace exonu 19 genu <i>VPS13B</i> s využitím primerů VPS13B-CZU2-F a VPS13B-CZU2-R	40
4.8.	Detekce deleční mutace pomocí kapilární elektroforézy	40
4.9.	Sekvenační analýza amplikonu	42
4.9.1.	Purifikace produktů separovaných v agarózním gelu	42
4.9.2.	Sekvenační reakce	42
4.9.3.	Čistění produktů sekvenační reakce.....	43

5. Výsledky.....	44
5.1. Výběr plemen a jejich predispozice k onemocnění TNS.....	44
5.2. Optimalizace PCR markerů genu <i>VPS13B</i>.....	44
5.3. Detekce kauzální mutace genu <i>VPS13B</i> pomocí kapilární elektroforézy	46
5.4. Sekvenace ampliconů markeru genu <i>VPS13B</i>	47
5.5. <i>In silico</i> analýza	48
5.5.1. <i>In silico</i> ověření použitých primerů.....	48
5.5.2. <i>In silico</i> identifikace místa kauzální mutace genu <i>VPS13B</i> a následné změny syntetizovaného proteinu.....	50
5.5.3. <i>In silico</i> porovnání ortologů genu <i>VPS13B</i>	51
6. Diskuze	53
6.1. Volba modelových plemen	53
6.2. Metody izolace DNA	53
6.3. Navržení PCR markerů genu <i>VPS13B</i> pro detekci mutace fragmentační analýzou pomocí kapilární elektroforézy	54
6.4. Navržení PCR markerů genu <i>VPS13B</i> pro sekvenaci	54
6.5. Detekce mutace genu <i>VPS13B</i> pomocí kapilární elektroforézy	54
7. Závěr	57
8. Literatura.....	59
8.1. Vědecké, odborné a knižní publikace.....	59
8.2. Internetové zdroje	62

1. Úvod

Pes domácí (*Canis lupus f. familiaris*) je nejvíce rozšířeným domestikovaným zvířetem. Byl vyšlechtěn z vlka. Tato domestikace začala již před zhruba 15 000 lety a dnes je tento savec rozšířen na všech kontinentech. Je úzce vázán na člověka a v dnešní době je využíván v mnoha směrech. Většina z nás ho zná jako společníka doma či na zahradě, dále se využívá při lovu, můžeme ho vycvičit na záchranáře, obránáře nebo jako vyhledavače různých pachů. V dnešní době se pes často využívá jako asistent pro lidi, kteří sami na běžné životní úkony nestačí.

Pes vycvičený v asistenta může handicapovaným posloužit jako jejich chybějící smysl. Nevidomým či slabozrakým nahrazuje oči, pomáhá jim jako průvodce při běžných denních cestách, kde si nejsou úplně jisti terénem. Lidem na vozíku může pomoci jako prodloužená ruka a podává jim spadané věci, dále sundává oblečení, které by si sami s obtížemi sundali. Asistenční pes také může fungovat jako psychická opora a pomáhá rozvíjet opožděné jedince, ať už se jedná o fyzioterapeutického psa, kdy se tělo klienta prohřívá tělem psa nebo psa společníka, který pomáhá dětem s logopedickou vadou, aby se více rozmluvily.

Pro mnohé z nás je pes neodmyslitelným partnerem v životě, tím pádem je pro nás jeho zdraví a genetická stránka velmi důležitá. Ne z důvodu, že bychom zatracovali nemocná zvířata, ale proto, aby s námi náš partner a společník zůstal co nejdéle.

Celý psí genom byl rozluštěn v roce 2004 a proto už není těžké zkoumat určité genetické predispozice a onemocnění. Je mnoho způsobů jak získat DNA z organismů, ale u psů se nejvíce využívají rozbory chlupů, stěry z bukálních sliznic nebo rozbory krve. Dále se mohou dělat i odběry tělních buněk, ale pro mnohé výzkumy to není potřeba. Postačí méně invazivní odběry vzorků, u kterých záleží hlavně na způsobu odběru a tím pádem na kvalitě odebraného vzorku.

Tato bakalářská práce se zabývá detekcí mutace, která způsobuje delecii 4 bází a ta má za následek neutropenii a jiné komplikace, která je ve většině případů pro čerstvě narozená štěňata letální, popřípadně psi žijí méně kvalitní život s brzkým úmrtím. Tato mutace se dá zjistit ze vzorku DNA, kde se prokáže daná delecce.

2. Cíl práce

Syndrom uvězněných neutrofilů je v současnosti poměrně dobře geneticky prostudované onemocnění psů. Při výběru tohoto tématu bylo vybráno několik vědeckých hypotéz, dle nich byly vytvořeny cíle, které byly potvrzeny nebo vyloučeny.

2.1. Vědecké hypotézy

- Mutace genu *VPS13B* je považována za kauzální pro vznik tohoto onemocnění.
- Lze předpokládat, že výskyt kauzální mutace genu *VPS13B* může být ovlivněn plemennou příslušností.
- Mezi plemena s vysokou frekvencí výskytu tohoto onemocnění patří border kolie.
- Techniky molekulární genetiky umožňují tyto mutace identifikovat na úrovni sekvenace PCR amplikonů nebo pomocí genetických markerů.

2.2. Konkrétní cíl práce

- Vypracovat ucelený literární přehled zaměřený na genetické příčiny Syndromu uvězněných neutrofilů u psů a možnosti detekce kauzální mutace.
- Navrhnout PCR markery, které umožní detekovat kauzální delecí genu *VPS13B* na základě délkového polymorfismu pomocí kapilární elektroforézy.
- Sekvenační analýzou potvrdit specifčnost navržených markerů.
- Zpracovat *In silico* analýzu sekvence genu *VPS13B*.

3. Literární rešerše

3.1. Pes domácí a jeho domestikace

3.1.1. Domestikace psa

Price (1984) tvrdí, že domestikace je postupná adaptace člověkem držených zvířat na něj a na jeho způsob života. Také říká, že domestikace přinesla mnoho fenotypových změn a proto se domestikovaní jedinci liší od svých původních předků.

Francis Galton ve své studii z roku 1865 (Galton, 1865) formuloval podmínky, které musí zvíře splňovat, aby mohlo být domestikováno.

- Odolnost – zvíře se musí umět přizpůsobit novému prostředí, přežít v něm a rozmnožovat se v něm.
- Přichylnost k člověku – zvíře musí sebou nechat manipulovat a podvolit se lidské vůli, i když se mu nechce a často jde o tvrdou práci.
- Touha po pohodlí – až zvíře zjistí, že je život s člověkem lepší, než ve volné přírodě, bude se chovat klidněji.
- Užitečnost pro člověka – zvíře musí být pro člověka atraktivní a užitečné, aby mělo význam pro domestikaci.
- Snadné rozmnožování – zvíře musí být ochotno se rozmnožovat i v zajetí, aby mohlo být domestikováno.
- Ochočitelnost – zvíře musí být lehce manipulovatelné, i přes vliv velkého stáda.

3.1.2. Pes domácí

Divocí i domácí psi patří do stejné taxonomické skupiny čeledi *Canidae* (psovití). Vznik této skupiny sahá do období před 50 miliony let (Ostrander et Wayne, 2005). Poté se tato skupina rozdělila do 35 skupin, které známe dodnes. Geneticky jsou si tyto skupiny velice podobné. Karyotypy (soubory chromozomů v jádře) jsou rozdílné (pohybují se od 36 až 78 chromozomů), ale všechny tyto kombinace jsou složeny z karyotypu jejich společného předka

(Nash et al., 2001). Ostrander a Wayne (2005) tvrdí, že pes domácí (*Canis lupus*) se vyvinul jako poslední z těchto 35 skupin a patří do rodu *Canis*.

Rod *Canis* se morfologicky vyznačuje 42 zuby, mohutnými trháky a velkými špičáky, pětiprstými předními a čtyřprstými zadními končetinami. Převážně se jedná o masožravce a velmi úspěšné smečkové lovce. Dále mají výborný čich, díky kterému jsou nedocenitelnými pomocníky lidem v současnosti (Císařovský, 2008).

Dříve se předpokládalo, že v dnešní době tolik známých plemen psů, muselo vzniknout z mnoha psovitých šelem, ale až moderní analýza mitochondriální DNA ukázala, že jediný předek psa domácího je vlk obecný (*Canis lupus*) (Villa et al., 1997) a později byl překlasifikován z *Canis familiaris* na *Canis lupus familiaris* (Císařovský, 2008). Lindblad-Toh et al. (2005) popsali genom psa a dokázali, že vlk a pes jsou si nejbližšími příbuznými a liší se pouze v 0,04 % - 0,21 % genetické informace. Dále se tyto dva jedinci mohou pářit s dalšími příbuznými a to s kojotem a šakalem.

3.2. Genom psa

Psí genom byl poprvé kompletně rozluštěn v roce 2004 vědkyní Kirsten Lindblad-Toh a jejím týmem z harvardského institutu, výsledky publikovali o rok později. Lindblad-Toh et al. (2005) zkoumali psí genom na feně boxera jménem Tasha. Plemeno boxera bylo vybráno z důvodu jeho prošlechtěnosti, tedy ustálené genové výbavě.

Odhalili, že psí genom se skládá z necelé 2,5 miliardy párů bází. Také objevili zhruba 2,5 milionů SNP (single nucleotide polymorphisms). Mapa těchto SNP nám umožňuje studovat genom psa a pomáhá rozpoznávat geny ovlivňující jeho zdraví. Identifikace psího genomu nám pomohla při dalším zkoumání dědičných onemocnění, různorodosti plemen či příbuznosti s vlkem. Ostrander a Wayne (2007) tvrdí, že se pes stal během posledních staletí významným partnerem v lidském životě, kde byl vystaven častému křížení, a proto vzniklo na 400 plemen. Aby nějaké plemeno bylo ustálené, muselo se přistoupit k příbuzenskému křížení, aby se zafixovaly určité rysy. Toto úzké křížení má za následek mnoho dědičných chorob a zdravotních problémů.

Dále Lindblad-Toh et al. (2005) v této studii publikovali fakt, že psi a lidé mají asi 5,3% společných prvků, které přetrvaly v genetické informaci i přes mnohaletý vývoj a selekci. Tyto prvky se dále nacházejí pravděpodobně i u jiných savců, protože byly nalezeny i u myši. Pes je proto často využívaným modelovým organismem, pro výzkumy lidských onemocnění.

3.3. Častá plemena psů využívaná pro asistenční aktivity

3.3.1. Border kolie (BOC)

3.3.1.1. Popis plemene BOC

Podle klasifikace je toto plemeno řazeno do skupiny plemen ovčáckých, pasteveckých, honáckých. Jedná se o psy velmi inteligentní, učenlivé a pracovitě. Pro toto plemeno je známý jeho stádní instinkt (Mcleavy, 2008). Velmi často se silně citově poutají ke svému pánovi. Je to středně velké plemeno, s krátkou i středně dlouhou srstí (dlouhá v dnešní době převládá). Barva srsti není omezena, ale nesmí převládat bílá barva (obrázek 1). Border kolie byla vyšlechtěna pro ovčácké povinnosti na pomezí Anglie a Skotska (Mooreová, 2002). K výběru kvalitního ovčáckého psa se ve Velké Británii pořádaly soutěže dovedností a pasení (tzv. Sheepdog trials – první se konal už v roce 1873). Toto plemeno bylo oficiálně uznáno až v roce 1976 The Kennel clubem, FCI toto plemeno uznalo 24. 6. 1987 (Fogle, 1995).

Pro jejich energickou povahu se BOC využívají zejména na pasení, agility, dogdancing, frisbee, flyball, obedience, záchranářský výcvik, coursing, dogtrekking. Na druhou stranu pro jejich milou povahu, empatii a inteligenci se využívají jako canisterapeutičtí psi a psi asistenční. Všechny tyto údaje jsou sepsané v plemenném standardu (Verhoef-Verhallen, 2002).

Obrázek 1 Plemeno border kolie (dostupné z <http://www.bcccz.cz/oplemeni.htm>)



3.3.1.2. Typická onemocnění plemene BOC

V současnosti je podle klubu border kolií (www.bccc.cz) povinné chovné BOC vyšetřit na pohybové onemocnění - dysplazii kyčelního kloubu (DKK), dysplazii loketního kloubu (DLK) a osteochondrózu ramenního kloubu (OCD), které jsou zjistitelné rentgenem. Pokud jedinec vykazuje dysplazii, neznamená, že je automaticky vyřazen z chovu. Posuzovatel těchto onemocnění ohodnotí míru dysplazii a poté udělí schopnost/neschopnost. Také musí mít vyšetření zraku - vyšetření očního pozadí, které vyloučí glaukom, anomálii oka (CEA) a progresivní atrofii sítnice (PRA). Nemocní jedinci jsou vyřazeni z chovu. Dále se povinně vyšetřuje dědičné onemocnění Syndrom uvězněných neutrofilů (TNS), u kterého je podmínkou, aby alespoň jeden z rodičů byl TNS normal, tedy nenesl mutovanou alelu (Verhoef-Verhallen, 2002).

3.3.2. Německý ovčák (NO)

3.3.2.1. Popis plemene NO

Jedná se o plemeno velmi učenlivé a inteligentní stejně jako kolie. Také má pevné nervy a je sebevědomý, ovladatelný, pozorný a dobromyslný. Má všestranné vlohy, proto se často využívá jako hlídač, obránář, ale i jako pracovní pes, zejména jako záchranář nebo vyhledávač pachů či osob. Ovčák je velmi oddaný a věrný a z těchto důvodů se využívá jako pes vodící. Velmi se proslavil ve válečném období (Štěpánský, 1974). Je to plemeno střední velikosti s černou, šedou či rezavou barvou, která může být samostatně nebo jako tmavý základ s rezavými či světlými odznaky (Raber, 1994).

3.3.2.2. Typická onemocnění plemene NO

U toho plemene se nejvíce vyskytuje dysplazie (Nečas a Griffon, 2004). Jako u BOC se jedná o dysplazii kyčelního kloubu a dysplazii loketního kloubu (Beránek, 2005). Pro uchovnění je povinné podle klubu chovatelů německého ovčáka (www.ceskyklub-no.cz) mít

jedince vyšetřeného na DKK a také geneticky potvrzené rodičovství. Pro posouzení RTG snímků platí stejná pravidla jako u BOC.

3.3.3. Labradorský retrívr (LR)

3.3.3.1. Popis plemene LR

Toto plemeno je všestranné, ale zejména je přátelské, inteligentní, oddané, přizpůsobivé a nekonfliktní. Také je hravý, má výborný čich a miluje vodu (Kubeš a Korda, 1998). V dnešní době se využívá jako obranář, stopař, vyhledavač drog, vodní záchranář nebo jako asistenční pes. Labrador má krátkou srst ve žluté, čokoládové a černé barvě. U tohoto plemene se často vyskytuje problém s nadváhou a proto je potřeba mu věnovat dostatek pohybu a aktivit. Do dnes se všeobecně má za to, že je LR původně z Grónska, kde bývali viděni rybáři s těmito psy využívanými k lovu ryb (Duke, 2001). Svou proslulost LR získal na konci 19. století v Anglii na poli Field trialů (zkouška loveckých psů). Ve skutečnosti není toto plemeno příliš staré, jeho chovatelský klub se zformoval až v roce 1916 a v roce 1925 vznikl Klub žlutých retrívrů (Yellow Labrador club) (Duke, 2001).

3.3.3.2. Typická onemocnění plemene LR

LR je stejně jako NO dobře znám pro své pohybové problémy. Podmínkou pro chov je vyšetření DKK a DLK. Často jsou postiženy oba klouby najednou (Evans et White, 2014). Dysplazie kyčelního kloubu se hodnotí jako u BOC, ale jakákoli dysplazie loketního kloubu nevyřazuje z chovu podle klubu chovatelů retrívrů (www.retriever-klub.cz), ale musí být zapsána v průkazu původu. Doporučuje se labradorům každoročně vyšetřovat oční pozadí, také by měl být alespoň jeden rodič normální (clear) v onemocnění progresivní atrofie sítnice (Sova, 1987).

3.3.4. Zlatý retrívř (GR)

3.3.4.1. Popis plemene GR

Tento retrívř je velmi přátelský, laskavý, přítulný a důvěřivý. Také je velmi poslušný, inteligentní a má vrozené vlohy pro plnění různých úkolů (Nohelová, 2013). Stejně jako LR patří do skupiny retrívřů a proto jsou si v mnoha věcech podobní. Vzhledově ho od labradora rozeznáme díky jeho delší lehce zvlněné srsti a také se objevuje pouze ve zlaté nebo béžové barvě (Faltusová, 2010). Stejně jako labrador, zlatý retrívř miluje vodu a proto je často cvičen k vodním sportům, také se často využívá jako asistenční pes pro jeho klidnou a mírumilovnou povahu. Toto plemeno bylo také vyšlechtěno koncem 19. století v Anglii především jako donašeč vodního ptactva (Boneham, 2006).

3.3.4.2. Typická onemocnění plemene GR

Taktéž jako labrador toto plemeno bojuje s dysplaziemi kyčle a lokte, proto pro něho platí stejná pravidla v chovu (Bauer, 1997). Toto onemocnění se vyšetřuje pomocí rentgenu (Schneidermannová, 1999). U zlatého retrívřa je doporučeno provést oftalmologické vyšetření oka pro onemocnění PRA, GR-PRA (atrofie sítnice u zlatých retrívřů) a dále rentgenové vyšetření na OCD (www.retriever-klub.cz).

3.4. Laboratoře a poskytované metody

V České republice najdeme pouze pár certifikovaných laboratořích, které nabízí širokou škálu diagnostik. Některé veterinární ordinace mají vlastní laboratoře a jsou si schopny vyšetřit daný materiál. Většinou se jedná o jednoduché diagnostiky a stačí na ně pouze menší přístroje, které nejsou tolik finančně náročné.

Ve specializovaných laboratořích se často setkáváme s diagnostikou celkového genetického profilu, testy otcovství a mateřství, testy dědičných chorob, testy pro barvu a strukturu srsti, dále se diagnostikuje přítomnost patogenů a čistokrevnost.

Mezi nejznámější laboratoře patří Genomia, která jako jediná v České republice nabízí testování Syndrom uvězněných neutrofilů (TNS). Tato laboratoř se zaměřuje na lidi, psi, kočky, koně, ptáky, klisťata a skot. Dá se také objednat balíček vyšetření, kde je analýza genu VPS spojena ještě s další či dalšími analýzami. Na obrázku 2 se nachází zpráva z vyšetření detekce mutace genu *VPS13B*. Více informací na www.genomia.cz.

Obrázek 2 Zpráva o výsledku zkoušky detekce mutace genu *VPS13B*

GENOMIA
genetic laboratory

Zpráva o výsledku zkoušky #012345:

Detekce mutace g.4411956_441190delGTTT genu VPS13B způsobující onemocnění TNS u plemene border kóllí metodou fragmentační analýzy

Vyšetřovaný
Vzorek: 08-12345
Jméno: Lassie DEMO
Rasa: ---
Tetovací číslo: 1392013
Mikročip: 123456789012345
Registrační číslo: REGQ12345
Datum narození: 31.12.1909
Pohlaví: samice
Datum přijetí vzorku: 25.11.2008
Vyšetřovaný materiál: krev
Při odběru byla ověřena identita jedince.

Zákazník
Jan Novák
Dlouhá 1
30000 Plzeň
Czech Republic

Výsledek: Mutace nebyla detekována (N/N)

Vysvětlivky: N/N = normální genotyp. N/P = přenašeč mutace. P/P = mutovaný genotyp (u jedince se s největší pravděpodobností projeví onemocnění). (N = negativní; P = pozitivní)

Komentář k výsledku

Byla vyšetřena přítomnost či absence deleční mutace g.4411956_4411960delGTTT v exonu 19 genu VPS13B způsobující syndrom uvězněných neutrofilů (Trapped Neutrophil Syndrome, TNS) u psů plemene border kóllie. Mutace narušuje správnou funkci skupiny bílých krvinek – neutrofilů, které se podílí na odstraňování bakteriálních infekcí a jsou důležitými účastníky akutní fáze zánětu. Selhávání imunity se projevuje u štěňat již ve věku dvou týdnů po narození a štěňata umírají nebo bývají utrácena ve věku okolo 4 měsíců. Prvními příznaky mohou být apatie, nechutenství, průjmy či špatná pohyblivost. Další příznaky závisí na druhu infekce, s kterou daný jedinec bojuje.

Mutace způsobující TNS u border kóllí je děděna autosomálně recesivně. Nemoc se projeví jen u jedinců P/P, kteří mají mutaci v obou kopiích VPS13B genu. Přenašeči mutovaného genu N/P jsou klinicky zdraví, ale mohou přenášet mutaci na své potomky. V případě krytí dvou heterozygotních jedinců (N/P) bude teoreticky 25 % potomků zcela zdravých (N/N), 50 % potomků přenašečů (N/P) a 25 % potomků (P/P) zdědí od obou rodičů mutovaný gen a bude postiženo TNS.

Metoda: SOP88, akreditovaná metoda
Senzitivita metody (pravděpodobnost, že byla správně detekována mutovaná alela v genu u heterozygota nebo mutovaného homozygota) je vyšší než 99%. Specifita metody (pravděpodobnost, že byla správně detekována zdravá alela v genu u heterozygota nebo zdravého homozygota) je vyšší než 99%.

Datum vystavení zprávy: 25.11.2008
Jména odpovědných osob: Jméno Příjmení, analytik

Dále v České republice najdeme laboratoř GenRex, která má v nabídce méně analýz. Nabízí paternitu, čistokrevnost, dále testuje délku srsti, celkový genetický profil, dědičné choroby jako jsou dwarfismus, degenerativní myelopatie a maligní hypertermie. Více informací na www.genrex.cz. V této laboratoři pracují laborantky, které pracují na Fakultě tropického zemědělství ČZU v Praze a zde se zabývají výzkumem genetiky

Československého vlčáka a jeho hybridů s vlky.

Jednou z veterinárních ordinací v České republice, která nabízí genetické testování je Genservice, s.r.o., kde testují pro jiné ordinace rodičovství a příbuznost, určují pohlaví a dědičné choroby a také archivují DNA v DNA bance. Více informací na www.almara.cz/genservice/.

Pro detekci mutace genu *VPS13B* se také využívají laboratoře v cizině. Podle klubu chovatelů border kolií se vzorky mohou zasílat do laboratoře Laboklin, která se nachází v Německu, ale nabízí celý servis v češtině a má také české konto (www.laboklin.de). Dále se majitelé mohou obrátit na laboratoř OptiGen, která se nachází v USA a zabývá se pouze genetikou psích plemen. Její členové jsou odborníci v oborech oftalmologie, molekulární diagnostiky a genetiky (www.optigen.com).

3.5. PCR reakce

PCR reakce se řadí mezi nejvíce využívané metody genetické diagnostiky a z tohoto důvodu byla použita v této bakalářské práci.

3.5.1. Základní informace

Polymerázová řetězová reakce je metoda rychlé amplifikace (zmnožení) úseku DNA (Innis et al., 1990). Aby mohl být amplifikován určitý úsek DNA, musí být ohraničen primery (oligonukleotidy – fragmenty DNA o 20-25 nukleotidech) (Alberts et al., 2005). Samotná syntéza je provedena termostabilní polymerázou, v dnešní době nejvíce se používá Taq polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Při PCR metodě se využívá cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci DNA (rozvolnění dvoušroubovice), nasedání primerů a syntézu DNA.

3.5.2. Princip PCR reakce

Při PCR reakci se vychází ze stejného principu jako při syntéze DNA při replikaci DNA v buňce. Proběhne denaturace dvouvláknové molekuly DNA a naváže se primer. Navázaný primer na jednovláknovou DNA tvoří „odrazový můstek“ pro tvorbu nového komplementárního vlákna. Po vzniku nové dvouvláknové molekuly dochází opět k denaturaci, následného navázání primeru a poté k syntéze komplementárního vlákna. Tato

část PCR reakce probíhá většinou 30 - 35x. To znamená, že z jedné molekuly DNA je možné amplifikací získat 1 miliardu molekul DNA (Watson et al., 1998).

3.5.3. Reakční fáze amplifikace

- **úvodní denaturace** - molekula DNA se zahřeje na teplotu 94 – 98 °C. Při této teplotě se narušují vodíkové můstky mezi bázemi a molekula se rozvolní na dvě vlákna. Tato fáze probíhá 3 – 5 minut.
- **denaturace** – probíhá při 94 - 98 °C po dobu 30 sec až 1min
- **annealing (nasednutí primerů)** - teplota je snížena na 50 – 65 °C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Doba nasednutí je 30 sec.
- **syntéza DNA** – teplota syntézy je závislá na použité polymeráze, při Taq polymeráze je optimální teplota 72 – 80 °C po dobu 30 sec až 1 min. V této fázi dochází k syntéze vlákna od 5' konce k 3' konci.
- **závěrečná syntéza DNA** – probíhá při 72 - 80 °C po dobu 4 min, z důvodu dosyntetizování produktů (Snustad et Simmons, 2009).

Pro dostatečnou amplifikaci stačí 30 cyklů. PCR reakce probíhá v termocykleru, což je přístroj, který umožňuje během několika sekund měnit teplotu až o několik desítek stupňů Celsia (www.labguide.cz).

3.6. Syndrom uvězněných neutrofilů

3.6.1. Popis genetického onemocnění

Jedná se o druh dědičné neutropenie u border kolií, kdy jedinec vykazuje nízkou hladinu neutrofilů v krvi. Tato nízká hladina je způsobuje tím, že se z kostní dřeně neuvolňují vytvořené neutrofilů a ty potom v krvi chybí a jedinci mají oslabenou imunitu (Allan et al., 1996). Štěňata s tímto syndromem se vyznačují změněnou morfologií hlavy („fretkoidní tvar“), oslabená imunita se projevuje průjmami a zvracením, horečkou a jinými příznaky (Mizukami et al., 2012a). Do nedávna se o tomto onemocnění nevědělo, protože štěňata s

tímto onemocněním byla brána pouze jako „ta slabší“ z vrhu a byla léčena na určitý příznak, který vykazovala (www.bcccz.cz).

3.6.2. Studie syndromu a základní poznatky

Syndrom uvězněných neutrofilů byl původně objevený u psů z Nového Zélandu a Austrálie (Allan et al., 1996), ale poprvé molekulárně diagnostikovaný byl v Japonsku o mnoho let později (Mizukami et al., 2012a). Do té doby nebyla publikovaná žádná studie z Anglie, přestože tam aktivně probíhá screeningový program (Shearman et Wilton, 2011). Možná to bude tím, že border kolie jsou známy spíše pro jiný syndrom, než je Syndrom uvězněných neutrofilů (například Grey Collie Syndrom). Syndrom uvězněných neutrofilů je stejný jako Cohenův syndrom u lidí a zatímco daná mutace byla objevena (Shearman et Wilton, 2011) a dělají se na její výskyt testy, etiologie stavu psa ještě přesně známa není.

Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění, které se vyskytuje u plemene border kolie. Aby se tato mutace projevila, musí být jedinec v daném genu recesivní homozygot, pokud se jedná o heterozygota, jde o přenašeče, který sám onemocněním netrpí a pouze přenáší mutovaný gen. Syndrom způsobuje redukci počtů neutrofilů v krvi, z důvodu nevolňujících se krvinek do krevního oběhu a jejich uvěznění v kostní dřeni. Onemocnění se vyznačuje horečkou, neutropénií a špatnou kvalitou života v nízkém věku (Allan et al., 1996; Wouda et al., 2010; Mizukami et al., 2012a).

Zatímco u lidského syndromu se jedná o několik různých mutací, u psů se jedná pouze o jednu, a to o delecii 4 párů bází v exonu 19 genu *VPS13B* (g. 4411950 - 4411953delGTTT), což způsobuje změnu v syntéze proteinů. Během výzkumu v roce 2011 byla zjištěna frekvence přenašečů, která byla opublikována jako 16,9 % (Shearman et Wilton, 2011). Mizukami et al. (2012b) ve svém článku publikoval frekvenci 11,1 %. Tento rozdíl mezi frekvencemi je pravděpodobně způsoben velikostí souboru zkoumaných vzorků, Shearman a Wilton (2011) testovali 83 jedinců, zatímco Mizukami et al. (2012b) otestovali 441 jedinců. Shearman a Wilton (2011) také popsali jednotlivé frekvence přenašečů dle jejich státní příslušnosti – v USA bylo 16,5 %, v Austrálii 15,4 %, ve Finsku 13 %, v Německu 12,9 %, ve Velké Británii 11,3 % a v Holandsku 8,1 % přenašečů.

Dále se Shearman a Wilton (2011) domnívají, že rozdíl mezi stoprocentním výskytem mentální retardace u lidí s Cohenovým syndromem a méně častým výskytem u psů, se dá

vysvětlit tím, že variabilita mutací u lidí má větší šanci způsobit mentální retardaci. Také se u psů špatně dokazuje, že jedinec trpí mentální retardací.

3.6.3. Příznaky syndromu

Shearman a Wilton (2011) popisují, že štěňata zasažená tímto syndromem vykazují abnormální znaky na hlavě, zejména výrazné protažení lebky, které je popisováno jako „fretkoidního“ typu (obrázek 3). Dále jsou tito jedinci menší, než jejich sourozenci a trpí chronickými infekcemi, průjmy, zvraceními, horečkou, kulhavostí a oteklými klouby. Někteří vykazují příznaky už v 6. týdnu života, u zbylých jedinců se syndrom projeví ve 12. týdnu života, kdy špatně reagují na imunizaci. Některé případy mohou mít tak slabé příznaky, že se pes může dožít až dvou a více let bez diagnostiky tohoto syndromu.

Obrázek 3 Štěně border kolie s TNS (Mason et al., 2013)



3.6.4. Testování psů

Shearman a Wilton (2011) ve svém výzkumu sekvenovali exony 19 od 69 border kolí z pracovní linie a z výstavní linie (6 nemocných, 10 přenašečů a 47 jedinců, kteří nebyli nikdy testováni). Všechny 6 nemocných psů bylo homozygotních pro GTTT delecí a všech 10 přenašečů bylo heterozygotní. Ze 47 neznámých vzorků bylo 29 heterozygotních a 18 homozygotních pro normální sekvenci (dominantní homozygoti). Dále testovali 80 vzorků z

Norska a zjistili, že frekvence výskytu onemocnění je mezi 7 % až 8 %. Také testovali 5000 jedinců z Evropy, Spojených států amerických, Anglie, Austrálie, Nového Zélandu a Austrálie, kde 1100 jedinců bylo přenašečů a 30 nemocných. Z tohoto množství vzorků byla vypočtena frekvence mezi 0,04 a 0,08 na stát. Mutace se vyskytla u psů ze všech vybraných zemí a také u obou linií, které jsou geneticky izolované už 50 let, to znamená, že mutace je přítomna u tohoto plemene už dlouhou dobu a velké rozšíření této genetické mutace dokazuje, že byla přítomna už na začátku jejich šlechtění. Pokud by tato mutace byla přítomna již před šlechtěním, tak by se vyskytovala i u jiných plemen typu kolie jako je například Collie Eye Anomaly (anomálie oka u kolií). Mutace genu *VPS13B* nebyla zatím nalezena u jiného organismu a proto se pes stal prvním modelem pro výzkum. Dále zjistili, že se gen *VPS13B* nachází na 13. chromozomu, který obsahuje 63 exonů.

V roce 2014 Mason et al. (2014) vydali studii, kde testovali tři nemocné psy, kteří trpěli příznaky naznačující Syndrom uvězněných neutrofilů. Jednalo se o štěňata kolem 11. - 12. týdnů věku, dvě feny a jeden pes. Všechna štěňata při testování trpěla horečkou a měla oteklé klouby, také byla léčena antibiotiky, dále byla všichni menšího vzrůstu a vykazovala „fretkoidní“ vzhled. Psi podstoupili různá vyšetření, syndrom jim byl potvrzen a všem byla zjištěna neutropénie. Bylo zjištěno, že mutace genu *VPS13B* znemožňuje vypuštění zralých neutrofilů z kostní dřeně a v této části je obtížné zvolit terapii. Všechna štěňata dobře reagovala na podávání antibiotik a prednisolonu. Jedno štěně úspěšně přestalo užívat imunosupresiva a dalšímu štěněti se vedlo dobře po vysazení prednisolonu. Dvě ze tří štěňat byla stále naživu po 3 letech a 7 měsících. Třetí štěně žilo po studii 3 roky. Tato studie dokázala, že pokud je zvíře léčeno, může prožít kvalitní život.

Navzdory zdokonalování léčby nemocí, neutropénii nelze kvalitně léčit, proto infekce hraje hlavní roli v úmrtnosti mezi nemocnými psy.

Mizukami et al. (2012a) testovali 10 týdenní černobílé štěně vážící 3,5kg, které bylo přivezeno na soukromou kliniku kvůli apatičnosti, anorexii, horečce (40 °C), zvracení, polyurii a polydipsii. Dále štěně vykazovalo omezené posturální reakce, ale kožní a bolestivé reakce byly v normálu. Štěně bylo léčeno na kokcidiózu, zvracení a průjmy několik dní předtím u jiného veterináře a po podání léčiv se jeho stav zlepšoval. Při testování nebyly nalezeny žádné abnormality ve vyšetření moči, výkalů, očí a ani na rentgenu nebyly žádné nesrovnalosti. Štěně druhý den zemřelo. Pitva nebyla provedena, ale vědci se domnívají, že za smrt zvířete může septický šok. Z krevního vzorku byla provedena analýza, která prokázala, že dané štěně bylo homozygot pro mutaci způsobující Syndrom uvězněných neutrofilů a jeho oba rodiče byli heterozygoti (přenašeči) a štěně zdědilo mutovanou alelu od obou rodičů. Toto

je první případ v Japonsku, kdy byl Syndrom uvězněných neutrofilů molekulárně diagnostikován. Není jednoduché syndrom diagnostikovat, protože většina veterinářů příznaky považuje za infekci. Obyčejné testy je jako infekci potvrzují, proto je veterináři takto léčí. Léčba sice zabírá, ale nikdy není definitivním řešením, proto nejvhodnějším testem je genetický rozbor, který mutaci dokáže objevit.

Dle klubu chovatelů border kolií (BCCCCZ) lze TNS nechat vyšetřit v laboratoři Genomia (CZ), Laboklin (DEU) nebo OptiGen (USA).

3.7. Cohenův syndrom

Cohenův syndrom je založený na mutaci stejného genu (*COHI*) jako je u psů gen (*VPS13B*). Proto je pes, zejména border kolie, vhodným modelovým plemen pro výzkum dědičných onemocnění (Shearman et Wilton, 2011).

3.7.1. Objevení Cohena syndromu a jeho studie

Mezi roky 1968 a 1972 Dr. Cohen s kolegy ze Spojených států amerických pozorovali dva sourozence a dalšího pacienta s dříve neobjevenými projevy abnormality. O rok později, tj. 1973, byli všichni tři diagnostikováni jakožto jedinci s nově objeveným syndromem, který byl pojmenován po jeho objeviteli Dr. Cohenovi (Cohen et al., 1973). V dalších letech studie ukázaly na další 4 jedince, kteří vykazovali specifické abnormality (Carey et Hall, 1978).

Už v roce 1968 vědci Carey a Hall začali zkoumat tři pacienty pocházející z Finska, kteří vykazovali určité abnormality, které v dané době nekorespondovaly se známými syndromy. Jednalo se o mentální retardaci, hubené ruce a nohy, typické obličejové rysy (obrázek 4) a známky chorioretinální dystrofie. Až o deset let později, poté co viděl fotografie obličejů pacientů Carey a Hall, usoudili, že jejich pacienti mají Cohenův syndrom (Carey et Hall, 1978). Většina pacientů, která se do té doby identifikovala, byla z Finska (Norio et al., 1984). Všichni tito pacienti měli mentální retardaci, mikrocefálii, hypotonii, trpěli nemotorností a vykazovali rysy granulocytopenie. Také měli vysoce klenutá nebo vlnitá oční víčka, dlouhé husté řasy, husté obočí, výrazný kořen nosu, pootevřená ústa, malé až skoro žádné ušní lalůčky, husté vlasy s nízkou linií, často se také vyznačují mírnou syndaktylií a velký rozdíl mezi prvním a druhým prstem na noze.

Často se publikovaly výzkumy se stejnými příznaky jako má Cohenův syndrom, ale byly identifikované jako jiné syndromy, vlastní. Mirhosseini et al. (1972) publikovali výzkum, kde studovali dva bratry, kteří vykazovali podobné příznaky jako jedinci s Cohenovým syndromem. O třináct let později Mendez et al. (1985) studovali dvě sestry s „Mirhosseini – Holmes - Walton syndromem“. Tyto sestry i předešní bratři byli stejní jako jedinci s Cohenovým syndromem a tak vše naznačuje tomu, že se jedná o tentýž syndrom (Norio et Raitta, 1986). Diagnostikovaní jedinci byli většinou sourozenci, a ještě měli zdravé rodiče. Ukázalo se, že v pěti finských rodinách, kde byly děti s Cohenovým syndromem, byli rodiče příbuzní s ostatními rodiči. Cohenův syndrom je považován za autozomálně recesivní onemocnění, kdy se daný gen nachází na dlouhém rameni 8. chromozomu (Tahvanainen et al., 1994). Podle Kolehmainen et al. (2003) má gen, který se značí *COH1*, 62 exonů a může mít několik forem. Je dokázáno, že *COH1* má několik forem mutace. Tuto domněnku dokázal Seifert et al. (2008), který detekoval 13 různých mutací u 15 pacientů z devíti rodin.

Kivitie-Kallio a Norio (2001) publikovali ve svém článku výsledky výzkumu, kde se zaměřili na příznaky Cohena syndromu, které získali od 29 finských pacientů. Tyto výsledky potvrdily a ucelily dané příznaky tohoto syndromu. Stoprocentními příznaky jsou psychomotorická retardace, mikrocefálie, hypotonie, hypermobilita kloubů, pohybová nemotornost, vysoce klenutá nebo vlnitá oční víčka, krátké nosní philtrum, husté vlasy, nízká vlasová linie a granulocytopenie. Dále minimálně ze dvou třetin se objevují příznaky, jako jsou opožděná puberta, novorozenecké výživové problémy, dlouhé husté řasy, husté obočí, výrazný kořen nosu, vysoké ústní patro, úzké ruce a nohy a výrazný rozdíl mezi prvním a druhým prstem na noze (obrázek 4).

Obrázek 4 Jedinci trpící Cohenovým syndromem (Balikova et al., 2009)



3.7.2. Vývoj jedince s Cohenovým syndromem

Cohenův syndrom se projevuje rozdílně a také v jiném věku. Těhotenství probíhá normálně, avšak často matka může pozorovat slabší pohyby plodu. Diagnostika tohoto syndromu je u novorozenců těžká, protože vypadají normálně, obličejové rysy se nedají natolik rozpoznat v tomto období, pouze granulocytopenie je přítomna od narození. Kvalitnější diagnostika přijde až ve školním věku. Děti během prvního měsíce začínají trpět hypotonií, často se tento projev začíná řešit až mezi 6. a 12. měsícem, protože až tehdy si matka uvědomí, že něco není v pořádku a navštíví pediatra. V předškolním věku se začíná projevovat mentální retardace. Všichni nemocní jedinci se naučí chodit ve dvou až pěti letech života, ale mluva je velice opožděná. Všichni jedinci se sice naučí mluvit, ale pouze na nějaké nízké úrovni. V tomto období je velice důležitá terapie pro správný rozvoj řeči. Kolem pátého roku života se začínají projevovat v obličeji rysy typické pro tento syndrom. U nemocných se často objevuje myopie a tak jedinci nosí dioptrické brýle. Kvůli manuální retardaci nejsou schopni navštěvovat normální školu a tak musí navštěvovat školy speciální, avšak jejich retardace není progresivní a tyto děti se učí novým věcem. V pubertě, která je často opožděná, se myopie často zhoršuje a může dosahovat až kolem -6 dioptrií. V dospělosti se jedinci vyznačují předčasným stárnutím a často se k syndromu přidávají další onemocnění. Myopie se také zhoršuje, ale nikdy nebylo potvrzeno, že by dosahovala až k slepotě.

4. Metodika

4.1. Plemena využívaná pro asistenční aktivity a vybraná ke genetickému testování

Nedá se jednoznačně určit jaké plemeno je vhodné pro canisterapii nebo pro asistenci. Psi se vybírají dle jejich povahy a dle žádosti klienta, ne pro jejich plemennou příslušnost, či čistokrevnost. Není výjimkou, že se pro asistenci využívají nečistokrevná plemena, tzv. voříšci, popřípadě se záměrně kříží různá plemena pro maximální výtěžnost potřebných vlastností. Na druhou stranu, u psa s PP máme větší přehled nad jeho zdravotní stránkou. Někteří klienti mají raději menší psy, někteří větší, někteří živější a jiní zase klidnější. Všeobecně nejvíce můžeme vidět plemena jako je border kolie, německý ovčák a plemena skupiny retrívrů.

K testování v laboratoři bylo vybráno 98 jedinců plemene border kolie, z toho bylo 57 fen a 39 psů.

Dále bylo vybráno 91 jedinců plemen labradorský retrívr, zlatý retrívr, Nova Scotia duck tolling retrívr. Z tohoto množství plemen bylo 35 psů a 46 fen.

Výběr jedinců a výsledky zkoušek jsou uvedeny v tabulce 1-5.

Tabulka 1 Přehled vybraných plemen, jejich pohlaví a výsledků detekce mutace genu *VPS13B*

vzorek	sada	plemeno	♀/♂	mutace
1	A	border kolie	♀	N/N
2	A	border kolie	♀	N/N
3	A	border kolie	♂	N/N
4	A	border kolie	♂	N/N
5	A	border kolie	♂	N/N
6	A	border kolie	♂	N/N
7	A	border kolie	♂	N/N
8	A	border kolie	♀	N/N
9	A	border kolie	♀	N/N
10	A	border kolie	♀	N/N
11	A	border kolie	♂	N/N
12	A	border kolie	♀	N/N
13	A	border kolie	♀	N/N
14	A	border kolie	♂	N/N
15	A	border kolie	♂	N/N
16	A	border kolie	♀	N/N
17	A	border kolie	♂	N/N
18	A	border kolie	♀	N/N
19	A	border kolie	♂	N/N
20	A	border kolie	♀	N/N
21	A	border kolie	♂	N/N
22	A	border kolie	♀	N/N
23	A	border kolie	♂	N/N
24	A	border kolie	♀	N/N
25	A	border kolie	♀	N/N
26	A	border kolie	♀	N/N
27	A	border kolie	♂	N/N
28	A	border kolie	♀	N/N
29	A	border kolie	♀	N/DEL
30	A	border kolie	♂	N/N
31	A	border kolie	♀	N/N
32	A	border kolie	♂	N/N
33	A	border kolie	♂	N/N
34	A	border kolie	♂	N/N
35	A	border kolie	♀	N/DEL
36	A	border kolie	♂	N/N
37	A	border kolie	♂	N/N
38	A	border kolie	♀	N/N

Tabulka 2 Přehled vybraných plemen, jejich pohlaví a výsledků detekce mutace genu *VPS13B*

vzorek	sada	plemeno	♀/♂	Mutace
39	A	border kolie	♂	N/N
40	A	border kolie	♀	N/N
41	A	border kolie	♀	N/N
42	A	border kolie	♀	N/N
43	A	border kolie	♂	N/N
44	A	border kolie	♀	N/N
45	A	border kolie	♂	N/N
46	A	border kolie	♀	N/N
47	A	border kolie	♀	N/N
49	A	border kolie	♂	N/N
50	A	border kolie	♂	N/N
51	A	border kolie	♂	N/N
52	A	border kolie	♀	N/N
53	A	border kolie	♀	N/N
54	A	border kolie	♂	N/N
55	A	border kolie	♂	N/N
56	A	border kolie	♀	N/N
57	A	border kolie	♀	N/N
58	A	border kolie	♀	N/N
59	A	border kolie	♂	N/N
60	A	border kolie	♀	N/N
61	A	border kolie	♂	N/N
62	A	border kolie	♂	N/N
63	A	border kolie	♀	N/N
64	A	border kolie	♀	N/N
65	A	border kolie	♀	N/N
66	A	border kolie	♀	N/N
67	A	border kolie	♀	N/DEL
68	A	border kolie	♂	N/N
69	A	border kolie	♂	N/N
70	A	border kolie	♀	N/N
71	A	border kolie	♂	N/N
72	A	border kolie	♀	N/N
73	A	border kolie	♂	N/DEL
74	A	border kolie	♀	N/N
75	A	border kolie	♀	N/N
76	A	border kolie	♂	N/N
77	A	border kolie	♀	N/DEL

Tabulka 3 Přehled vybraných plemen, jejich pohlaví a výsledků detekce mutace genu *VPS13B*

vzorek	sada	plemeno	♀/♂	Mutace
78	A	border kolie	♀	<i>N/DEL</i>
79	A	border kolie	♀	<i>N/DEL</i>
80	A	border kolie	♀	<i>N/N</i>
81	A	border kolie	♀	<i>N/N</i>
82	A	border kolie	♂	<i>N/N</i>
83	A	border kolie	♀	<i>N/N</i>
84	A	border kolie	♀	<i>N/N</i>
85	A	border kolie	♂	<i>N/N</i>
86	A	border kolie	♂	<i>N/DEL</i>
87	A	border kolie	♀	<i>N/DEL</i>
88	A	border kolie	♀	<i>N/N</i>
89	A	border kolie	♀	<i>N/DEL</i>
90	A	border kolie	♂	<i>N/N</i>
91	A	border kolie	♀	<i>N/N</i>
92	A	border kolie	♀	<i>N/DEL</i>
93	A	border kolie	♀	<i>N/DEL</i>
94	A	border kolie	♀	<i>N/N</i>
95	A	border kolie	♀	<i>N/N</i>
96	A	border kolie	♀	<i>N/N</i>
97	A	border kolie	♀	<i>N/N</i>
18	D	border kolie	♂	<i>N/N</i>
35	D	border kolie	♂	<i>N/N</i>
22	B	zlatý retrívr	♂	<i>N/N</i>
6	D	zlatý retrívr	♂	<i>N/N</i>
12	D	zlatý retrívr	♂	<i>N/N</i>
13	D	zlatý retrívr	♀	<i>N/N</i>
16	D	zlatý retrívr	♂	<i>N/N</i>
17	D	zlatý retrívr	♂	<i>N/N</i>
22	D	zlatý retrívr	♀	<i>N/N</i>
23	D	zlatý retrívr	♀	<i>N/N</i>
38	D	zlatý retrívr	♀	<i>N/N</i>
51	D	zlatý retrívr	♂	<i>N/N</i>
61	D	zlatý retrívr	♀	<i>N/N</i>
62	D	zlatý retrívr	♂	<i>N/N</i>
86	D	zlatý retrívr	♂	<i>N/N</i>
88	D	zlatý retrívr	♂	<i>N/N</i>
23	B	labradorský retrívr	♀	<i>N/N</i>
24	B	labradorský retrívr	♂	<i>N/N</i>

Tabulka 4 Přehled vybraných plemen, jejich pohlaví a výsledků detekce mutace genu *VPS13B*

vzorek	sada	plemeno	♀/♂	Mutace
25	B	labradorský retrívr	♂	N/N
26	B	labradorský retrívr	♀	N/N
27	B	labradorský retrívr	♂	N/N
28	B	labradorský retrívr	♀	N/N
29	B	labradorský retrívr	♀	N/N
30	B	labradorský retrívr	♂	N/N
31	B	labradorský retrívr	♀	N/N
32	B	labradorský retrívr	♀	N/N
33	B	labradorský retrívr	♂	N/N
42	B	labradorský retrívr	♀	N/N
43	B	labradorský retrívr	♀	N/N
44	B	labradorský retrívr	♂	N/N
8	D	labradorský retrívr	♂	N/N
9	D	labradorský retrívr	♀	N/N
14	D	labradorský retrívr	♀	N/N
15	D	labradorský retrívr	♀	N/N
20	D	labradorský retrívr	♀	N/N
21	D	labradorský retrívr	♀	N/N
24	D	labradorský retrívr	♀	N/N
25	D	labradorský retrívr	♀	N/N
27	D	labradorský retrívr	♀	N/N
28	D	labradorský retrívr	♀	N/N
29	D	labradorský retrívr	♀	N/N
30	D	labradorský retrívr	♂	N/N
31	D	labradorský retrívr	♀	N/N
32	D	labradorský retrívr	♀	N/N
33	D	labradorský retrívr	♀	N/N
34	D	labradorský retrívr	♀	N/N
36	D	labradorský retrívr	♀	N/N
37	D	labradorský retrívr	♀	N/N
39	D	labradorský retrívr	♂	N/N
40	D	labradorský retrívr	♀	N/N
42	D	labradorský retrívr	♀	N/N
43	D	labradorský retrívr	♂	N/N
44	D	labradorský retrívr	♀	N/N
47	D	labradorský retrívr	♀	N/N
48	D	labradorský retrívr	♀	N/N
50	D	labradorský retrívr	♂	N/N

Tabulka 5 Přehled vybraných plemen, jejich pohlaví a výsledků detekce mutace genu *VPS13B*

vzorek	sada	plemeno	♀/♂	mutace
52	D	labradorský retrívr	♂	N/N
59	D	labradorský retrívr	♀	N/N
60	D	labradorský retrívr	♀	N/N
63	D	labradorský retrívr	♀	N/N
64	D	labradorský retrívr	♀	N/N
65	D	labradorský retrívr	♀	N/N
66	D	labradorský retrívr	♀	N/N
67	D	labradorský retrívr	♀	N/N
68	D	labradorský retrívr	♂	N/N
69	D	labradorský retrívr	♂	N/N
70	D	labradorský retrívr	♂	N/N
71	D	labradorský retrívr	♂	N/N
72	D	labradorský retrívr	♀	N/N
73	D	labradorský retrívr	♂	N/N
74	D	labradorský retrívr	♂	N/N
75	D	labradorský retrívr	♀	N/N
76	D	labradorský retrívr	♂	N/N
77	D	labradorský retrívr	♀	N/N
78	D	labradorský retrívr	♀	N/N
79	D	labradorský retrívr	♀	N/N
80	D	labradorský retrívr	♀	N/N
81	D	labradorský retrívr	♂	N/N
85	D	labradorský retrívr	♂	N/N
87	D	labradorský retrívr	♂	N/N
89	D	labradorský retrívr	♀	N/N
90	D	labradorský retrívr	♀	N/N
92	D	labradorský retrívr	♀	N/N
93	D	labradorský retrívr	♂	N/N
94	D	labradorský retrívr	♀	N/N
95	D	labradorský retrívr	♀	N/N
45	B	Nova Scotia duck tolling retrívr	♀	N/N
46	B	Nova Scotia duck tolling retrívr	♀	N/N
47	B	Nova Scotia duck tolling retrívr	♀	N/N
48	B	Nova Scotia duck tolling retrívr	♀	N/N
49	B	Nova Scotia duck tolling retrívr	♂	N/N

4.2. Izolace DNA z bukálních sliznic

K izolaci vzorku DNA ze stěru z bukální sliznice je zapotřebí kitu, který obsahuje potřebné přípravky k izolaci a také obsahuje návod na správné provedení. Půl hodiny před samotným stěrem se musí dodržet pravidlo nejíst, nepít, zamezit kontakt s jiným zvířetem, aby vzorky nebyly kontaminované.

Při izolaci byla použita sada na izolaci DNA od firmy Macherey-Nagel s názvem NucleoSpin Tissue Kit (obrázek 5), který obsahuje B5 (promývací pufr s etanolem), BE (vymývací pufr), T1 (pufr pro lýzu buňky), BW (promývací pufr) a B3, proteináza K. Během izolace se používají jednorázové latexové rukavice a manipuluje se s desinfikovanými nástroji.

Obrázek 5 NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel)



Postup izolace pomocí kitu:

- 1) Jednorázovým cytologickým kartáčkem (obrázek 6) byla otřena bukální stěna tlamy zvířete, několikrát, aby se zachytilo co nejvíce buněk.

Obrázek 6 Jednorázový cytologický kartáček na stěr bukální sliznice



- 2) Kartáček se vzorkem byl vložen do sterilní mikrocentrifugační zkumavky a konec byl ustřížen tak, aby se zkumavka dala uzavřít. Poté bylo přidáno 180 μ l pufru T1, který naruší buněčnou membránu, společně s 25 μ l proteinázy K a vše bylo zamícháno ve vortexu (obrázek 7), aby se tekutiny spojily a pořádně omyly štěteček. Dále byl vzorek denaturován při teplotě 56 $^{\circ}$ C ve vyhřívacím boxu (obrázek 7), přibližně 20 min (během zahřívání byl několikrát protřepán na vortexu).

Obrázek 7 Vlevo vortex, vpravo vyhřívací box



- 3) Dále se přidalo 200 μ l pufru B3, znovu bylo protřepáno ve vortexu a následně zahříváno na 70 $^{\circ}$ C po dobu 10 min (během zahřívání znovu protřepáno).
- 4) Následně bylo přidáno 210 μ l 96 - 100% etanolu a v ruce promícháno (pomalu, aby se

buňky nezničily).

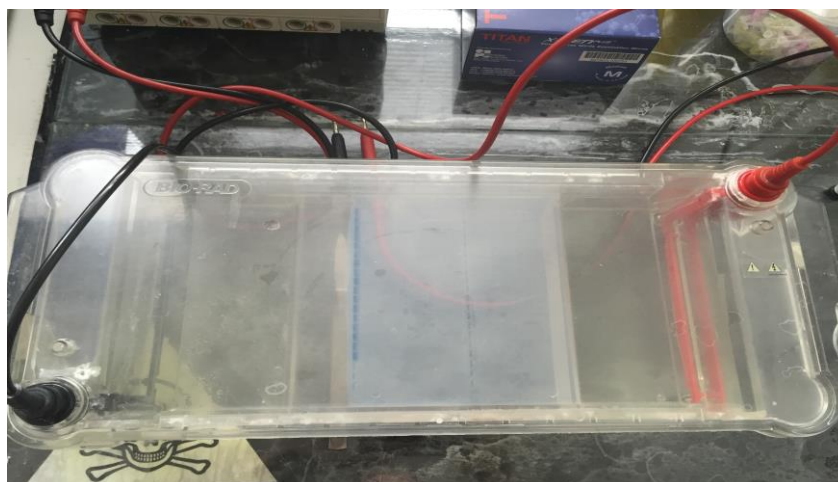
- 5) Celý obsah zkumavky byl vylit do zkumavky se silikátovou kolonkou a nechal se protéct. DNA se zachytilo na kolonce a zbytek kolonkou protekl. Aby na kolonce zůstala opravdu jen DNA, byla zkumavka na 1 min stočena centrifugou 11 000 x g, zbytek tekutiny byl vylit.
- 6) Zkumavka s kolonkou byla stočena na centrifuze na 11 000 x g, aby se důkladně vysušila a následně byla dána do nové sběrné zkumavky.
- 7) Dále byla kolonka promyta 500 μ l pufru BW a znovu stočena centrifugou na 11 000 x g, sběrná tekutina vylita, dále promyta 600 μ l pufru B5 a znovu stočena centrifugou na 11 000 x g a tekutina opět vylita.
- 8) Nakonec bylo přidáno 100 μ l pufru BE, který byl předem zahřát na 70 °C a následně zkumavka stočena centrifugou na 11 000 x g.

Vyizolovaná DNA se skladuje v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

4.3. Posouzení kvality a kvantity izolované DNA

Vyizolovaná DNA byla separována pomocí gelové elektroforézy SubCell (BioRad). Izolovaná DNA byla nanesena na 1 % agarózový gel v prostředí 1x TBE pufru s ethidium bromidem. Vše probíhalo za laboratorní teploty po dobu 30 min a napětí 120 V (obrázek 8). Poté byl pomocí UV - záření detekován úsek fragmentu DNA, ve kterém je vmezeřen ethidium bromid. Výsledné elektroforeogramy byly pomocí programu QuantityOne systému GelDoc archivovány v počítači.

Obrázek 8 Gelová elektroforéza



Kvantita izolované DNA se stanovila pomocí UV – spektrofotometru (obrázek 9), přístrojem NanoPhotometer (Implen). Dále bylo provedeno zhodnocení parametrů A260/ A280 a A260/ A230, díky kterým se odhaluje možná kontaminace DNA jinými organickými látkami.

Obrázek 9 UV-spektrofotometr NanoPhotometer (Implen)

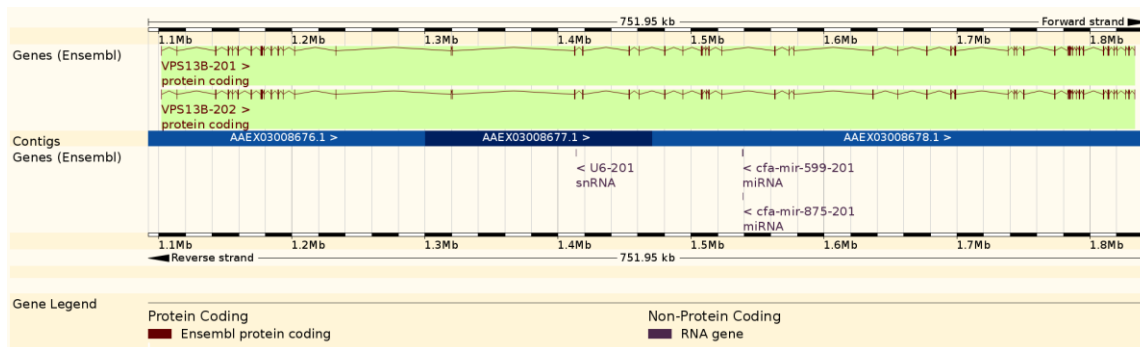


Všechny vzorky DNA byly naředěny 1x TE pufrém na výslednou koncentraci 10 ng. μl^{-1} .

4.4. Navržení PCR primerů VPS13B-CZU1-F a VPS13B-CZU1-R pro detekci deleční mutace s využitím kapilární elektroforézy

Pro navržení primerového páru byla použita sekvence exonu 19 genu *VPS13B* získaná z mezinárodní nukleotidové databázi Ensembl (Hubbard et al., 2002). Struktura tohoto exonu a lemujících intronů je znázorněna na obrázcích 12 a 13. Pro navržení primerů byl použit

Obrázek 11 Gen *VPS13B* - výstup databáze Ensembl



Obrázek 13 Charakterizace exonu 19 genu *VPS13B* a jeho lemujících intronů – výstup databáze Ensembl

	Intron 18-19	1,320,706	1,412,585			91,880	gtgaggacaaatattatcattattca.....actatnttaaaatcttgatttttag
19	ENSCAFE00000005611	1,412,586	1,412,695	1	0	110	GTGCCGTGCTTCTTTGTAGCGTACAAGGAGTAGCAGTTAATATTGACCCAGTCTTATATA ACTGGCTTGTATTCAGCCTCAGAAACGAACAGTAGACATATGCAGCAG
	Intron 19-20	1,412,696	1,418,610			5,915	gtgagaaatntttataatctctcta.....agtgtttctctttgcctctctctag

Obrázek 12 Kompletní sekvence exonu 19 genu *VPS13B* a jeho lemujících intronů – výstup databáze Ensembl

```

CACTGGCATTCACTTTTTGTGTCTATGGTTTTTGCCTGTTCTAACGATTTCAITTAAGTG
GAATCATGCAATGTGTGGTTTTCTGTGACTAGCTTCTTTTACTTAGCATGTATTCAAGGT
AGTATAGCATGAATCAATACTTGATTCCTTGAGATAACAAGTAATTTCCATTATATGG
CTATATCATATTTTGCTTATCCATTCACGATTCTCGGACATCTGTGTCATTTCCACCTT
intron 18-19 TGGGCTATTATGAATACTGCCTTGAAAAGTTGGGTACAGAGTTTTGAGTAGAGTGATTTT
AGTTCTCTTGGTACATACCTAGGAATAAAATTTGTTGGGCCATATATGTCTGTATATTT
GCCTCTTGAAGAAATGCCAAAGTGTTTTTGAAGTATTTGTACCATTTTATGCTCCACC
AGCAGTATATGAGAGCTCAAATTCCTCCACATCTTTGTCAGCACCTTGTTAATTTGTCCTT
TTTATTATAGCTGTCCCTACTTGGAGTGAAGTGATATAAAGCTTGCTATTTTTTAAATGAG
GAATTAACCTATTTTAAAATCTTGATTTTTAGGTGCCGTGCTTCTTTGTAGCGTACAAG
exon 19  GAGTAGCAGTTAATATTGACCCAGTCTTATATAACTGGCTTGTATTACGCCCTCAGAAAC
GAACCAGTAGACATATGCAGCAGGTGAGAAAATTTTTATAATTTCTCTTAATGAACAAATCT
TTTTCTCAGTATTTGTTAGAGTTATACATAGTCTGCATTGATTTTTTTTTTAAATGGATGT
ACCACAAGTCCCTTTGCTCCTGCTCCTACCTGTTTCAAATAATTGTATTCTTTCATTTCTA
GACAGAAAATATAGCTCATAGAGAGTTTCATTGACCAATTGAGATGAATTTCTAAGCAAT
TGCTGGTAAAGCGAAACACTGGAGAGACTAGTTAAGTAGTCCTATTTTACTGACCTCTT
TTTCTCATGGTGCCTAGATGTATTCTGAGTGTCTGATGCATGAGAATTCATAGTAA
intron 19-20 ATGTTAGCTATTGTTTTTATTATCTCTGTATTTCTCTTCATCTTTGGGTTTACTCAACA
AGCATTGCTTGAGTGCCAAACCCCTGGATTGGGATAGTTGGTGTAAAAGAGTTAGGATAT
ATGCTTATTTAAAAGGGTATAAATAAAAAAATAAGAAAGTTATAAATCACAAAGTAA
AAAGTAGCTAATTTAGTTTCTGGAATGCTTAAATGGAATTTTACAGATGGGTTTTATT
ATTCCTATTTAAAATGAAGAACTGGGGCAGCCCGTGGCTCAGTGGTTTTGGCGCCAC
CTTCAGCCAAGGGTGTGATCTCGAGACCTGGGATCGAGTCCCATGTCAGTCCCTGTGT
GGAGCCTGCTTCTCCCTCTGCCTCGCTCTCTGTTTCTCTCTTTCTGTGCTCTCAGGA
    
```


Tabulka 6 Složky a koncentrace látek pro amplifikaci s primery VPS13B-CZU1-F a VPS13B-CZU1-R

Složka	Koncentrace
DNA 10 ng/ 1μl	30 ng . 12,5 μl ⁻¹
Pufr KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	200 μM
Primer VPS13B-CZU1-F	0,4 μM
Primer VPS13B-CZU1-R	0,4 μM
enhancer	2 mM
BSA	5 ng . 12,5 μl ⁻¹
Taq polymeráza (5U)	0,7U . 12,5 μl ⁻¹

V tabulce 7 je znázorněn profil programu VPS13BKAP, při kterém byly vzorky amplifikovány.

Tabulka 7 Profil termocyklu C1000 pro amplifikaci programu VPS13BKAP nakonfigurovaného pro amplifikaci genu VPS13B

Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1x
Denaturace	95 °C	30 s	35x
Annealing	64 °C	40 s	
Prodlužování	72 °C	60 s	
Závěrečné prodlužování	72 °C	7 min	1x

Po skončení amplifikace byly vzorky v termocyklu uchovány při teplotě 14 °C až do doby, dokud s nimi nebylo dále manipulováno.

4.7. Podmínky amplifikace exonu 19 genu *VPS13B* s využitím primerů VPS13B-CZU2-F a VPS13B-CZU2-R

Primery VPS13B-CZU2-F (5'CCATTTTATGCTCCCACCAG3') a VPS13B-CZU2-R (5'AGAGCAGAGGACAAAGGACTTG3') byly použity pro amplifikaci daného úseku DNA, která proběhla v termocykleru C1000 (BioRad). V tabulce 8 jsou uvedeny složky potřebné k amplifikaci a jejich koncentrace pro jeden vzorek.

Tabulka 8 Složky a koncentrace látek pro amplifikaci s primery VPS13B-CZU2-F a VPS13B-CZU2-R

Složka	Koncentrace
DNA 10 ng/ 1μl	30 ng . 12,5 μl ⁻¹
Pufř KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	200 μM
Primer F VPS13B-CZU2	0,4 μM
Primer R VPS13B-CZU2	0,4 μM
enhancer	2 mM
BSA	5 ng . 12,5 μl ⁻¹
TAQ polymeráza (5U)	0,7U . 12,5 μl ⁻¹

4.8. Detekce deleční mutace pomocí kapilární elektroforézy

Amplifikované PCR produkty při použití primerového páru VPS13B-CZU1-F a VPS13B-CZU1-R byly následně naředěny a smíchány s velikostním standardem LIZ600 a Hi-Di formamidem do polypropylénových zkumavek pro fragmentační analýzu pomocí kapilární elektroforézy. Hodnoty objemů jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9 Složky a jejich objemy pro fragmentační analýzu

Ředění PCR produktu		Vzorek pro fragmentační analýzu		
PCR produkt (μl)	H ₂ O (μl)	naředěný produkt (μl)	LIZ 600 (μl)	Hi-Di formamid (μl)
1	69	1	0,2	12

Vzorky připravené podle postupu uvedeného v tabulce 9 byly následně denaturovány v termocykleru C1000 (BioRad) při 95 °C po dobu 5 min a následně ochlazeny na teplotu 4 °C. Takto připravené vzorky byly následně separovány pomocí kapilární elektroforézy.

K identifikaci jednotlivých alel byla použita kapilární elektroforéza, přístroj ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). V tabulce 10 jsou uvedeny parametry fragmentační analýzy.

Tabulka 10 Parametry fragmentační analýzy přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

Parametry fragmentační analýzy	Hodnoty přístroje
Délka kapiláry (cm)	36
Modul	GS STR POP4 (1 ml) G5
Polymer	POP4
Virtuální filtr	G5
Doba nástřiku (s)	5
Napětí při nástřiku (kV)	15
Teplota při separaci (°C)	60
Napětí při separaci (kV)	15
Doba separace (min)	24

4.9. Sekvenační analýza amplikonu

Pro sekvenační analýzy byly použity primery VPS13B-CZU2-F a VPS13B-CZU2-R.

4.9.1. Purifikace produktů separovaných v agarózním gelu

Ve vzorku se mohou nacházet volné nukleotidy a dimery primerů. Z tohoto důvodu se vzorky purifikovaly, aby se odstranily nadbytečné a nežádoucí komponenty. Amplifikované vzorky se separovaly v 1,5 % agarózovém gelu v prostředí 1x TBE pufru, při napětí 120 V a v délce 45 min. Následné fragmenty byly pomocí skalpelu vykrojeny a vloženy do polypropylenových zkumavek. Dále byl použit PCR Purification Kit (Qiagen) a ve finále bylo přidáno 50 μl H_2O k vymytí purifikovaného DNA. Bylo získáno 20 μl roztoku obsahujícího DNA. Kvantifikace DNA byla provedena stejným způsobem, jako kvantifikace genomické izolované DNA. Produkty byly naředěny H_2O na koncentraci 10 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

4.9.2. Sekvenační reakce

Na sekvenační reakci byl použit Cycle Sequencing Kit. Parametry sekvenační reakce jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11 Složky a jejich koncentrace použité na sekvenační reakci

Komponenta	Koncentrace	Objem
PCR produkt	20 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	5,0 μl
5x Sequencing Buffer (Life Technologies)	1x	4,0 μl
Primer F resp. R (1 pikomol . μl)	3,2 pikomolu . 20 μl^{-1}	3,2 μl
Terminator Ready Reaction Mix (Life Technologies)	2 $\mu\text{l} \cdot 20 \mu\text{l}^{-1}$	2,0 μl
H_2O		5,8 μl

4.9.3. Čistění produktů sekvenační reakce

Pro vyčištění produktů byly přidány do vzorku 2 μl glykogenu a premix o složení 2 μl 3M octanu sodného a 50 μl 96 % etanolu. Nově vytvořená směs byla promíchána a nechána odstát 15 min při laboratorní teplotě. Následně byla po dobu 30min protočena při 13 200 x g v centrifuze. Po protočení byla tekutina odsána pipetou, protože vysrážené produkty byly vlivem odstředivé síly centrifugy přichyceny na dně zkumavky.

Vysrážený pelet byl propláchnut 250 μl 70 % etanolu, následně byl protočen na centrifuze při 13 200 x g po dobu 15min a znovu přebytečná tekutina odsána pipetou. Tento proplach byl zopakován ještě jednou ve stejném znění.

Pro řádné vysušení peletu byl vzorek vložen na dobu 30 min do termobloku, který byl vyhřán na 50 °C. Následně bylo přidáno 15 μl Hi-Di formamidu.

Rozpuštěné vzorky byly přepipetovány do polypropylenových zkumavek, následně byly denaturovány v termocykleru C1000 (BioRad) při 95 °C po dobu 5 minut a poté ochlazeny na teplotu 4 °C.

Takto připravené vzorky byly přeneseny do podávacího systému kapilární elektroforézy. Parametry sekvenace na kapilární elektroforézu jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12 Parametry sekvenace přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

Parametry sekvenace	Hodnoty přístroje
Délka kapiláry (cm)	50
Modul	SeqPOP6 (1 ml) E
Polymer	POP6
Virtuální filtr	E
Doba nástřiku (s)	30
Napětí při nástřiku (kV)	2,5
Teplota při separaci (°C)	50
Napětí při separaci (kV)	11,3
Doba separace (min)	120

5. Výsledky

5.1. Výběr plemen a jejich predispozice k onemocnění TNS

Vybraná plemena a jejich pohlaví a výsledek zkoušky detekce mutace jsou zaznamenána v tabulkách 1 – 5. Dle publikovaných vědeckých článků bylo zřejmé, že mutace bude nalezena pouze u plemene border kolie, ale přesto byla zkouška detekce mutace genu *VPS13B* provedena i u dalších plemen využívaných k asistenčním aktivitám.

Detekce mutace genu *VPS13B* způsobující Syndrom uvězněných neutrofilů byla provedena anonymně a z tohoto důvodu, nejsou uvedena u jednotlivců jména ani majitelé.

Všichni jedinci, u kterých se nacházela mutovaná alela, byli heterozygoti – přenašeči. Jedná se o 11 jedinců plemene border kolie, 9 fen a 2 psy.

Z celkového množství border kolií, tj. 98, bylo 11 jedinců přenašečů. Procentuální zastoupení přenašečů ve zkoumané skupině jedinců je 11 %.

5.2. Optimalizace PCR markerů genu *VPS13B*

Optimalizace PCR markerů (*VPS13B-CZU1-F* a *VPS13B-CZU1-R*, *VPS13B-CZU2-F* a *VPS13B-CZU2-R*) spočívala ve stanovení optimální annelační teploty. Optimální annelační teplota je taková, při které nedochází k amplifikaci nespecifických fragmentů a poskytuje dostatečné množství fragmentů o určité velikosti.

Pro amplifikaci optimalizační reakce byla použita reakční směs popsaná v tabulce 6. Na obrázku 15 se nachází elektroforeogram teplotního gradientu z tabulky 13.

Tabulka 13 Teplotní gradient pro optimalizaci markeru genu *VPS13B*

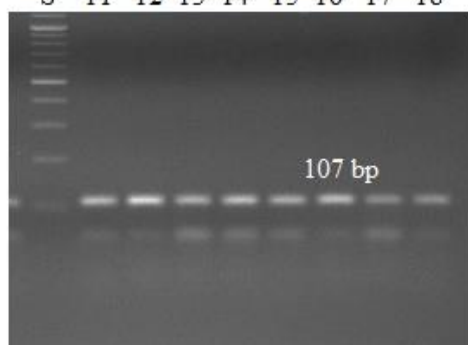
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1x
Denaturace	95 °C	30 s	35x
Annealing	teplotní gradient*	40 s	
Prodlužování	72 °C	60 s	
Závěrečné prodlužování	72 °C	7 min	1x

* Teplotní gradient: T1 = 56 °C, T2 = 57 °C, T3 = 58,3 °C, T4 = 60 °C, T5 = 62,3 °C, T6 = 64,1 °C, T7 = 65,3 °C, T8 = 66 °C

Obrázek 15 Elektroforeogram teplotního gradientu

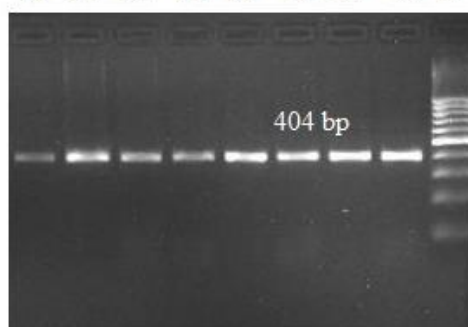
Primery: VPS13B-CZU1-F, VPS13B-CZU1-R

S T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8



Primery: VPS13B-CZU2-F, VPS13B-CZU2-R

T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8 S



S - GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific Fermentas™)

Podle elektroforeogramu je zjevné, že optimální teplotou pro amplifikaci je T6 = 64 °C. Při této teplotě se intenzivně amplifikovaly PCR produkty o požadované velikosti.

5.3. Detekce kauzální mutace genu *VPS13B* pomocí kapilární elektroforézy

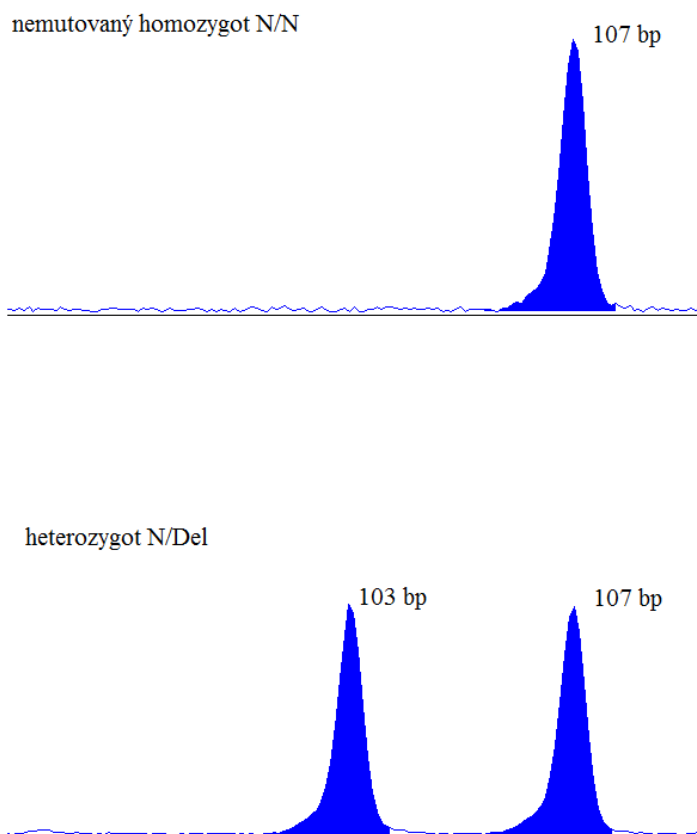
PCR markery (primery VPS13B-CZU1-F a VPS13B-CZU1-R) byly použity na detekci genotypu u všech jedinců uvedených tabulkách 1-5.

Všichni jedinci, u kterých se nacházela mutovaná alela, byli heterozygoti – přenašeči. Jedná se o 11 jedinců plemene border kolie, 9 fen a 2 psy.

Z celkového množství border kolií, tj. 98, bylo 11 jedinců přenašečů (N/Del). Procentuální zastoupení přenašečů ve zkoumané skupině jedinců je 11 %.

Na obrázku 16 je uveden vzorový chromatogram, který odlišuje nemutované homozygoty (N/N) a heterozygoty (N/Del). Také je patrné, že u nemutovaných homozygotů byl amplifikován fragment o velikosti 107 bp. U heterozygotů vznikaly dva fragmenty o velikosti 107 bp a 103 bp.

Obrázek 16 Chromatogram zobrazující nemutovaného homozygota s jedním píkem a heterozygota s jednou mutovanou alelou se dvěma rozdílně velikými píky - výsledky kapilární elektroforézy

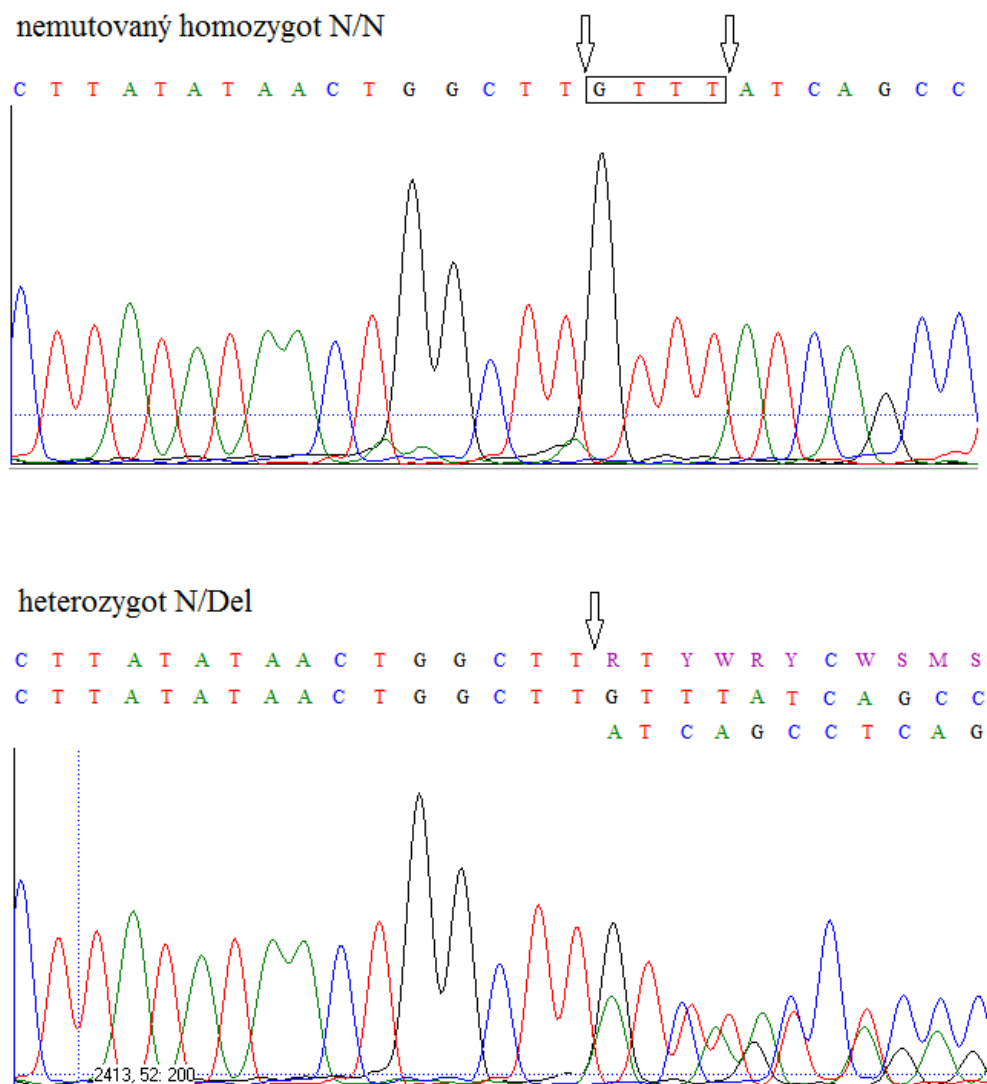


5.4. Sekvence amplikonů markeru genu *VPS13B*

Pro sekvenaci bylo vybráno 6 vzorků z kapilární elektroforézy. Vzorky byly vybrány pouze ze sady A (border kolie) z důvodu prokázání nacházející se mutace pouze u tohoto plemene. Vybráni byli 3 homozygoti (jedinci s číslem 2, 91, 95) a 3 heterozygoti (jedinci s číslem 67, 92, 93).

Na obrázku 17 je vidět sekvence nukleotidů u homozygotního jedince, u kterého se nenachází mutace a pod ním je mutovaný jedinec heterozygot, jehož jedna alela genu *VPS13B* obsahuje delecí 4 bází (GTTT).

Obrázek 17 Sekvence nukleotidů genu *VPS13B* u nemutovaného homozygota a heterozygota s jednou mutovanou alelou s delecí 4 bází - výsledek sekvenace



5.5. *In silico* analýza

V molekulární genetice se často využívají metody „in silico“. Jedná se o vzájemné porovnávání výsledků či vyhledávání homologních sekvencí. Data, která se porovnávají, jsou uložena v internetových nukleotidových databázích.

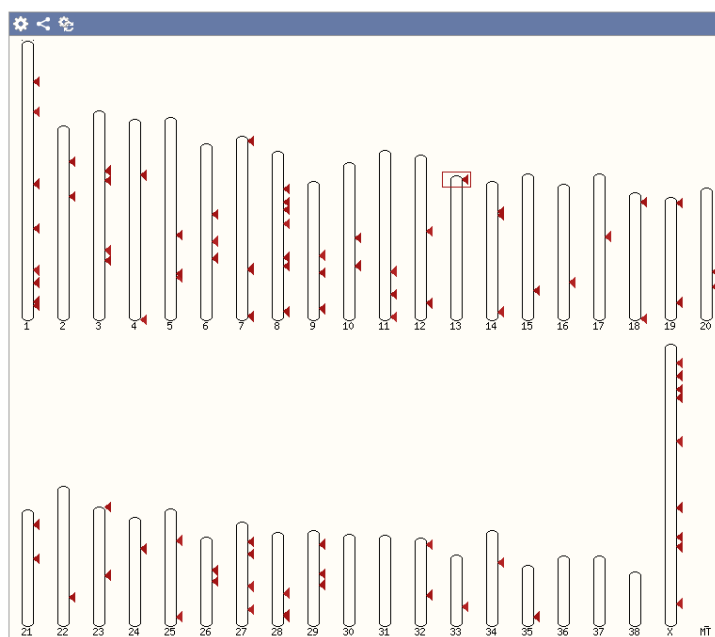
5.5.1. *In silico* ověření použitých primerů

Při řešení experimentální části práce byl použit publikovaný gen *VPS13B*, o kterém byly základní údaje vyčteny z článku Shearman a Wilton (2011). Následně byla daná data (chromozom, exon) ověřena v internetové databázi Ensembl (obrázek 18, 19, 20 a 21).

Obrázek 18 Komplementarita primeru *VPS13B-F* - výstup analýzy databáze Ensembl

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E.val	%ID
13.1412415-1412434 (Sequence)	VPS13B	Forward	1	20	20 (Sequence)	40.1	0.006	100.00 (Alignment)
10.33312246-33312265 (Sequence)	ALDH1L2	Reverse	1	20	20 (Sequence)	40.1	0.006	100.00 (Alignment)
8.70594377-70594395 (Sequence)	RCOR1	Forward	2	20	19 (Sequence)	38.2	0.024	100.00 (Alignment)
29.19017896-19017914 (Sequence)	SLC05A1	Reverse	1	19	19 (Sequence)	39.2	0.024	100.00 (Alignment)
X.89164650-89164667 (Sequence)		Forward	2	19	18 (Sequence)	36.2	0.093	100.00 (Alignment)
22.48811138-48811155 (Sequence)	SLC15A1	Reverse	2	19	18 (Sequence)	36.2	0.093	100.00 (Alignment)
X.14111032-14111048 (Sequence)		Forward	3	19	17 (Sequence)	34.2	0.37	100.00 (Alignment)
X.71911779-71911795 (Sequence)		Reverse	1	17	17 (Sequence)	34.2	0.37	100.00 (Alignment)
X.84830940-84830956 (Sequence)		Forward	1	17	17 (Sequence)	34.2	0.37	100.00 (Alignment)
23.30016627-30016643 (Sequence)		Forward	1	17	17 (Sequence)	34.2	0.37	100.00 (Alignment)

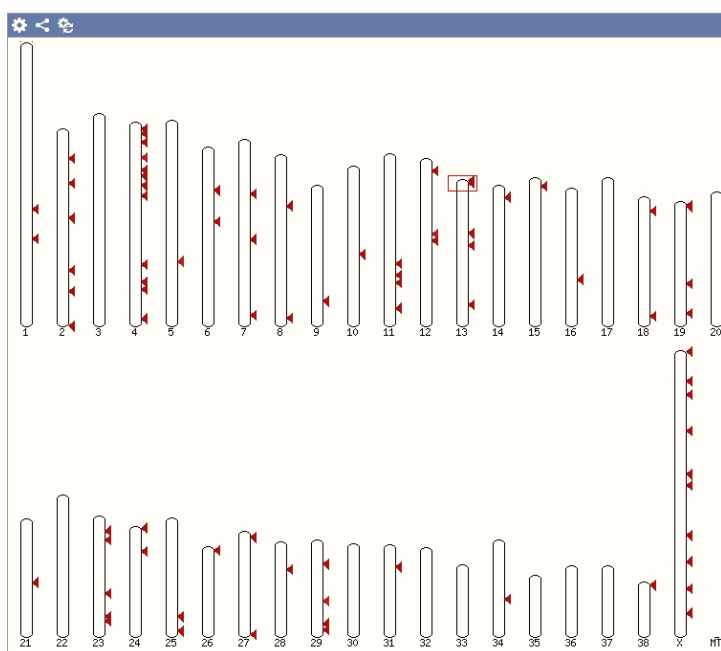
Obrázek 19 Komplementarita primeru VPS13B-F - výstup analýzy databáze Ensembl



Obrázek 20 Komplementarita primeru VPS13B-R - výstup analýzy databáze Ensembl

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
13:1412797-1412818 [Sequence]	VPS13B	Reverse	1	22	22 [Sequence]	44.1	6e-04	100.00 [Alignment]
29:36075441-36075458 [Sequence]		Forward	3	20	18 [Sequence]	36.2	0.16	100.00 [Alignment]
24:10788202-10788219 [Sequence]		Reverse	1	18	18 [Sequence]	36.2	0.16	100.00 [Alignment]
2:23803151-23803168 [Sequence]	CAMK1D	Reverse	1	18	18 [Sequence]	36.2	0.16	100.00 [Alignment]
19:48062486-48062503 [Sequence]		Forward	1	18	18 [Sequence]	36.2	0.16	100.00 [Alignment]
13:23116509-23116525 [Sequence]		Reverse	5	21	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]
19:1522321-1522341 [Sequence]		Reverse	1	21	21 [Sequence]	34.2	0.61	95.24 [Alignment]
X:467052-467068 [Sequence]		Reverse	6	22	17 [Sequence]	34.2	0.61	100.00 [Alignment]

Obrázek 21 Komplementarita primeru VPS13B-R - výstup analýzy databáze Ensembl



5.5.2. *In silico* identifikace místa kauzální mutace genu *VSP13B* a následné změny syntetizovaného proteinu

Pomocí databáze Ensembl bylo ověřeno místo kauzální mutace, které autoři popisují ve svých pracích. Na obrázku 22 je vidět část řady nukleotidových bází genu *VSP13B* společně s řadou kódujících aminokyselin. Dále je na obrázku vyznačeno místo, kde se při mutaci nachází delece a od tohoto místa se tím pádem syntetizují jiné aminokyseliny.

Na obrázku 23 a 24 je znázorněn protein syntetizovaný z genu *VSP13B*, na prvním obrázku je vidět celý protein nemutovaného genu, na druhém obrázku je znázorněn protein syntetizovaný z mutovaného genu *VSP13B*, na kterém je vidět, že změna pořadí aminokyselin vnesla do proteinu STOP kodon, který ukončil syntézu proteinu o mnoho dříve, než končila syntéza původně.

Obrázek 22 Sekvence genu *VSP13B* společně s pořadím aminokyselin s vyznačeným místem delece a následné změně syntézy proteinu – výstup databáze Ensembl

```

2701 ACTAAAGACCTTCATAGTAGCAAGTGGCTCAATGAGAGTAGAAAGCCAGAATCCCTCTTA 2760
2701 ACTAAAGACCTTCATAGTAGCAAGTGGCTCAATGAGAGTAGAAAGCCAGAATCCCTCTTA 2760
901 -T--K--D--L--H--S--S--K--W--L--N--E--S--R--K--P--E--S--L--L- 920

2761 GCTCCAGATTTGACAGCCTTCACAGTCCAAGTCCACAGTATATGGATTACTGCCATAAT 2820
2761 GCTCCAGATTTGACAGCCTTCACAGTCCAAGTCCACAGTATATGGATTACTGCCATAAT 2820
921 -A--P--D--L--T--A--F--T--V--Q--V--P--Q--Y--M--D--Y--C--H--N- 940

2821 TCTGGTGCCGTGCTTCTTTGTAGCGTACAAGGAGTAGCAGTTAATATTGACCCAGTCTTA 2880
2821 TCTGGTGCCGTGCTTCTTTGTAGCGTACAAGGAGTAGCAGTTAATATTGACCCAGTCTTA 2880
941 -S--G--A--V--L--L--C--S--V--Q--G--V--A--V--N--I--D--P--V--L- 960

2881 TATAACTGGCTTGTTTATCAGCCTCAGAAACGAACCAGTAGACATATGCAGCAGCAGCCT 2940
2881 TATAACTGGCTTGTTTATCAGCCTCAGAAACGAACCAGTAGACATATGCAGCAGCAGCCT 2940
961 -Y--N--W--L--V--Y--Q--D--Q--K--R--T--E--R--H--M--Q--Q--Q--F- 980

2941 GTCATAGCTGTTCCCTCTTGTACACCAATTAGCAGAAAGAAAAGAGGATGAGGTGTCTGTT 3000
2941 GTCATAGCTGTTCCCTCTTGTACACCAATTAGCAGAAAGAAAAGAGGATGAGGTGTCTGTT 3000
981 -V--I--A--V--F--L--V--T--F--I--S--R--K--K--E--D--E--V--S--V- 1000

```

Obrázek 23 Protein nemutovaného genu *VPS13B* - výstup databáze Ensembl

MLESYVTPILMSYNYRYIKNLKPSDLQLSLWGGDVVLSKLELKDVLQELKLPFTFLSGHIELRHVWPWTKLGSPEPVITINTMEICILKLDGIDDDHESCGSHSTRNSTTENTKPSVKPRRIG
QAAPTPDPLPPGYGQSLRRVNVNIVINNLIKVEDDIVLNVNITSACQYTVGELWDRAFMDISATDLVLRKVINFSDDCTVCLDKRNASGKIEFYQDPLLYKCSFRTRLHFTYDNLNSKMPVS
IKIHTLVESIKLISITDQQLPMFIRIMQLGIALYIGEIGNFKDGETEDPTCHDKDMLGNITGSEDETRIDMQYTAQYKGGELYSQDEDEQPQGWVSWAWSFVPAIVSYDDSEEDFLGNDPTSAMH
QOKAGTLRDFIVSIGYCTKATVTFKLEMQAESYYSQPKVKSKEVLQWEGEGITVEALMGGEPFFNCQIIFGGRALCKLGMGKVFEEENMRSETEAGFCFICGENLNMKGLTYLNSLF
DYRSPENNGTRAEFILDAAHKETYTEVAGMQRFGAFYMDLYLTVENIIGKGSANGQDFSPGKSEDMGTVQEKSTKSLVIGPLDFRLDSSAVHRIKMIIVCALEHEYEPYSGLKQDKIDENETV
LNPEEVALEEYIPTRHTSITLLKCTCTIVMAEFNLLDHLPLVIMGEKNSSNFLTNTNFQSLRPLPSIQILVDKINLEHSPVMAEQVLVHVVSLSLTPSDNLLHYCYAHCYLKIFGQAGLTSLDCR
GFYCLPVPIPFESTALYGKLLKPTCWTERSQIATEGIFELPNLTIQATRAQTLTLLQAIYQSWCHIGNLSLSVNEALMNEIFQTITGVKSKNPLPTLEGSIQNVELKYCSTSLVKCASGTVGSIKI
GAKAPGDSGKELIPELLQGPSDTKDLHSSKWLNESRKPESLAPDLTAFTVQVPQYMYOYCHNSGAVLLGSVQGVAVNIDPVLVYVQPKRTRSRHMQQPPVIAVPIVTPISRKKKEDEVSVG
SAPLAKQSYQASEYASSPIKTKITTESRPLSVPVYKAMLNISEGCRSPEERMKPEFVGVVWAVKSLTLQLEVQSCCVVPMDSLPSSTIVSODIPGTVRSWYHGQTSMPGMLLGLPQIKIISA
GHKYMELPQEPFVPIRPIILEGNAPFVITSLHHSMYTLFGKQVTFCLVPEMGTCTSLAVTISQKLLATGPDTRHSEFVCLHVDLESQIKQCSNPQVQLLYELTDNVNKVWNQIQRGNLSPSS
AYPETMAGVPPGSPVRSVGTAPPDITSCPSADFGTITTEGDSIQAGDSDPFSDSVTLQEQITTSNIGGSSGRISLWMQWVLPKTIKLPADDPENKGTTELCSVELELDSASIDVQVYTKVKCK
IESFNIDHYRSSFEECWSLQCCGGVFLSCTDKLNRRLTLVRSIKQDPFNSCGFFPSTAKLLDGGSHQQHGFLLSLTYTKAVTKNRHKLTSRNRERSLHKLSEGLTDGSPHFLHEILLSAQ
FDIVLGFPLNIAISFQAQLPRTQEKRRKSPGQPMRSHLTLSRSLPIIYINTSVIRIFVPKTEEMQPSIEVNTVKEDETMVLKIGSVAMAPQADNPLGRSVLRKDIYQRALNGLRDPGSEIEDR
QYQIDLHSHINISITAQWDLKPEKESGOTGVLTESERNSQNPALWMMASSIRRHQERRALPTLITDFSSVITAPAHITFKIISPENMHEEILVCGHSELVNITDLDFFLSVAQQLHLHLIVA
NMIGLEPSSKAKEISKQEQKMDFTEGSMATSSRYSGAODSGIGSDSVKIRIVQIEQHSQIQRHRIARPSROSSIVKNLNFIPDFIEITASRISLMTYSCSAIPKSKQVHKDNEKTGKSSNLBR
EVDSDVAKPSQACISTVTAEDLLSSRVSPGKGIKVISLESLEHASTRSSARQALGITVIRQGRGTGDLQLEPFYFVYQPSLLSCHHRKQVREISIFDAVLKGVASDYKCTDPGKTLPEAL
DYCTVWLQTVPEIDSKSGIPPSLVTLQIKDFLNGPADINLIDSKPLKANLSETKLDQIKNLLKRINTHSETSAPLDMLNKDEFTPSKCFCKGKSKPKVHGGDAQIPFQENMWRVTSQCFQK
SVHTTQIVVSMETVPHDPKPCLLASLNSLSSLNVTAKQKVPGVILGSSFLNINDFLLKTSLKERNRILIGPCANANLEAKWCKHSGNPPGEGSIPKISIDLQGGLLQVFWGQEHNLCLVLRH
ELLSGVLNKGNEFEVQVPEAVQPMPSPIEMNNOIKFSQSSDDLRTGLFQYIRDAEPLKMPGVYVYVYNETDESSEMMLWRVPEPRVLTLVRIIPVFNATDEDDISADLGDMLQIPCSLEYW
DELQKVFVAFQEFSLSESKVCELQPDINLVSDDKLVSSDLWRIVLNSSQNGADDSASSESGSQTCDLVITPALAAGTRVDSCTFPWFVPSLSISFQAHLEHLCHHLDLGLGTAPPQYL
KPFISDKNVPSLEYEMISIFKAPHYLRLQWNNSPVCQEIRFSSQADCKLLEGRVNTMQSMVKSFSIFGQIAISREAVEKLDLCIIIVDSIFVNGQVHVHSLNTAVQAWQKQKCEVEELVSHFV
ICNDTQETLRFQGVQDDENIILASLHSHGYSWRSHKSPQKLLHICIEGWGNWRWSEPFSSVDHAGTFIRTIQYKORTASLVIKVRQSGGQKQIICGRQIICSLYSQSIELKVYQHYISQDGAIVR
EHFDCLTAKQKLPYSILENSELTELGVKAGNEDWSDVQLESKSPESYIVIQVPSNNSIFYYWQVCTVLTLEPNSSVQQRMIIVFSPFLMRSHLPDPPIIHLKRSLSLSETOIIPGKGRKPLQNI
EPDVLVHHLTFQAREDDPSHGAVPISLJKGIATKIPGOTVNLIDEFYQPEKSLQPMWYKNDSDRNEQLSOWSPMRVLSVWPKYKTLIELLPWALINGSKWDLWLFEGEKIVLQ
VPAGKIIIPNFQEFQIGYAVPANTVHKSVAIKLVHNLTSPKWKDGGNGEVVSLDEEGVDAEIRLGAFFGHOKLQFGSSMVQGGIIGIEQKTHIINMPPYQIFKPKQVSKPSSGKEYE
HPTDSATFICPGGGEQAAYKPSLPCWDLMPDMSQSPDLTSLQKQILLAFSPAAGAGSSQCSWLSPAIVRQEPFQPSVAVPFGNRRGENGFCRTRAVALTQEHVLYLTLSEDPSPRIIFHNRQ
PVTILIKENIDIPSEFEVYRSECCSIHHELYHQISSYPDCKTKDILLPSLFLRAESLEVDVTAEWSADAVINNOGTQVVVLTGFGYVYVYDHLQCGTVFIVTAPEGKVEPIITLTSNRTLEKMYTLKI
FITQLSLVVFDLSSHKASSELRLRLTDHVFQVAVPAGPLPGEAAVAAPRLRHAVELYCGDLQDNLQLYSKSNFHAVLVCQENAGPVQRAKRVHSLASGRDLEEKDGFIKLCLTISEGR
SCRDDINELRFELKAPRYEDIFYYVIRLFEYLPFGDLGAPAGPSGGEQVLPQVRQHARALNVYKLRKLVIPVSLVSHIASLKLYIASDITPLSFSVFERGVPFTARQLVHALAM
HYASGALFRAGWVSELEIGSPASLRSINGIADFRFLPYGLTRGPGAFVSVSRGRTSEYKHISKSTLSITMLATSLARNMDRSLDEHYNRQERWRRLQEPSELGEGRLSRLS
LLGAIAIGVDPQMQRTRTEAHASAGHKAKGIVISGVGKGIQGVFTKPIGGAELVLSQTYGILHAGALSQPKQRYQPSLDHADQAPNSHYKVVWMLQSLGRPEVIMALEVVMVRGSGQE
HGGCLLTVSELVFVSVSDEDTQQQAFITEIDCAQDSKSNLFTVQLRQPRVACDVEVDGARERLSEQQYRNLVDYITKTSCHLAPSCSSMGTQPCPVVAVEPLSTVKTYHYMVDPHFAQVFIK
KFTMVKKNKALRKGFP

Obrázek 24 Protein mutovaného genu *VPS13B* - výstup databáze Ensembl

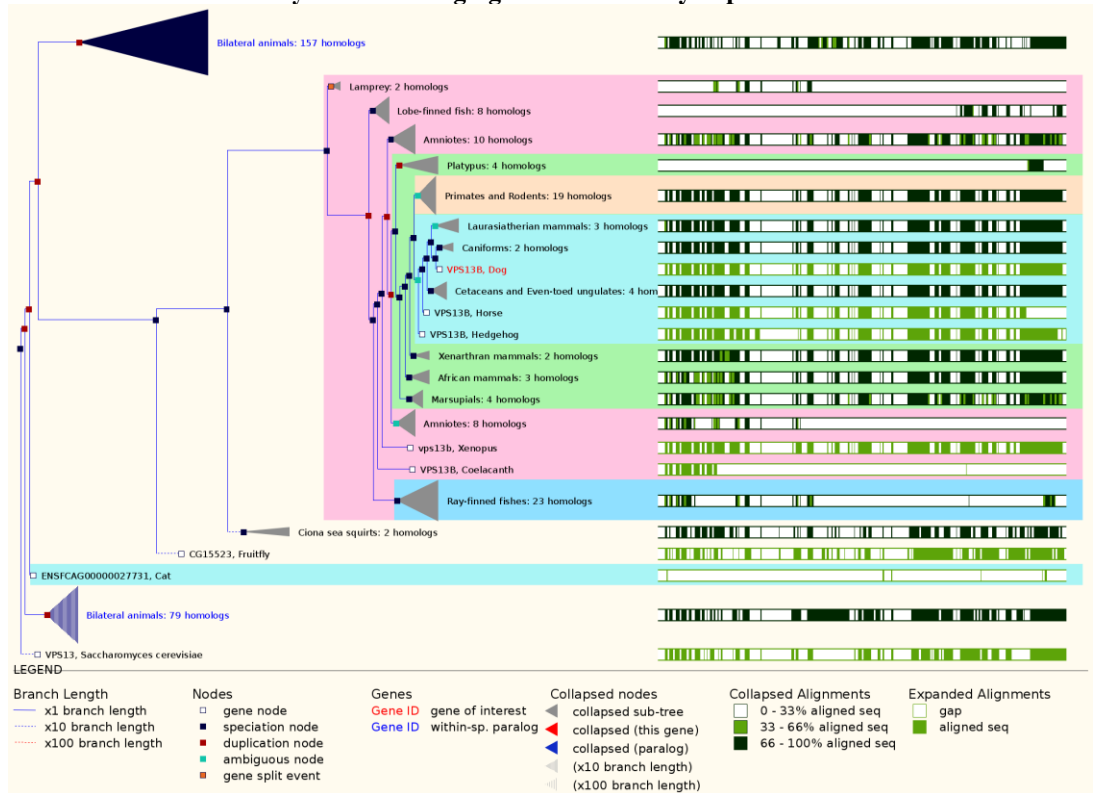
MLESYVTPILMSYNYRYIKNLKPSDLQLSLWGGDVVLSKLELKDVLQELKLPFTFLSGHIELRHVWPWTKLGSPEPVITINTMEICILKLDGIDDDHESCGSHSTRNSTTENTKPSVKPRRIG
QAAPTPDPLPPGYGQSLRRVNVNIVINNLIKVEDDIVLNVNITSACQYTVGELWDRAFMDISATDLVLRKVINFSDDCTVCLDKRNASGKIEFYQDPLLYKCSFRTRLHFTYDNLNSKMPVS
IKIHTLVESIKLISITDQQLPMFIRIMQLGIALYIGEIGNFKDGETEDPTCHDKDMLGNITGSEDETRIDMQYTAQYKGGELYSQDEDEQPQGWVSWAWSFVPAIVSYDDSEEDFLGNDPTSAMH
QOKAGTLRDFIVSIGYCTKATVTFKLEMQAESYYSQPKVKSKEVLQWEGEGITVEALMGGEPFFNCQIIFGGRALCKLGMGKVFEEENMRSETEAGFCFICGENLNMKGLTYLNSLF
DYRSPENNGTRAEFILDAAHKETYTEVAGMQRFGAFYMDLYLTVENIIGKGSANGQDFSPGKSEDMGTVQEKSTKSLVIGPLDFRLDSSAVHRIKMIIVCALEHEYEPYSGLKQDKIDENETV
LNPEEVALEEYIPTRHTSITLLKCTCTIVMAEFNLLDHLPLVIMGEKNSSNFLTNTNFQSLRPLPSIQILVDKINLEHSPVMAEQVLVHVVSLSLTPSDNLLHYCYAHCYLKIFGQAGLTSLDCR
GFYCLPVPIPFESTALYGKLLKPTCWTERSQIATEGIFELPNLTIQATRAQTLTLLQAIYQSWCHIGNLSLSVNEALMNEIFQTITGVKSKNPLPTLEGSIQNVELKYCSTSLVKCASGTVGSIKI
GAKAPGDSGKELIPELLQGPSDTKDLHSSKWLNESRKPESLAPDLTAFTVQVPQYMYOYCHNSGAVLLGSVQGVAVNIDPVLVYVQPKRTRSRHMQQPPVIAVPIVTPISRKKKEDEVSVG
SAPLAKQSYQASEYASSPIKTKITTESRPLSVPVYKAMLNISEGCRSPEERMKPEFVGVVWAVKSLTLQLEVQSCCVVPMDSLPSSTIVSODIPGTVRSWYHGQTSMPGMLLGLPQIKIISA
GHKYMELPQEPFVPIRPIILEGNAPFVITSLHHSMYTLFGKQVTFCLVPEMGTCTSLAVTISQKLLATGPDTRHSEFVCLHVDLESQIKQCSNPQVQLLYELTDNVNKVWNQIQRGNLSPSS
AYPETMAGVPPGSPVRSVGTAPPDITSCPSADFGTITTEGDSIQAGDSDPFSDSVTLQEQITTSNIGGSSGRISLWMQWVLPKTIKLPADDPENKGTTELCSVELELDSASIDVQVYTKVKCK
IESFNIDHYRSSFEECWSLQCCGGVFLSCTDKLNRRLTLVRSIKQDPFNSCGFFPSTAKLLDGGSHQQHGFLLSLTYTKAVTKNRHKLTSRNRERSLHKLSEGLTDGSPHFLHEILLSAQ
FDIVLGFPLNIAISFQAQLPRTQEKRRKSPGQPMRSHLTLSRSLPIIYINTSVIRIFVPKTEEMQPSIEVNTVKEDETMVLKIGSVAMAPQADNPLGRSVLRKDIYQRALNGLRDPGSEIEDR
QYQIDLHSHINISITAQWDLKPEKESGOTGVLTESERNSQNPALWMMASSIRRHQERRALPTLITDFSSVITAPAHITFKIISPENMHEEILVCGHSELVNITDLDFFLSVAQQLHLHLIVA
NMIGLEPSSKAKEISKQEQKMDFTEGSMATSSRYSGAODSGIGSDSVKIRIVQIEQHSQIQRHRIARPSROSSIVKNLNFIPDFIEITASRISLMTYSCSAIPKSKQVHKDNEKTGKSSNLBR
EVDSDVAKPSQACISTVTAEDLLSSRVSPGKGIKVISLESLEHASTRSSARQALGITVIRQGRGTGDLQLEPFYFVYQPSLLSCHHRKQVREISIFDAVLKGVASDYKCTDPGKTLPEAL
DYCTVWLQTVPEIDSKSGIPPSLVTLQIKDFLNGPADINLIDSKPLKANLSETKLDQIKNLLKRINTHSETSAPLDMLNKDEFTPSKCFCKGKSKPKVHGGDAQIPFQENMWRVTSQCFQK
SVHTTQIVVSMETVPHDPKPCLLASLNSLSSLNVTAKQKVPGVILGSSFLNINDFLLKTSLKERNRILIGPCANANLEAKWCKHSGNPPGEGSIPKISIDLQGGLLQVFWGQEHNLCLVLRH
ELLSGVLNKGNEFEVQVPEAVQPMPSPIEMNNOIKFSQSSDDLRTGLFQYIRDAEPLKMPGVYVYVYNETDESSEMMLWRVPEPRVLTLVRIIPVFNATDEDDISADLGDMLQIPCSLEYW
DELQKVFVAFQEFSLSESKVCELQPDINLVSDDKLVSSDLWRIVLNSSQNGADDSASSESGSQTCDLVITPALAAGTRVDSCTFPWFVPSLSISFQAHLEHLCHHLDLGLGTAPPQYL
KPFISDKNVPSLEYEMISIFKAPHYLRLQWNNSPVCQEIRFSSQADCKLLEGRVNTMQSMVKSFSIFGQIAISREAVEKLDLCIIIVDSIFVNGQVHVHSLNTAVQAWQKQKCEVEELVSHFV
ICNDTQETLRFQGVQDDENIILASLHSHGYSWRSHKSPQKLLHICIEGWGNWRWSEPFSSVDHAGTFIRTIQYKORTASLVIKVRQSGGQKQIICGRQIICSLYSQSIELKVYQHYISQDGAIVR
EHFDCLTAKQKLPYSILENSELTELGVKAGNEDWSDVQLESKSPESYIVIQVPSNNSIFYYWQVCTVLTLEPNSSVQQRMIIVFSPFLMRSHLPDPPIIHLKRSLSLSETOIIPGKGRKPLQNI
EPDVLVHHLTFQAREDDPSHGAVPISLJKGIATKIPGOTVNLIDEFYQPEKSLQPMWYKNDSDRNEQLSOWSPMRVLSVWPKYKTLIELLPWALINGSKWDLWLFEGEKIVLQ
VPAGKIIIPNFQEFQIGYAVPANTVHKSVAIKLVHNLTSPKWKDGGNGEVVSLDEEGVDAEIRLGAFFGHOKLQFGSSMVQGGIIGIEQKTHIINMPPYQIFKPKQVSKPSSGKEYE
HPTDSATFICPGGGEQAAYKPSLPCWDLMPDMSQSPDLTSLQKQILLAFSPAAGAGSSQCSWLSPAIVRQEPFQPSVAVPFGNRRGENGFCRTRAVALTQEHVLYLTLSEDPSPRIIFHNRQ
PVTILIKENIDIPSEFEVYRSECCSIHHELYHQISSYPDCKTKDILLPSLFLRAESLEVDVTAEWSADAVINNOGTQVVVLTGFGYVYVYDHLQCGTVFIVTAPEGKVEPIITLTSNRTLEKMYTLKI
FITQLSLVVFDLSSHKASSELRLRLTDHVFQVAVPAGPLPGEAAVAAPRLRHAVELYCGDLQDNLQLYSKSNFHAVLVCQENAGPVQRAKRVHSLASGRDLEEKDGFIKLCLTISEGR
SCRDDINELRFELKAPRYEDIFYYVIRLFEYLPFGDLGAPAGPSGGEQVLPQVRQHARALNVYKLRKLVIPVSLVSHIASLKLYIASDITPLSFSVFERGVPFTARQLVHALAM
HYASGALFRAGWVSELEIGSPASLRSINGIADFRFLPYGLTRGPGAFVSVSRGRTSEYKHISKSTLSITMLATSLARNMDRSLDEHYNRQERWRRLQEPSELGEGRLSRLS
LLGAIAIGVDPQMQRTRTEAHASAGHKAKGIVISGVGKGIQGVFTKPIGGAELVLSQTYGILHAGALSQPKQRYQPSLDHADQAPNSHYKVVWMLQSLGRPEVIMALEVVMVRGSGQE
HGGCLLTVSELVFVSVSDEDTQQQAFITEIDCAQDSKSNLFTVQLRQPRVACDVEVDGARERLSEQQYRNLVDYITKTSCHLAPSCSSMGTQPCPVVAVEPLSTVKTYHYMVDPHFAQVFIK
KFTMVKKNKALRKGFP

5.5.3. *In silico* porovnání ortologů genu *VPS13B*

Pomocí databáze Ensembl bylo provedeno porovnání ortologů psiho genu *VPS13B*.

Výsledky z porovnání jsou na obrázku 25.

Obrázek 25 Genetický strom ortologů genu *VPS13B* - výstup databáze Ensembl



6. Diskuze

6.1. Volba modelových plemen

Ve všech použitých, vědecky publikovaných člancích autoři vždy jako modelové plemeno použili border kolii. Shearman a Wilton (2011) nejdříve použili 69 jedinců, u kterých věděli, že 6 psů bylo určitě nemocných, 10 bylo přenašečů a zbylých 47 jedinců teprve otestovali. Následně zkoumali tisíce psů z různých států. Mizukami et al. (2012) otestovali jediného zástupce tohoto plemena, který vykazoval příznaky syndromu a Mason et al. (2012) zkoumali tři štěňata plemene border kolie, která onemocněním trpěla. V žádném z těchto článků nebyly uvedeny jiné příklady plemen celkově testovaných na tuto mutaci.

Z tohoto důvodu byli prioritně vybráni jedinci plemene border kolie, následně, jako kontrolní skupina, byli vybráni jedinci skupiny retrievrů. Retrievři byli vybráni z důvodu jejich velmi častého využití pro asistenční aktivity.

U všech border kolií nebyla zjištěna informace, zda jednotlivci podstoupili detekci mutace v některé akreditované laboratoři. Všichni jedinci byli zdraví, takže se dalo předpokládat, že se mezi nimi nebude nacházet recesivní homozygot, protože Syndrom uvězněných neutrofilů bývá ve většině případů letální, popřípadě štěňata bývají ve velmi špatné kondici, trpí průjmy, zvracením a nedožívají se vysokého věku.

V této bakalářské práci byla ověřena 11 % frekvence výskytu přenašečů. Tyto hodnoty odpovídají výsledkům jiných studií, že se v celé populaci border kolií nachází kolem 10 - 11 % přenašečů.

6.2. Metody izolace DNA

Shearman a Wilton (2011) použili ve svém výzkumu pro izolaci DNA jako vzorek krev. K izolaci DNA z krve použili metodu „salting out“. Dále využili sekvenační kit ABI BigDye (Applied Biosystems) a pro sekvenaci využili přístroj ABI 3730 DNA Analyzer.

Mizukami et al. (2012) ve svém výzkumu pracoval se vzorky krve a slin, využil gelovou elektroforézu, dále použil kit Qiaquick Gel Extraction a pro sekvenační analýzu použil přístroj MCE-202 MultiNA Microchip Electrophoresis System (Shimadzu Corp.).

Mason et al. (2014) použil výsledky testů z Laboklinu a z Univerzity v Novém Jižním

Walesu v Austrálii, proto nejsou dostupné metody izolace a typ vzorku.

Vzhledem k ozkoušeným metodám podle Shearman a Wilton (2011), byla pro tuto práci použita metoda kapilární elektroforézy přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Jako vzorek byl použit stěr z bukální sliznice.

6.3. Navržení PCR markerů genu *VPS13B* pro detekci mutace fragmentační analýzou pomocí kapilární elektroforézy

Mizukami et al (2012) a Shearman a Wilton (2011) ve svých článcích publikovali pouze jeden primerový pár, který byl použit pro sekvenaci. Použity byly programy Primer3 a GenBank.

V této práci byly použity rozdílné primery, první pár pro detekci mutace a druhý pár pro sekvenaci. Oba primerové páry byly navrženy pomocí programu Primer3.

6.4. Navržení PCR markerů genu *VPS13B* pro sekvenaci

Shearman a Wilton (2011) pro navržení primerů potřebných pro sekvenaci použili program Primer3. Autoři ke svému článku přiložili tabulku s danými primery pro všechny exony, dále uvádějí, že primery byly zasazeny do intronů lemující daný exon, pro který jsou primery navrhovány. Pomocí *in silico* analýzy byly primery zkontrolovány a bylo zjištěno, že primery jsou chybně vytvořeny, že daný F-primer pro exon 19 nasedá již v intronu 17 – 18. Následně bylo dokázáno, že R-primer nasedá v intronu 18 – 19 a tedy lemuje exon 18.

Z tohoto důvodu byly navrženy nové primery pomocí programu Primer3.

6.5. Detekce mutace genu *VPS13B* pomocí kapilární elektroforézy

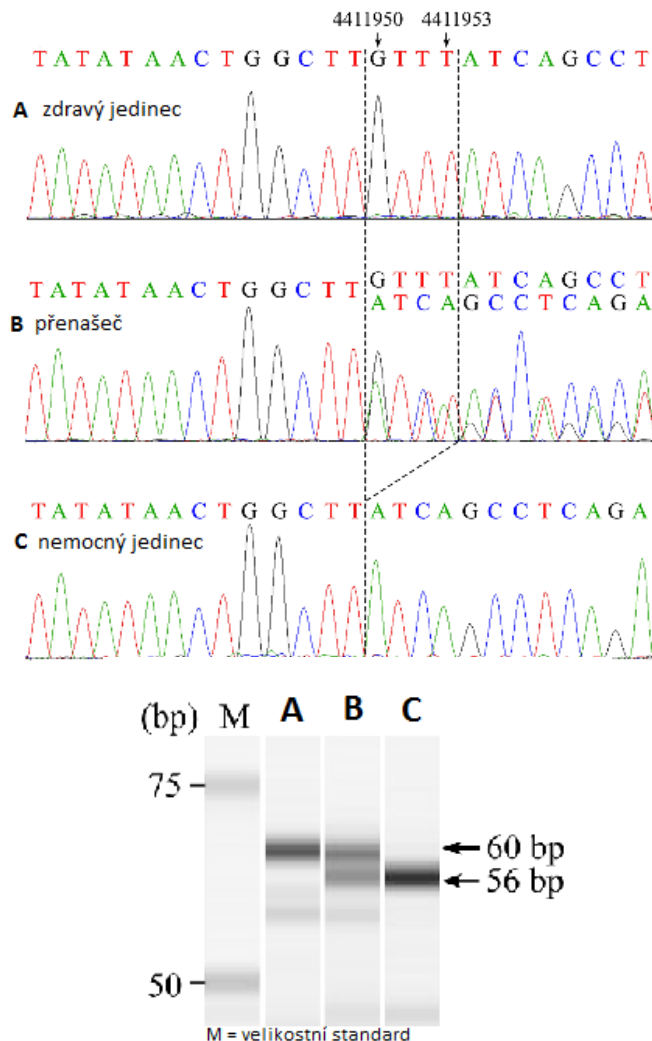
Mizukami et al. (2012) publikoval ve svém článku výsledky, které jsou vyznačené na obrázku 26.

Na horní části obrázku je vidět sekvence nukleotidů u zdravého jedince (byl použit vzorek jedince plemene bígl, u kterého se mutace nevyskytuje), následuje sekvence přenašeče (rodič afektovaného jedince) a sekvence nemocného jedince.

Na dolní části obrázku je vidět záznam z elektroforeogramu, na kterém je vidět rozdíl v počtu bází mezi zdravým, přenašečem a nemocným jedincem oproti velikostnímu standardu. Tímto rozdílem v počtu bází - delecí 4 bází (GTTT) – autoři dokázali přítomnost mutované alely.

Tyto výsledky získali z přístroje MCE-202 MultiNA Microchip Electrophoresis System (Shimadzu Corp.).

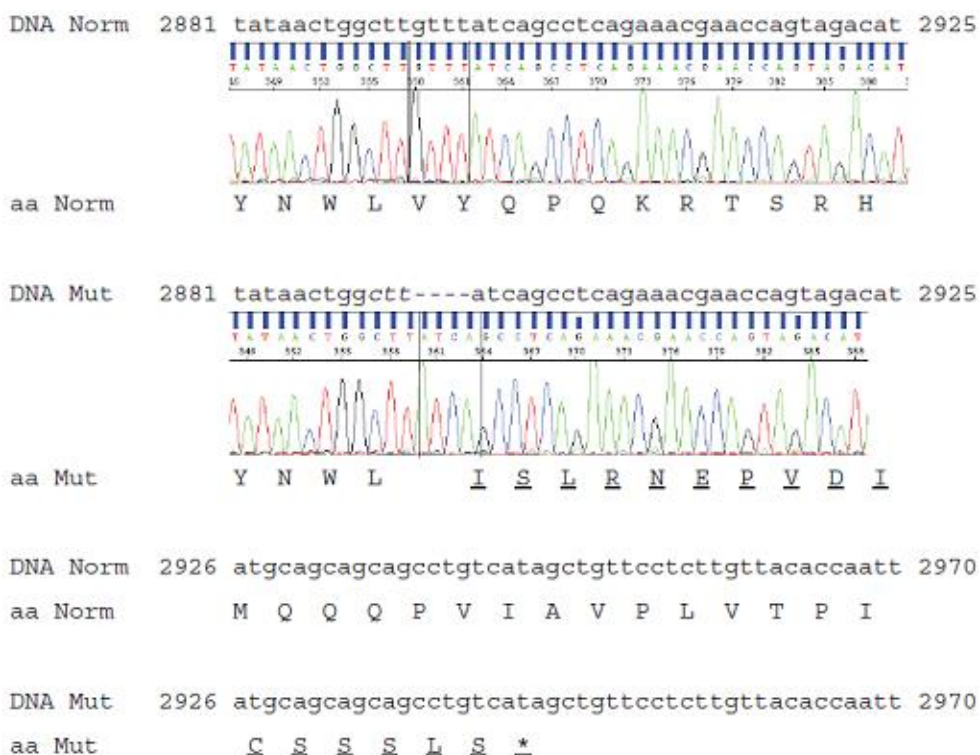
Obrázek 26 Výsledky výzkumu Mizukami et al. (2012)



Shearman a Wilton (2011) publikovali výsledky, u kterých stejně jako Mizukami et al. (2012) dokázali delecí 4 bází a následně nastínili změnu v syntéze proteinu. Změna v syntéze nastává z důvodu delece 4 bází (každou aminokyselinu kódují 3 báze), proto se mění skladba zbytku proteinu (obrázek 27).

Pro tyto výsledky využil přístroj ABI 3730 DNA Analyzer.

Obrázek 27 Výsledky výzkumu Shearman a Wilton (2011)



V experimentální části této práce byla také prokázána delece 4 bází (obrázek 17). Pomocí kapilární elektroforézy byli detekováni heterozygoti nesoucí mutovanou alelu a následně pomocí sekvenace u nich byla prokázána delece 4 bází.

7. Závěr

Literární přehled je zaměřený zejména na podrobné informace ohledně onemocnění Syndromu uvězněných neutrofilů a také na jeho paralelní verzi, která se vyskytuje u člověka, Cohenův syndrom. Dále jsou v literárním přehledu vytyčeny české laboratoře a jejich nabízené testování, na které se může zájemce o testování obrátit.

Pro experimentální část pro testování přítomnosti deleční mutace byla vybrána plemena border kolie, zlatý retrívr, labradorský retrívr a Nova Scotia duck tolling retrívr. Border kolie byly vybrány z důvodu výskytu delece u tohoto plemene, retrívři byli vybráni z důvodu jejich častého využití pro asistenční aktivity a jejich vzorky byly použity jako kontrolní. V této části byla zanalyzována metodika, výsledky daného testování a diskuze k danému onemocnění

Celkové výsledky této práce, ze sjednocení literárního přehledu a získání výsledků z experimentální části, jsou uvedeny v jednotlivých odrážkách.

- Mutace genu *VPS13B* opravdu způsobuje deleci 4 bází (GTTT) v 19. exonu na 13. chromozomu.
- Kvůli deleci 4 bází způsobuje mutace vznik jiného proteinu.
- Deleční mutace se nachází pouze u plemene border kolie, u retrívrů se mutace nevyskytovala.
- Syndrom uvězněných neutrofilů je autozomálně recesivní onemocnění – všichni jedinci s přítomnou mutovanou alelou byli heterozygoti.
- Mutace byla nalezena u jedinců z celého světa z různých chovných linií, toto zjištění zřejmě souvisí s tím, že se daná mutace u plemene border kolie objevila při vzniku plemene, možná ještě před ním (otázkou je, zdali se mutace nachází i u jiných ovčáckých plemen).
- Primery *VPS13B-CZU1-F*, *VPS13B-CZU1-R* a *VPS13B-CZU2-F*, *VPS13B-CZU2-R* jsou vhodně navrženy.
- Kapilární elektroforéza je vhodná analýza pro detekci mutace, výsledky detekce mutace byly 100 %.

Z literární rešerše, která byla potvrzena experimentálním výzkumem, vyplynulo, že deleční mutace se objevuje u 11 % vizuálně zdravých jedinců. I přes požadavek poradců

chovu, kdy alespoň jeden z rodičů plánovaného vrhu musí mít negativní výsledek testu na TSN, je v populaci mutovaná alela velmi rozšířena.

Aby se zamezilo dědění mutované alely, bylo by vhodné, aby se testovali oba rodiče a pozitivnímu jedinci byla zakázána chovnost. Border kolie jsou v poslední době velmi oblíbeným plemenem a v databázi Klubu chovatelů border kolií je zapsáno kolem 8 500 jedinců, což může být považováno za silnou populaci. Tímto pádem by nebyla ohrožena budoucnost plemene. Tato striktní selekce je jedinou šancí zbavit se tohoto onemocnění v české populaci. Dále je vhodné, aby majitel chovného jedince sám trval na negativních testech TNS druhého rodiče plánovaného vrhu, byť u českého či zahraničního chovatele.

Doporučení zavedení selekce je z důvodu možného zplození nemocných jedinců, kteří buďto po porodu umírají nebo žijí velmi nekvalitním životem. Trpí bolestmi a nejsou schopni se s tak oslabenou imunitou začlenit do běžného života.

Tato bakalářská práce potvrdila domněnky výzkumníků z předchozích vědeckých článků a zhodnotila frekvenci přenašečů napříč českých jedinců.

8. Literatura

8.1. Vědecké, odborné a knižní publikace

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Espero publishing Ústí nad labem. 740 s. ISBN: 80-902906-2-0.
- Allan, F. J., Thompson, K. G., Jones, B. R., Burbidge, H. M., Mckinley, R. L. 1996. Neutropenia with a probable hereditary basis in border collies. New Zealand veterinary journal. 44. 67-72.
- Balikova, I., Lehesjoki, A. E., de Ravel, T. J. L., Thienpont, B., Chandler, K. E., Clayton-Smith, J., Träskelin, A. L., Fryns, J. P., Vermeesch, J. R. 2009. Deletions in the *VPS13B (COHI)* gene as a cause of Cohen syndrome. Human mutation. 30(9). 845-854.
- Bauer, N. K. 1997. The proper care of golden retrievers. T.F.H. Publications. Neptune city. 208 s. ISBN: 07-938-2082-0.
- Beránek, J. 2005. Ortopedická rentgenologie. Noviko a.s. Brno. 130 s. ISBN: 80-86542-07-6.
- Boneham, S. W. 2006. Golden retrievers. T.F.H. Publications. Neptune city. 111 s. ISBN: 07-938-3757.
- Carey, J. C., Hall, B. D. 1978. Confirmation of the Cohen syndrome. Journal of pediatrics. 93. 239-244.
- Císařovský, M. 2008. Pes: nekonečný příběh od pravěku do třetího tisíciletí. Canis. Praha. 902 s. ISBN: 978-80-900-8201-4.
- Cohen, M. M., Jr., Hall, B. D., Smith, D. W., Graham, C. B., Lampert, K. J. 1973. A new syndrome with hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular, and limb anomalies. Journal of pediatrics. 83(2). 280-284.
- Duke, B. 2001. Labradorský retrívr. Praha: fortuna print. 157 s. ISBN: 80-861-4493-3.
- Evans, J. M., White, K. 2014. Průvodce péčí o psa. Brázda. Praha. 272 s. ISBN: 978-80-209-0401-0.
- Faltusová, K. 2010. Zlatý retrívr. Robimaus - sdružení Magdaléna a Robert Javorských. Rudná u Prahy. 71 s. ISBN: 978-80-87293-16-4.
- Fogle, B., 1995. Ilustrovaná encyklopedie psů. Fortuna print. 312 s. ISBN: 80-7321-158-0.
- Galton, F. 1865. The first steps towards the domestications of animals. Transactions of the ethnological society of London. 3. 10-14.

- Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., Cox, T., Cuff, J., Curwen, V., Down, T., Durbin, R., Eyraas, E., Gilbert, J., Hammond, M., Huminiecki, L., Kasprzyk, A., Lehvaslaiho, H., Lijnzaad, P., Melsopp, C., Mongin, E., Pettett, R., Pocock, M., Potter, S., Rust, A., Schmidt, E., Searle, S., Slater, G., Smith, J., Spooner, W., Stabenau, A., Stalker, J., Stupka, E., Ureta-Vidal, A., Vastrik, I., Clamp, M. 2002. The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Research*. 30(1). 38-41.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic press. London. 482 s. ISBN: 0-12-372181-4.
- Kivitie-Kallio, S., Norio, R. 2001. Cohen syndrome: essential features, natural history, and heterogeneity. *American journal of medical genetics*. 102(2). 125-135.
- Kolehmainen, J., Black, G. C., Saarinen, A., Chandler, K., Clayton-Smith, J., Traskelin, A. L., Perveen, R., Kivitie-Kallio, S., Norio, R., Warburg, M., Fryns, J. P., de la Chapelle, A., Lehesjoki, A. E. 2003. Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, *COH1*, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *American journal of human genetics*. 72. 1359-1369.
- Kubeš, J., Korda, F. 1998. Retrívři. České Budějovice. Dona. 141 s.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X. H., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., DeJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C. W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., Decaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K. P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M. J., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C., Lander, E. S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438 (7069). 803-819.
- Mason, S. L., Jepson, R., Maltman, M., Batchelor, D. J. 2014. Presentation and management of Trapped neutrophil syndrome (*TNS*) in UK border collies. *Journal of small animal practice*. 55 (1). 57-60.
- Mcleavy, A., 2008. Border kolie - péče a výcvik. Ottovo nakladatelství. 80 s. ISBN: 978-80-7360-512-4.

- Mendez, H. M., Paskulin, G. A., Vallandro, C. 1985. The syndrome of retinal pigmentary degeneration, microcephaly, and severe mental retardation (Mirhosseini-Holmes-Walton syndrome): report of two patients. *American journal of medical genetics*. 22. 223-228.
- Mirhosseini, S. A., Holmes, L. B., Walton, D. S. 1972. Syndrome of pigmentary retinal degeneration, cataract, microcephaly, and severe mental retardation. *American journal medicine genetics*. 9. 193–196.
- Mizukami, K., Chang, H. S., Yabuki, A., Kawamichi, T., Hossain, M. A., Rahman, M. M., Uddin, M. M., Yamato, O. 2012b. Rapid genotyping assays for the 4-base pair deletion of canine *MRD1/ABCBI* gene and low frequency of the mutant allele in border collies. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 24. 127–134.
- Mizukami, K., Shoubudani, T., Nishimoto, S., Kawamura, R., Yabuki, A., Yamato, O. 2012a. Trapped neutrophil syndrome in a border collie dog: clinical, clinico-pathologic, and molecular findings. *Journal of veterinary medical science*. 74. 797-800.
- Mooreová, S., 2002. *Kolie*. Fortuna print. 160 s. ISBN: 8086144704.
- Mullis K. B., Faloona F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods enzymol*. 155. 335–350.
- Nash, W. G., Menninger, J. C., Weinberg, J., Padilla-Nash, H. M., O'Brien, S. J. 2001. The pattern of phylogenomic evolution of the canidae. *Cytogenetics and cell genetics*. 95 (3-4). 210-224.
- Nečas, A., Griffon, D. J. 2004. *Diagnostika a léčba dysplazie kyčelního a loketního kloubu*. M+H vet. Brno. 64 s. ISBN: 80-7305-483-3.
- Nohelová, E. 2013. *Retrívři a vodní psi*. Nakladatelství plot. Praha. 205 s. ISBN: 978-80-7428-170-9.
- Norio, R., Raitta, C. 1986. Are the Mirhosseini-Holmes-Walton syndrome and Cohen syndrome identical. *American journal of medical genetics*. 25. 397–398.
- Norio, R., Raitta, C., Lindahl, E. 1984. Further delineation of the Cohen syndrome: Report on chorioretinal dystrophy, leukopenia and consanguinity. *Clinical genetics*. 25. 1–14.
- Ostrander, E. A., Wayne, R. K. 2005. The canine genome. *Genome research*. 15 (12). 1706-1716.
- Price, E. O. 1984. Behavioral aspects of animal domestication. *The quarterly review of biology*. 59 (1). 1-32.
- Raber, H. 1994. *Encyklopedie - plemena psů 1*. Blesk. Praha. 768 s. ISBN: 80-85606-55-0.

- Seifert, W., Holder-Espinasse, M., Kühnisch, J., Kahrizi, K., Tzschach, A., Garshasbi, M., Najmabadi, H., Walter Kuss, A., Kress, W., Laureys, G., Loeys, B., Brilstra, E., Mancini, G. M., Dollfus, H., Dahan, K., Apse, K., Hennies, H. C., Horn, D. 2008. Expanded mutational spectrum in Cohen syndrome, tissue expression, and transcript variants of *COH1*. *Human mutation*. 30 (2). 404-420.
- Schneidermannová, B. 1999. Retrivr. Jan Vašut s. r. o. Praha. ISBN: 80-7236-099.
- Shearman, J. R., Wilton, A. N. 2011. A canine model of Cohen syndrome: Trapped neutrophil syndrome. *BMC genomics*. 12. 258.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. 2009. *Genetika*. Masarykova univerzita. 871 s. ISBN: 978-80-210-4852-2.
- Sova, Z. 1987. *Nemoci psů*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. ISBN: 07-113-87-04-48.
- Štěpánský, K. 1974. *Služební a pracovní plemena psů*. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 295 s. ISBN: 07-041-74.
- Tahvanainen, E., Norio, R., Karila, E., Ranta, S., Weissenbach, J., Sistonen, P., de la Chapelle, A. 1994. Cohen syndrome gene assigned to the long arm of chromosome 8 by linkage analysis. *Nature genetics*. 7. 201-204.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40(15). E115.
- Verhoef-Verhallen, E. 2002. *Border kolie*. 1. Vydání. Rebo production cz. Dobřejovice. ISBN: 80-7234-214-2.
- Vilá, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R., Rice, J. E., Honeycutt, R. L., Crandall, K. A., Lundeberg, J., Wayne, R. K. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*. 276 (5319). 1687-1689.
- Watson, J. D., Tooze, J., Kurtz, D. T. 1988. *Rekombinantní DNA*. Academia. Praha. 293 s.
- Wouda, R. M., King, T. J., Mackay, B. M. 2010. Long-term management of Trapped neutrophil syndrome in two border collies. *Australian veterinary practice* 40. 58-63.

8.2. Internetové zdroje

- About us [online]. OptiGen for the genetic advantage. 13.8.2012 [cit. 2016-4-4]. Dostupné z www.optigen.com/opt9_about.html.
- Genservice [online]. Genservice s.r.o. Zkušební laboratoř molekulární genetiky a cytogenetiky. [cit. 2016-1-26]. Dostupné z <http://www.almara.cz/genservice/>.

- Golden Retriever [online]. Retriever klub CZ. 8.11.2010 [cit. 2016-3-8] Dostupné z <http://www.retriever-klub.cz/plemena/19/golden-retriever>.
- Chov [online]. Border collie club Czech Republic. [cit. 2016-2-15]. Dostupné z <http://www.bcccz.cz/chov.htm>.
- Chovné podmínky [online]. Retriever klub CZ. 2.3.2016 [cit. 2016-3-8] Dostupné z <http://www.retriever-klub.cz/chov/50/chovne-podminky>.
- Labrador Retriever [online]. Retriever klub CZ. 28.3.2012 [cit. 2016-3-8] Dostupné z <http://www.retriever-klub.cz/plemena/21/labrador-retriever>.
- Naše služby [online]. Genomia: genetic laboratory. [cit. 2016-1-26] Dostupné z <http://www.genomia.cz/cz/>.
- O nás [online]. Laboklin: Labor fur Klinische Diagnostik. [cit. 2016-4-4]. Dostupné z http://www.laboklin.de/pages/html/cz/About/o_nas_cz.html.
- PCR [online]. Labguide: průvodce laboratoří. [cit. 2016-1-26]. Dostupné z <http://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/Ke-sta%C5%BEen%C3%AD-PCR1.pdf>
- RTG a DNA [online]. Český klub německých ovčáků. [cit. 2016-2-15] Dostupné z <http://www.ceskyklub-no.cz/rtg,-dna>.
- Služby [online]. Genetická veterinární laboratoř GenRex s.r.o [cit. 2016-1-26] Dostupné z <http://www.genrex.cz/sluzby>.
- Standard NO [online]. Český klub německých ovčáků. [cit. 2016-2-15] Dostupné z <http://www.ceskyklub-no.cz/standard-no>.
- Tučímová, J., O plemeni [online]. Border collie club Czech Republic. [cit. 2016-2-15]. Dostupné z <http://www.bcccz.cz/oplemeni.htm>.