

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

## ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

### Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Studijní program: Zemědělské inženýrství (N4101)  
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

### Detekce mutace genu *MDR1* u ovčáckých psů metodou loop-mediated isothermal amplification a restriční analýzou

Vedoucí diplomové práce: Ing. Dagmar Stehlíková Ph.D.  
Konzultant diplomové práce: Ing. Pavel Beran Ph.D.  
Autor diplomové práce: Bc. Nikola Vyhlídalová

České Budějovice

2020

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Nikola VYHLÍDALOVÁ
Osobní číslo:	Z18050
Studijní program:	N4101 Zemědělské inženýrství
Studijní obor:	Zemědělské biotechnologie
Téma práce:	Detekce mutace genu MDR1 u ovčáckých psů metodou loop-mediated isothermal amplification a restriční analýzou
Zadávací katedra:	Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

### Zásady pro vypracování

**Úvod:** Mutace genu MDR1 (multidrug resistance gene) je u psů asociována s přecitlivělostí na určité druhy léků. Mutace způsobuje náchylnost zvířete k potenciálně smrtelné neurotoxicitě. Cílem diplomové práce je zpracovat literární přehled dosavadních poznatků o této geneticky podmíněné chorobě v závislosti pro ovčácká plemena a analyzovat jejich genotypy. DNA bude izolována ze stěrů z bukalní sliznice. Analýza mutace genů bude prováděna metodou loop-mediated isothermal amplification (LAMP) a restriction fragment length polymorphism (RFLP).

**Cíle práce:** Definice hypotéz a cílů práce.

**Literární přehled:** Charakteristika a význam geneticky podmíněného onemocnění MDR1, charakteristika ovčáckých plemen, princip LAMP metody, princip RFLP.

**Materiál a metody:** Charakteristika testovaných vzorků, izolace genomické DNA, optimalizace LAMP metody, optimalizace RFLP metody, analýza vzorků, vyhodnocení získaných dat.

**Výsledky:** optimalizace metod, vyhodnocení dat.

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

**Závěr:** Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce.

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

**Obsah:** Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah pracovní zprávy: 45-50 stran

Rozsah grafických prací: 10-15 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

## Seznam doporučené literatury:

- Suedl, C. P., & Weber, K. (2017). Fast and simple detection methods for the 4-base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene by PCR and isothermal amplification. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(2), 176-180.
- Geyer, J., Doring, B., Godoy, J. R., Montz, A., & Petzinger, E. (2005). Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 28(1), 95-99.
- Neff, M. W., Robertson, K. R., Wong, A. K., Safra, N., Broman, K. W., Slatkin, M., ... & Pedersen, N. C. (2004). Breed distribution and history of canine *mdr1-1?*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(32), 11725-11730.
- Sartor, L. L., Bentjen, S. A., Trepanier, L., & Mealey, K. L. (2004). Loperamide toxicity in a collie with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of veterinary internal medicine*, 18(1), 117-118.
- Yas-Natan, E., Shamir, M., Kleinbart, S., & Aroch, I. (2003). Doramectin toxicity in a collie.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.
- Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes*, 16(3), 223-229.
- Mon, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(1), 150-154.
- Gramer, I., Leidolf, R., Doring, B., Klintzsch, S., Kramer, E. M., Yalcin, E., ... & Geyer, J. (2011). Breed distribution of the nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs. *The Veterinary Journal*, 189(1), 67-71.
- Klintzsch, S., Meerkamp, K., Doring, B., & Geyer, J. (2010). Detection of the nt230 [del4] MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. *The Veterinary Journal*, 185(3), 272-277.
- Šmarda J. a kol. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně, 2008, 188 s.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.  
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: Ing. Pavel Beran, Ph.D.  
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 20. února 2020

Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2020



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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 1568, 37106 Česká Budějovice



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

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci s názvem Detekce mutace genu *MDRI* u ovčáckých psů metodou loop-mediated isothermal amplification a restrikční analýzou jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 30. 6. 2020

.....

Bc. Nikola Vyhlídalová

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce Ing. Dagmar Stehlíkové, Ph.D. za odborné rady, ochotu a za čas, který věnovala tomu, aby mohla tato práce vzniknout. Dále bych ráda poděkovala všem majitelům ovčáckých psů za poskytnutí vzorků. V neposlední řadě děkuji celé své rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia.

# **Detekce mutace genu *MDR1* u ovčáckých psů metodou loop-mediated isothermal amplification a restriční analýzou**

## **Abstrakt**

Mnohočetná léková rezistence způsobená mutací genu *MDR1* je častou geneticky podmíněnou chorobou u ovčáckých psů. Nejvíce jsou touto mutací postiženi zástupci plemene kolie. Popisovaná mutace je způsobena delecí čtyř nukleotidů, které vedou k posunu čtecího rámce a předčasnému ukončení syntézy P-glykoproteinu, což je transportní protein některých léčiv. Vzniklý nefunkční P-glykoprotein není schopný odbourat léčiva z mozku, což vede k neurotoickým problémům postižených psů.

V literárním přehledu je popsána struktura a funkce P-glykoproteinu, a porucha jeho funkce způsobená mutací kódujícího genu *MDR1*. Také jsou zde popsána nejčastěji postižená plemena a problémová léčiva pro psy s popisovanou mutací. Součástí literárního přehledu je i popis a princip metod použitých k detekci popisované mutace.

Cílem diplomové práce byla optimalizace a screening vzorků DNA ovčáckých psů na přítomnost mutace v genu *MDR1* metodami LAMP a PCR-RFLP a jejich vzájemné srovnání.

V praktické části jsou zpracovány vlastní výsledky práce. Vyšetřovaný soubor tvořilo 140 vzorků DNA ovčáckých psů. Výsledky potvrdili největší výskyt recesivních homozygotů u plemene krátkosrsté kolie (25 %), u které byl také zjištěn největší počet heterozygotních jedinců (50 %). Překvapivý byl počet zdravých přenašečů u plemene německý ovčák, který dosáhl 49 %. Z testovaného souboru bylo celkem 49 % vzorků dominantně homozygotních. Největší množství zdravých jedinců bylo zjištěno u plemene border kolie (65 %).

## **Klíčová slova**

*MDR1* gen, P-glykoprotein, ovčácký pes, LAMP, PCR-RFLP

# **Detection of *MDR1* gene mutation in Shepherd Dogs by loop-mediated isothermal amplification and restriction analysis**

## **Summary**

Multiple drug resistance is caused by *MDR1* gene mutation. It is a common genetic disease of Shepherd Dogs from which Collie breed is the most affected. Described mutation is caused by deletion of four nucleotides, which leads to a frameshift and premature termination of synthesis of the P-glycoprotein, one of the important transport proteins of some drugs. Synthesized non-functional P-glycoprotein is unable to eliminate drugs from the brain, which leads to a neurotoxic problems in affected dogs.

The theoretical part describes structure and function of P-glycoprotein and its inhibition caused by *MDR1* coding gene mutation. The most commonly affected breeds are subjected to analysis as well as the problem of drugs for dogs with this mutation. Review also includes a description and principle of methods used for detecting mutation of *MDR1* gene.

The aim of this thesis was to optimize and screen DNA samples of Shepherd Dogs for the *MDR1* gene mutation by LAMP and PCR-RFLP as well as by mutual comparison of both methods.

The empirical part presents the results of the study. The studied population consisted about 140 samples of Shepherd Dogs DNA. Our results confirmed the highest incidence of recessive homozygotes in the tested population of Smooth Collie (25 %). Moreover, the number of heterozygous was also the highest in this breed (50 %). However, the number of heterozygous dogs in the tested population of German Shepherd was surprisingly comparable with population of Smooth Collie, because it reached 49 %. Equal number of the German Shepherd was dominantly homozygous. Whereas, the highest number of healthy dogs was found in the tested population of Border Collie breed (65 %).

## **Keywords**

*MDR1* gene, P-glycoprotein, Shepherd Dog, LAMP, PCR-RFLP

## Obsah

1	Úvod.....	10
2	Literární přehled .....	11
2.1	Původ a domestikace psa .....	11
2.2	Genom psa.....	12
2.3	ABC transportní proteiny .....	13
2.3.1	Membránový transportér P-glykoprotein.....	13
2.4	Gen <i>MDR1</i> .....	16
2.4.1	Mutace v genu <i>MDR1</i> u ovčáckých psů.....	16
2.4.2	Model dědičnosti genu <i>MDR1</i> .....	19
2.5	Problémová léčiva pro psy s mutací v genu <i>MDR1</i> .....	19
2.5.1	Ivermectin .....	20
2.5.2	Selamectin.....	21
2.5.3	Moxidectin .....	21
2.5.4	Acepromazin .....	22
2.6	Plemena postižená mutací genu <i>MDR1</i> .....	22
2.6.1	Australský ovčák.....	22
2.6.2	Border kolie .....	24
2.6.3	Dlouhosrstá a krátkosrstá kolie.....	25
2.6.4	Německý ovčák.....	26
2.7	Užité metody detekce mutace v genu <i>MDR1</i> .....	27
2.7.1	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP).....	27
2.7.2	Polymerázová řetězová reakce.....	34
2.7.3	PCR-RFLP .....	36
3	Cíle práce a hypotézy.....	37
3.1	Cíle práce .....	37
3.2	Hypotézy .....	37



4	Materiál a metody .....	38
4.1	Extrakce DNA.....	38
4.2	LAMP.....	40
4.3	PCR.....	41
4.4	PCR-RFLP .....	42
5	Výsledky .....	45
5.1	LAMP.....	45
5.2	PCR.....	47
5.3	PCR-RFLP .....	48
6	Diskuse.....	55
7	Závěr .....	59
8	Seznam použité literatury .....	60
9	Seznam zkratek .....	67

## 1 Úvod

Chov ovčáckých psů je v České republice velmi populární, a to zejména díky vysoké inteligenci těchto psů a jejich snadnému vycvičení. Své uplatnění našli nejenom jako pracovní psi, ale využívají se také v celé řadě psích sportů. S rostoucím počtem odchovaných jedinců se však zvyšuje i procento přenašečů mnoha geneticky podmíněných chorob, na což velká část chovatelů nebere ohled. Tento fakt však souvisí s tím, že většina genetických vyšetření není podmínkou pro zařazení psa do chovu a spojení některých psů může mít nepříznivé následky pro nadcházející generace. Jednou z těchto geneticky podmíněných onemocnění je právě i mnohočetná léková rezistence způsobená mutací v genu *MDR1*.

Mutace v genu *MDR1* je u ovčáckých psů způsobena delecí 4 bp, která způsobí posun čtecího rámce a předčasný vznik stop kodonu, což má za následek ukončení syntézy P-glykoproteinu, který je nezbytný pro odbourávání léčiv z mozku. Tím se stává hematoencefalická bariéra v CNS propustnou pro léčiva, která P-glykoprotein transportuje, což vede k neurotoxickým účinkům, a nakonec může dojít i k úhynu zvířete (Mealey et al., 2001).

Tato práce je zaměřena na detekci popisované mutace u pěti ovčáckých plemen. Konkrétně se jedná o plemena australský ovčák, border kolie, dlouhosrstá kolie, krátkosrstá kolie a německý ovčák. Mutací v genu *MDR1* jsou nejvíce postiženi zástupci plemene kolie (až 70 % jedinců) a australský ovčák (přibližně 50 % jedinců) (Stiedl and Weber, 2017).

K detekci mutace *MDR1* genu byly v praktické části této práce použity dvě molekulárně biologické metody, jednalo se o využití technik loop-mediated isothermal amplification a restrikční analýzy. Jedním z cílů práce bylo srovnání těchto použitých metod, přičemž bylo předpokládáno, že metodou LAMP půjde výsledný genotyp určit lépe než pomocí PCR-RFLP.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Původ a domestikace psa

Pes domácí (*Canis lupus familiaris*) se řadí mezi nejstarší domestikovaná zvířata, člověka provází minimálně 14 tisíc let. O jeho původu však existuje mnoho hypotéz. Nejvíce rozšířenou teorií je domestikace psa z vlka šedého (*Canis lupus*), který patřil mezi dominantní predátory Severní Ameriky a Eurasie (Lindblad-Toh et al., 2005).

S cílem potvrzení uvedené hypotézy provedl Freedman et al. (2014) komparativní genomickou analýzu vlků a psů. Referenční vzorek v tomto výzkumu představoval genom boxera, jako zástupce “moderní rasy psa“. K této studii byli vybráni tři zástupci vlka šedého, každý z jiného teoretického centra domestikace psa (Evropa, Blízký východ a východní Asie). Dále byla analyzována jaderná DNA dvou prastarých linií psa – Basenji (Afrika) a Dingo (Austrálie). Právě tato plemena představují, díky své dlouhé historii, příležitost k nalezení spojitosti mezi vlky a nejranějšími plemeny psů. Kromě všech výše uvedených zástupců byla také analyzována DNA šakala obecného (*Canis aureus*), který má se všemi uvedenými společný původ.

Výsledky této studie ukázaly, že žádný ze zkoumaných vlků přímo nestojí za vznikem linie psů. Důkazem je efekt zvaný bottleneck (zmenšení populace), který sice proběhl u vlka i psa, ale liší se v rozsahu a době, kdy nastal. U psů proběhl bottleneck až v průběhu domestikace, kdežto u vlků proběhl mnohem dříve a ve větším rozsahu. Bottlenecky jsou tedy důkazem odlišné historie. Díky této skutečnosti můžeme na základě fenotypové podobnosti vlků a psů usoudit, že pes pravděpodobně vzniknul domestikací jejich společného předka (Freedman et al., 2014).

Dalším důkazem, že psi nevznikli domestikací vlka je původ prastarých linií psů Basenji a Dingo. Výskyt těchto plemen je totiž geograficky oddělen (Afrika a Austrálie). Navíc se jedná o oblasti, kde se vlk běžně nevyskytuje, ale i přesto jsou u obou plemen pozorovatelné stopy po křížení s vlkem, z čehož lze usuzovat, že genový tok probíhal v době před nebo v průběhu domestikace a s největší pravděpodobností musel proběhnout na území Asie (von Holdt et al., 2010).

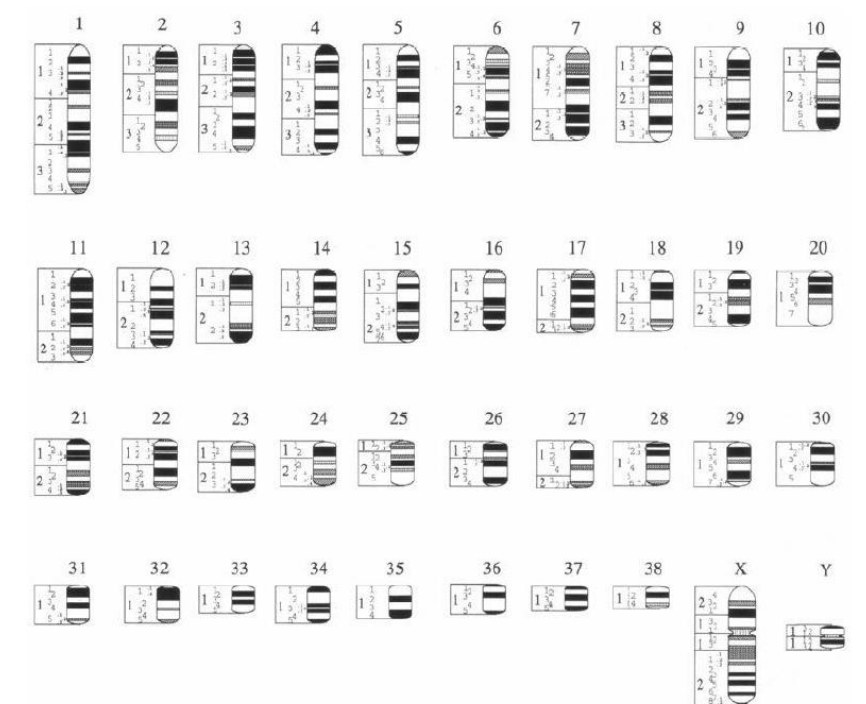
Z výše uvedeného vyplývá, že hypotéza domestikace psa z vlka je mylná. Psi a vlci se s největší pravděpodobností vyvíjeli ze společného předka vedle sebe. Tuto teorii by mohly objasnit rozbory kosterních pozůstatků pravěkých psů (Wayne and von Holdt, 2012).

## 2.2 Genom psa

V červenci roku 2005 uveřejnil tým vědců z amerického programu “The National Human Genome Research Institute“ (NHGRI) výsledky projektu sekvenování genomu psa. K analýze uvedeného výzkumu byla použita DNA boxera, který byl vybrán jako zástupce vysoce prošlechtěného plemene, u něhož byla předpokládána vysoká genetická homogenita (Lindblad-Toh et al., 2005). Projekt sekvenování psiho genomu byl započat zejména kvůli porozumění a srovnání s genomem člověka, s nímž má pes velkou část genových informací společnou. Bylo dokázáno, že mnoho z přibližně 360 genetických onemocnění psů se podobá těm lidským, například epilepsie, cukrovka, některé druhy rakoviny, srdeční onemocnění, slepota, hluchota a další (Parker et al., 2004). Navíc mohou být příčiny genetických poruch srozumitelnější, lépe pozorovatelné a objasnitelné u velkých rodokmenů psů než u malých, outbredních lidských rodin (Kirkness et al., 2003).

Psi genom má velikost 2,4 miliardy párů bází, je tedy o zhruba 18 % menší než genom člověka (Kirkness et al., 2003). Karyotyp psa se skládá z 39 párů chromozomů. Jedná se o 76 akrocentrických autozomů, které jsou podobné velikostí i tvarem. Dále se psi karyotyp skládá ze dvou gonozomů, velkého submetacentrického chromozomu X a malého metacentrického chromozomu Y (Obrázek 1) (Reimann et al., 1999).

**Obrázek 1:** Ideogram genomu psa.



Zdroj: Thorpe-Vargus, 2009.

## 2.3 ABC transportní proteiny

Jednou ze základních funkcí všech živých organismů je transport specifických molekul přes membrány. Pro různé molekuly se vyvinuly jiné transportéry, proto je známo velké množství transportních proteinů. Jednou z největších rodin transportních proteinů je skupina ABC transportérů (ATP binding cassette's). ABC transportéry využívají ATP k ovládnutí průchodnosti kanálu nebo také k přímému transportu molekul. ABC transportní proteiny transportují širokou škálu substrátů včetně aminokyselin, cukrů, kovových iontů, peptidů a proteinů a také velké množství hydrofobních sloučenin a metabolitů. Podle substrátů, které transportují, se ABC transportéry dělí na 7 podskupin: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF a ABCG. ABC geny jsou nezbytné pro mnoho procesů v buňce a mutace v nich způsobují nebo přispívají k rozvoji genetických poruch (Dean et al., 2001).

ABC transportní proteiny byly objeveny u různých biologických druhů – bakterií, rostlin, hub a živočichů (Lehne, 2000).

### 2.3.1 Membránový transportér P-glykoprotein

Jedním z podskupiny ABCB transportních proteinů je Membránový transportér P-glykoprotein, který za přítomnosti ATP transportuje kationty nebo neutrální hydrofobní léčiva přes buněčné a tkáňové bariéry, hraje tedy důležitou roli v rezistenci vůči lékům (Hooiveld et al., 2001).

Membránový transportér P-glykoprotein (Pgp) byl poprvé izolován v roce 1976 z ovariálních buněk lékově rezistentního křečka čínského (*Cricetulus griseus*) (Pechandová et al., 2006).

#### 2.3.1.1 Funkce P-glykoproteinu

P-glykoprotein je exprimován ve zdravé tkáni se sekreční nebo exkretční funkcí, jako jsou například játra, ledviny, střeva, varlata a trofoblasty v placentě. Exprese P-glykoproteinu v těchto tkáních omezuje absorpci léků ze střeva a podporuje jeho vylučování do žluči a moči, čímž omezuje vstup léků do centrálního nervového systému (Geyer et al., 2005a).

Základní funkcí P-glykoproteinu je vylučování potenciálně toxických xenobiotik z těla a obrana před jejich vstupem do mozku a reprodukčních orgánů. Význam P-glykoproteinu v hematoencefalické bariéře byl rozsáhle studován u myši s knockoutovaným *MDR1* genem. Tyto myši jsou zdravé a plodné, ale mají zvýšenou citlivost na léčiva obsahující

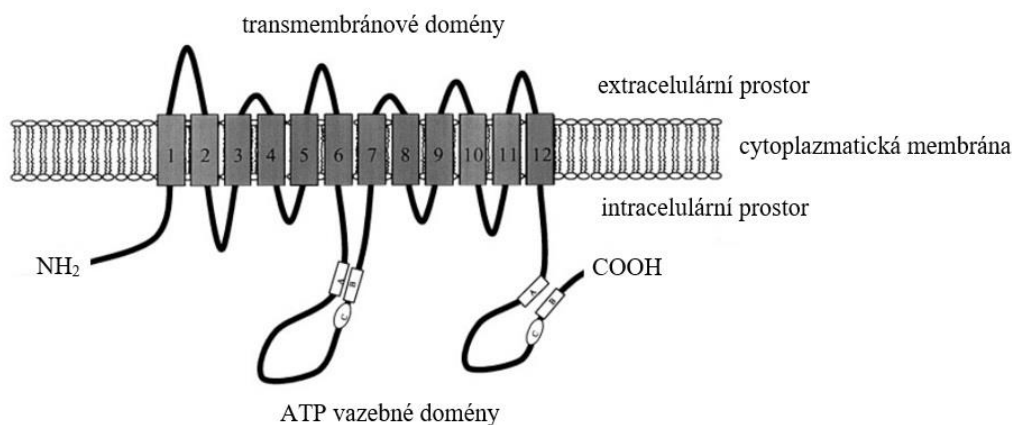
substráty P-glykoproteinu, příkladem takového léčiva může být ivermectin (Geyer et al., 2005a).

### 2.3.1.2 *Struktura P-glykoproteinu*

Struktura P-glykoproteinu byla objasněna v roce 2009. Morfologicky připomíná struktura Pgp válec o výšce 8 nm a průměru 10 nm. Polovina tohoto válce je ukryta v buněčné membráně. P-glykoprotein si můžeme představit jako vodní kanál, který je otevřen do extracelulárního prostoru a uzavřen směrem k cytoplazmě (Aller et al., 2009).

Podklad struktury P-glykoproteinu tvoří transmembránová bílkovina, která se skládá přibližně z 1280 aminokyselin. Tato monomerní bílkovina je tvořena dvěma analogickými částmi. Obě obsahují šest hydrofobních transmembránových domén tvořících “efluxní kanály” a jednu hydrofilní intracelulární doménu schopnou hydrolyzovat ATP (Obrázek 2). Štěpením ATP se uvolní energie, která je pak využita k přenosu substrátu. Tato doména s ATPázovou aktivitou je typická pro všechny ABC transportní proteiny a tvoří ji přibližně 200 aminokyselin. Homologní poloviny jsou propojeny peptidovým segmentem, který je tvořen 75 aminokyselinami (Pechandová et al., 2006).

**Obrázek 2:** Struktura P-glykoproteinu.



Zdroj: Hooiveld et al., 2001.

### 2.3.1.3 *Substráty P-glykoproteinu*

Jednotlivé ABC transportní proteiny reagují specificky pouze s jedním substrátem nebo s velmi úzkým spektrem substrátů. Výjimku tvoří P-glykoproteiny, které jsou na rozdíl od typických transportérů schopné přenosu velkého množství chemicky i funkčně odlišných látek. Jedná se zejména o xenobiotika a léčiva z různých

farmakoterapeutických skupin jako jsou imunopresiva, protirakovinné léky, antiparazitika, antimikrobiální léky, srdeční léky, opiáty a mnoho dalších (Tabulka 1). Mimo to, Pgp také zajišťuje transport některým endogenním hormonům a dalším látkám (Hooiveld et al., 2001).

Většina substrátů interagujících s P-glykoproteiny jsou hydrofobní nebo amfifilní povahy, mají planetární uspořádání a jejich molekulová hmotnost je často vyšší než 400 Da. Velké množství substrátů Pgp jsou při neutrálním pH kladně nabitě. Tato charakteristika není platná pro všechny substráty Pgp. P-glykoproteiny často transportují substráty s molekulovou hmotností menší než 400 Da, mnohdy přenáší i neutrální nebo negativně nabitě substráty, dokonce transportují i molekuly hydrofilní povahy, jako je třeba metotrexát (Pechandová et al., 2006).

Aby se molekula mohla stát substrátem P-glykoproteinu, musí ve své struktuře obsahovat dvě nebo tři elektron-donorové skupiny, které mohou vytvářet vodíkové vazby, pomocí kterých dochází k interakci s vodíkovými vazbami ve struktuře Pgp. Díky této interakci je pak umožněn přenos substrátu (Lehne, 2000).

**Tabulka 1:** Příklady substrátů P-glykoproteinu.

Kategorie léku	Konkrétní léky
<b>Analgetika</b>	acepromazine, butorphanol
<b>Antimikrobika</b>	celoprolol, doxycyklin, erytromycin, intraconazol, ketoconazol, levofloxacin, rifampin, sparfloxacin, talinolol, tetracyklin
<b>Antiparazitika</b>	doramectin, emodepside, eprinomectin, ivermectin, milbemyctin, moxidectin, selamectin
<b>H1-antihistaminika</b>	fexofenadin, terfenadin
<b>H2-antihistaminika</b>	cimeditin, ranitidin
<b>Chemoterapeutika</b>	actinomycin, daunorubicin, docetaxel, doxorubicin, epirubicin, etoposid, irinotecan, mitomycin C, mitoxantron, paclitaxel, tamoxifen, temiposid, teniposid, topotecan, vinblastine, vincristine, vindesine
<b>Imunosupresiva</b>	antiemetika, cyklosporin A, domperidon, ondansetron, rapamycin, tacrolimus
<b>Steroidy</b>	aldosteron, cortizol, dexamethason, estradiol, hydrocortison, methylprednisolon
<b>Srdeční léky</b>	amoidaron, digitoxin, diltiazem, chinidin, losartan, quinidine, verapamil
<b>Opiáty</b>	loperamid, morfium
<b>Ostatní</b>	amitriptylin, fenytoin, ondasetron, phenothiazin, phenytoin,

Zdroj: Pechandová et al., 2006.

#### **2.3.1.4 Inhibitory P-glykoproteinu**

Léčiva, která mají schopnost inhibovat funkci Pgp, ovlivňují biologickou dostupnost a eliminaci substrátu se označují jako inhibitory P-glykoproteinu. Velké množství studií se zabývalo interakcí mezi P-glykoproteiny a jejich substráty. Výzkum se zaměřil na škodlivý i prospěšný efekt interakce (Hodges et al., 2011).

Nejvíce prostudovaná je role Pgp v onkologické léčbě. Za odolnost nádorových buněk v protinádorové terapii je odpovědná neúměrná exprese P-glykoproteinů v tumorových buňkách. Tuto rezistenci můžeme narušit použitím specifických inhibitorů Pgp, které obnoví citlivost tumorových buněk na cytostatika (Deferme and Augustijns, 2003).

První léčivo s prokázanými inhibičními schopnostmi byl verapamil. Jeho inhibiční aktivita byla však patrná až s podáním vyšších dávek, které jsou kardiotoxické. Vhodným inhibitorem Pgp je lék cyklosporin, který však nelze použít v onkologii, jelikož má imunosupresivní účinek. Klinicky nadějným inhibitorem Pgp se zdá lék PSC-833, jedná se o neimunosupresivní cyklosporin (Lehne, 2000).

### **2.4 Gen *MDR1***

Název genu *MDR1* je odvozen z anglického multi-drug resistance. Jedná se o gen kódující P-glykoprotein, který je zodpovědný za transport některých druhů léčiv z mozkomíšní tekutiny do krve, také hraje důležitou roli v obraně před vstupem xenobiotik do organismu. Neúměrná exprese tohoto genu může vést k rezistenci na podávanou terapii. P-glykoprotein se řadí do skupiny ABC transportních proteinů, konkrétně do podskupiny ABCB. Proto se mnohdy můžeme setkat s označením tohoto genu jako gen *ABCB1*. (Deshpande et al., 2016).

Gen *MDR1* je u psů lokalizován na 14 chromozomu a skládá se z 28 exonů. Mutace v genu *MDR1* způsobuje zvýšenou citlivost k některým druhům léků (Geyer et al., 2005a).

#### **2.4.1 Mutace v genu *MDR1* u ovčáckých psů**

Na počátku 80. let bylo zavedeno v léčbě psů nové antiparazitikum, ivermectin. U velkého množství psů plemene kolie působilo toto léčivo neurotoxicky. Neurotoxicita ivermectinu byla objasněna až v roce 2001, kdy Dr. Katrina Mealey z Washington State University (College of Veterinary medicine) identifikovala mutaci v genu *MDR1* (Mealey et al., 2001). Nejčastěji se popisovaná mutace v odborné literatuře označuje jako *MDR1*



nt230 (del4), ale často se také můžeme setkat s označením *mdr1-1A*, *ABCB1-1A* nebo s jinými variantami značení (Dowling, 2006).

Mutace *MDR1* nt230 (del4) se nachází ve 4. exonu, je způsobena delecí 4 bp v palindromické sekvenci GATAG (GATA nebo ATAG) v nukleotidové pozici 230. Tato delece způsobí posun čtecího rámce, což vede k předčasnému vytvoření stop kodonu a k ukončení syntézy P-glykoproteinu. Výsledný Pgp je zkrácený z 1281 aminokyselin na pouhých 91. Hematoencefalická bariéra v CNS se stává propustnou pro léčiva, která transportuje P-glykoprotein a mohou procházet do nervových tkání psa. Podáme-li zvířeti s homozygotně mutovaným *MDR1* genem ivermectin, můžeme u něj pozorovat pohybové poruchy, chvění, slinění, zvracení, slepotu, kóma, může dojít i k úhynu zvířete (Mealey et al., 2001).

Neočekávané, vedlejší, neurotoxické účinky nepozorujeme pouze po podání antiparazitika ivermectinu. V případě mutace *MDR1* nt230 (del4) můžeme tyto nepříjemné vedlejší účinky pozorovat i po podání jiných léků, které se používají při léčbě psů, například moxidectin, selamectin, acepromazin a dalších substrátů Pgp (Tabulka 1). Léků, které v případě mutace *MDR1* genu způsobují neurotoxické účinky, je mnoho, proto je důležité provádět u geneticky predisponovaných psů její detekci (Geyer et al., 2005b).

Kromě kolie je touto mutací ovlivněno mnoho dalších psích plemen. Primárně byla mutace v genu *MDR1* identifikována u pasterveckých plemen psů a jejich příbuzných. Mezi čistokrevná plemena, u kterých se detekuje popisovaná mutace patří kolie dlouhosrstá, kolie krátkosrstá, border kolie, sheltie, australský ovčák, anglický ovčák, bílý švýcarský ovčák, bobtail, dlouhosrstý vipet, německý ovčák a další (Gramer et al., 2011).

Jelikož byla primárně popisovaná mutace identifikována zejména u pasterveckých plemen psů, je velmi pravděpodobné, že postižení genu *MDR1* pochází z jedné rodové mutace, tedy z jednoho jediného psa. Pravděpodobně se jednalo o psa, který žil kolem roku 1800 ve Velké Británii. Mutace se pak následným křížením snadno rozšířila (Geyer a Janko, 2012).

V práci s názvem Breed distribution of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in dogs autoři vyšetřovali mutaci *MDR1* genu u devíti čistokrevných plemen. Do experimentu byly také zahrnuty vzorky DNA příbuzných i nepříbuzných kříženců. Celkem bylo v rámci této studie vyšetřeno 6544 vzorků DNA psů z Německa (Tabulka 2) (Gramer et al., 2011).

**Tabulka 2:** Výsledky vyšetření 6544 vzorků DNA psů.

Plemeno	Počet psů	Alelická frekvence (%) <i>MDRI</i> (-)	Genotyp (%)		
			<i>MDRI</i> (+/+)	<i>MDRI</i> (+/-)	<i>MDRI</i> (-/-)
Kolie <sup>A</sup>	2227	59	19	45	36
Dlouhosrstý vipet	20	45	25	60	15
Sheltie	960	30	49	43	8
Australský ovčák	1908	22	62	32	6
Mini Australský ovčák	72	24	54	43	3
Bílý švýcarský ovčák	274	14	75	23	2
Border kolie	527	1	98,7	0,9	0,4
Wäller	110	17	65	35	0
Bobtail	67	4	92	8	0
Příbuzní kříženci <sup>B</sup>	261	8	86	12	2
Neznámí kříženci <sup>C</sup>	118	2	97	3	0

Zdroj: Gramer et al., 2011.

A – Do této skupiny byly zahrnuty vzorky DNA plemen dlouhosrstá kolie, krátkosrstá kolie a americká kolie.

B – Do této skupiny byli zařazeni testovaní psi, u kterých bylo známo plemeno jednoho z rodičů (kolie nebo border kolie).

C – Do této skupiny byli zařazeni testovaní psi s neznámým původem obou rodičů.

Z tabulky 2 je patrné, že frekvence výskytu mutace se u jednotlivých plemen výrazně liší. Největší výskyt alespoň jedné mutované alely byl prokázán u kolíí (81 %) a dlouhosrstých vipetů (75 %). Frekvence výskytu u sheltií byla 51 %, u mini australských ovčáků 46 % a u australských ovčáků 38 %. U plemene border kolie se mutovaná alela vyskytla pouze vzácně (1,3 %). Zajímavé je, že u skupiny kříženců s jedním známým rodičovským plemenem byla zjištěna frekvence výskytu mutované alely pouze 14 % (Gramer et al., 2011).

Frekvence výskytu mutace se liší i v různých zemích světa. Výrazně se od sebe lišily výsledky výzkumů provedených v Austrálii a USA. Studie z USA ukázala, že 22,6 % testované populace kolíí je homozygotní pro normální alelu, 42 % populace tvořili heterozygotní jedinci a recesivních homozygotů bylo odhaleno 35,4 % (Mealey et al., 2002). Výsledky studie provedené v Austrálii jsou odlišné, dominantních homozygotů bylo v testované populaci kolíí 12 %, 64 % z testované populace tvořili heterozygotní jedinci a 24 % z populace představovali homozygotně recesivní jedinci. U plemene

australský ovčák byla frekvence mutované alely v USA 17 %, zatímco v Austrálii 69 %. Podobné výsledky byly hlášeny i u jiných plemen (Mealey et al., 2005).

#### 2.4.2 Model dědičnosti genu *MDR1*

Dědičnost genu *MDR1* (Tabulka 3) je autozomálně recesivní (Geyer et al., 2005a). Postižení jedinci jsou tedy recesivní homozygoti, heterozygoti jsou zdraví jedinci, ale je zde riziko přenosu recesivní alely potomkům, dominantní homozygoti jsou zdraví a nenesou žádné riziko přenosu postižené mutované alely na potomky.

Delece znamená “vypuštění“ části genové sekvence, proto se běžně v praxi delece označuje jako minus. Postižení jedinci jsou tedy označováni *-/-*, přenašeči *+/-* a zdraví jedinci se značí symboly *+/+* (Geyer et al., 2005a).

**Tabulka 3:** Kombinace křížení rodičů s různými genotypy.

♂ \ ♀	Zdravá (+/+)	Přenašečka (+/-)	Nemocná (-/-)
Zdravý (+/+)	100 % +/+	50 % +/+ 50 % +/-	100 % +/-
Přenašeč (+/-)	50 % +/+ 50 % +/-	25 % +/+ 50 % +/- 25 % -/-	50 % +/- 50 % -/-
Nemocný (-/-)	100 % +/-	50 % +/- 50 % -/-	100 % -/-

Zdroj: vlastní.

#### 2.5 Problémová léčiva pro psy s mutací v genu *MDR1*

Na základě mutace *MDR1* nt230 (del4) se syntetizuje neúplný a nefunkční transportér P-glykoprotein, což vede ke snížení eliminace léků, které jsou substráty tohoto transportéru, přes ledviny, játra a střevo. Navíc mohou tyto léky procházet hematoencefalickou bariérou a působit tak postiženým jedincům neurotoxické problémy (Geyer a Janko, 2012).

Psi s touto mutací se nemusí vyhýbat všem lékům, které jsou substráty P-glykoproteinu. Mnoho léků může být použito, jen se musí upravit jejich dávka. Na druhé straně je známo několik běžně používaných léků, které inhibují funkci P-glykoproteinu, a to i u zvířat bez mutace v genu *MDR1*. Dysfunkce P-glykoproteinu může být tedy geneticky zprostředkovaná nebo získaná. Aby nedošlo podáním léčiva k vyvolání nežádoucích

účinků, musí veterinář dobře zvážit všechny potenciální příčiny dysfunkce Pgp (Mealey, 2016).

Velké množství léčiv používaných ve veterinární medicíně jsou substráty P-glykoproteinu. Většina z nich je odvozena od makrocyclických laktonů, nejčastěji z avermektinu a milbemycinu (Mealey, 2008).

Avermektiny a milbemyciny jsou léčiva biosyntetického původu s antiparazitním a antinematodním účinkem. Ovlivňují funkčnost neurotransmiterů na nervových vláknech parazitů tím, že se naváží na neuronální chloridové kanály GABA. Pro savce jsou makrocyclické laktony téměř neškodné, protože jejich přestup z krve do mozku je bráněn hematoencefalickou bariérou (Ducháček and Lamka, 2014). Tato bariéra je však u psů s mutací *MDR1* nt230 (del4) narušena, makrocyclickým laktonům je umožněn přestup do mozku a tím mohou vznikat neurotoxické symptomy. Nicméně psy s touto mutací lze v nevyhnutelných případech makrocyclickými laktony ošetřit, pokud budou dodrženy následující faktory:

1. Dodržení doporučené terapeutické dávky (různé u různých léků).
2. Způsob aplikace léků (např. intravenózní aplikace ivermectinu psům *MDR1* (-/-) v dávce 1 mg/kg je bezpečné a nevyvolá žádné potíže, naproti tomu perorální aplikace stejné dávky je pro *MDR1* (-/-) psy vysoce toxická).
3. Genotyp postiženého psa (u některých heterozygotních jedinců *MDR1* (+/-) je pozorována mírná ataxie a neurotoxikóza, u homozygotních psů *MDR1* (-/-) je sledována závažná, život ohrožující intoxikace) (Geyer and Janko, 2012).

Do skupiny avermektinů se řadí léčiva abamectin, doramectin, eprinomectin, ivermectin a selamectin. Mezi milbemyciny patří moxidectin, milbemyctin a nemadectin (Ducháček a Lamka, 2014).

### **2.5.1 Ivermectin**

Ve veterinární medicíně se ivermectin používá jako širokospektrální antiparazitikum proti antropodům a nematodům zejména u skotu, koní, ovcí a prasat. Použití ivermectinu pro psy není v České republice schváleno. Nicméně i přes to se v ČR k léčbě kožních parazitárních infekcí u psů využívá léčivých přípravků obsahujících ivermectin. Tyto přípravky jsou však schválené pouze pro hospodářská zvířata, což je jednou z příčin otrav ivermectinem u psů, neboť tyto léky jsou určeny pouze k parenterální aplikaci. Přípravky

obsahující ivermectin určené specificky pro psy musí být podávány intravenózně, takové léky jsou však registrované pouze v USA (Buš, 2005).

U kolií s mutací v genu *MDR1* jsou patrné nežádoucí neurotoxické symptomy při mnohem nižších dávkách (50–100 µg/kg) než u jiných plemen psů s touto mutací (120–150 µg/kg). Naproti tomu u plemen, které popisovaná mutace nepostihuje, mohou být podávány několikanásobně větší dávky ivermectinu bez žádné následné známky toxikózy (např. psům plemene beagle byla podána dávka 2,5 mg/kg ivermectinu bez žádných následných neurotoxických poruch) (Geyer et al., 2005a).

### **2.5.2 Selamectin**

Stejně jako ivermectin patří selamectin do skupiny avermektinů. Ve veterinární medicíně se používá jako antiparazitikum proti antropodům. U psů se používá především k hubení ektoparazitů žijících v srsti a kůži zvířete, užívá se také k léčbě parazitóz vyvolaných endoparazity. Selamectin najdeme v přípravcích k hubení blech a ušních roztočů v minimální dávce 6 mg/kg. Na trhu se selamectin nevyskytuje v koncentrovanější formě, proto je u něj předávkování málo pravděpodobné. Mezi nejčastější klinické příznaky po vystavení vyšší dávce selamectinu patří slinění, zvracení a ataxie (Merola and Eubig, 2012).

Selamectin je k dostání jako lokální lék pro psy a kočky, běžně se vyskytuje jako účinná látka v antiparazitních obojcích.

### **2.5.3 Moxidectin**

Moxidectin se řadí do skupiny milbemycinů. Jako lék je dostupný ve více formách, včetně orální a injekční. Ve veterinární medicíně se moxidectin u malých zvířat používá jako přípravek k prevenci vůči srdečním červům. Stejně jako u ivermectinu jsou léčivé přípravky obsahující moxidectin určené pro aplikaci u hospodářských zvířat, zejména u skotu a koní, z toho důvodu jsou na trhu léky s vysokou koncentrací moxidectinu (5–20 mg/ml). Malá zvířata mohou být tím pádem vystavena vysokým dávkám z již malého množství produktu (Merola and Eubig, 2012).

K prevenci vůči srdečním červům se moxidectin psům aplikuje každý měsíc orálně v dávce 0,003 mg/kg. Při subkutánní aplikaci se používá lék s prodlouženým uvolňováním každých šest měsíců, v dávce 0,17 mg/kg (Geyer et al., 2005a).

Při perorální aplikaci v dávkách 1,9-2,8 mg/kg byly zaznamenány nežádoucí účinky i u psů bez mutace *MDR1* (+/+). U těchto jedinců se objevila ataxie, tachykardie, slepota, třes, hypertermie, kóma a respirační deprese (Merola and Eubig, 2012).

#### **2.5.4 Acepromazin**

Acepromazin se ve veterinární medicíně používá jako sedativum a analgetikum. Většinou se aplikuje orálně ve formě tablet s dávkou 0,05 mg/kg. Acepromazin je považován za relativně bezpečné sedativum, u kterého dochází k výskytu nežádoucích účinků pouze zřídka. Po aplikaci acepromazinu se může dočasně vyskytnout hypotermie a brachykardie (Deshpande et al., 2016).

Acepromazin můžeme najít jako účinnou látku v přípravku Sedalin (používá se ke zklidnění domácích zvířat).

### **2.6 Plemena postižená mutací genu *MDR1***

Delece v genu kódující membránový transportér P-glykoprotein se s velkou četností objevuje u ovčáckých plemen. Touto mutací jsou nejvíce postiženi zástupci plemene kolie (v některých populacích více než 70 %) a australský ovčák (přibližně 50 % jedinců). Příbuzná a smíšená plemena s původem kolie jsou ovlivněna v menší míře (Stiedl a Weber, 2017).

Pro tuto práci bylo pro detekci uvedené mutace vybráno pět plemen ovčáků. Jednalo se o plemena australský ovčák, border kolie, dlouhosrstá a krátkosrstá kolie. U těchto plemen se mutace v genu *MDR1* běžně vyšetřuje. Poslední zvolené plemeno představoval německý ovčák, zástupci tohoto plemene se na uvedenou mutaci běžně nevyšetřují, proto není přesně známé procentuální zastoupení postižených jedinců.

Mezi další plemena hojně postižená popisovanou mutací patří dlouhosrstý vipet (přibližně 65 % jedinců), McNab ovčák (~30 %), anglický ovčácký pes (~15 %), sheltie (~15 %), wäller (15 %), bobtail (~10 %) a kříženci těchto plemen (~5%) (Gramer et al., 2011).

#### **2.6.1 Australský ovčák**

Australský ovčák paradoxně nepochází z Austrálie, ale jedná se o plemeno původem Americké. Jméno dostal jako připomínku na baskické pastevce, kteří přišli se svými psy z Austrálie do Spojených států na konci 19. století. Jednalo se o typy kolií, které se křížily s domácími psy. Vzniklí kříženci se velmi vzhledově i povahou podobali australským ovčákům tak, jak je známe dnes (Räber, 1994).

Obliba australského ovčáka stoupala po druhé světové válce. Tito psi se účastnili rodea, závodů koní a stali se oblíbenými u kovbojů, kterým pomáhali při nahánění stád. Australský ovčák si díky svému temperamentu a inteligenci rychle vydobyl pozici na amerických farmách (Císařovský, 2008).

Plemeno je střední velikosti, svalnaté a pevné. Kohoutková výška psů se pohybuje v rozmezí 50 – 57 cm, výška fen je 45 – 52 cm. Ocas je rovný, může být od narození dlouhý nebo krátký, v zemích, kde je to povoleno se ocas australských ovčáků kupíruje. Srst je polodlouhá, rovná nebo mírně vlnitá. Vyskytuje se v několika typech zbarvení blue merle (Obrázek 3), red merle, čistě hnědý nebo černý také se mohou vyskytovat různé bílé a tříslivé odznaky. Oči mají australští ovčáci mandlovitého tvaru, zbarvení očí může být hnědé, ambrové nebo modré, vyskytují se i jedinci s kombinací uvedených barev (Verhoef-Verhallen, 2010a).

Australští ovčáci jsou velmi inteligentní a učenliví psi. Jedná se o ostražitě, bystré a velmi aktivní jedince s velkou výdrží. Jsou věrní, k neznámým lidem se chovají zdrženlivě, silně se fixují na svého pána a jeho rodinu. Výchova australských ovčáků není náročná, rychle a rádi se učí, potřebují však rozmanitost úkolů, jinak se z nich stávají otravní psi. Jedná se o mnohostranně nadané plemeno, jehož temperament lze využít v různých disciplínách psího sportu (Verhoef-verhallen, 2014).

**Obrázek 3:** Typický zástupce plemene australský ovčák, zbarvení blue merle.



Zdroj: Lanceau, 2007.

### 2.6.2 Border kolie

Plemeno border kolie má původ v takzvané Border Country, což je oblast mezi Anglií a Skotskem. Uvedené plemeno bylo vyšlechtěno z vícero psích ras s cílem využití ke střežení dobytka a nahánění ovcí. Kosterní pozůstatky dokazují, že border kolie existovala již v prehistorických dobách (Räber, 1994). I přes její vynikající pracovní schopnosti nebyla do 90. let 20. století mimo Velkou Británii příliš známá. Pak však obliba border kolie velmi rychle stoupla a dnes se řadí mezi velmi populární a žádaná plemena (Císařovský, 2008).

Jedná se o psy dobrých tělesných proporcí, délka trupu by měla přesahovat jejich kohoutkovou výšku. Výška psů by se měla pohybovat v rozmezí 53 – 55 cm, feny jsou o něco nižší. Srst je lesklá a rovná. Existují kolie s krátkou i s delší srstí, border kolie s delší srstí však výrazně převažují. Co se týká zbarvení srsti, tak přípustné jsou všechny barvy, nikdy však nesmí převažovat bílá. Nejběžnější barevnou kombinací je černá s bílou (Obrázek 4), často se také můžeme setkat se zbarveními blue merle a trikolorou. Barva očí je vždy hnědá (Verhoef-verhallen, 2014).

Stejně jako australští ovčáci jsou border kolie velmi inteligentní, učenlivé a poslušné. Vyžadují smysluplnou práci s možností vlastní iniciativy. Nemají-li dostatek práce, přidělí si úkol sami. Border kolie jsou velice oddané svému pánovi a jeho rodině. Mají neagresivní povahu a jsou velmi dobří společníci. Jejich temperament lze využít v nejrůznějších psích sportech, největší uplatnění nacházejí v zahánění ovcí, canicrossu a agility (Verhoef-Verhallen, 2010a).

**Obrázek 4:** Zástupce plemene border kolie s typickým černobílým zbarvením.



Zdroj: Verhoef-verhallen, 2014.



### 2.6.3 Dlouhosrstá a krátkosrstá kolie

Kolie se řadí mezi mimořádně starobylá plemena. Historie popisovaných psů je nedílně spojena s historií chovu ovcí na Britských ostrovech, který zde započal před více než čtyřmi tisíci lety. Chov ovcí prosperoval zejména ve Skotsku. Právě ze Skotska pochází předek dnešních kolií, který byl odtud převezen do Anglie, kde byly kolie dále šlechtěny až do podoby, ve které je známe dnes (Moore, 2001). Později také došlo k rozdělení kolií do dvou rázů, dlouhosrsté (Obrázek 5) a krátkosrsté (Obrázek 6). Uvedené rozdělení bylo ovlivněno pracovním využitím a prostředím. Dlouhosrstá kolie se uplatňovala na svazích u stád, kde ji její odolná srst ochraňovala v nevlídném počasí. Krátkosrstá kolie se využívala zejména při převádění ovcí na trhy (Císařovský, 2008).

Tělo kolií je silné, dokonale vyvážené, bez známek těžkopádnosti a hrubosti. Výška v kohoutku psů se pohybuje v rozmezí 56 – 61 cm, výška fen je 51 – 56 cm. Kolie se vyskytují ve třech barvách blue merle, trikolor a písková v kombinaci s bílou. Jejich srst je hrubá na dotek. Barva očí hnědá nebo modrá (Verhoef-verhallen, 2014).

Kolie jsou veselé, inteligentní, učenlivé a pracovitě. Jedná se o velmi citlivé psy, kteří velmi špatně snášejí hrubé zacházení. Silně se upínají na svého pána, často se chovají ochranně k mladším členům rodiny. K neznámým lidem mohou být zdrženlivé, ale nikdy se nechovají agresivně (Verhoef-Verhallen, 2010a).

**Obrázek 5:** Zástupce plemene dlouhosrstá kolie, trikolorní zbarvení.



Zdroj: Räber, 1994.

**Obrázek 6:** Typický zástupce plemene krátkosrstá kolie, pískové zbarvení.



Zdroj: Smrček and Smrčková, 2012.

#### **2.6.4 Německý ovčák**

Vysoce ceněná plemena pasteveckých psů vyšlechtěná ve Velké Británii a Nizozemsku vyvolala v německých šlechtitelích potřebu odchovat vlastní národní ovčácké plemeno. Nebyl to však jednoduchý úkol, neboť koncem 19. století existovalo v Německu mnoho různých typů pasteveckých psů, kteří nebyli vůbec uniformní. Lišili se nejenom zbarvením a kvalitou srsti, ale také stavbou těla a postavením uší (Verhoef-Verhallen, 2010b). Sjednání těchto odlišností a vyšlechtění národního ovčáckého plemena se stalo cílem kynologa Maxe von Stephanitze, který v roce 1899 stanovil plemenný standard. Plemenná kniha německého ovčáka byla založena o rok později (van Houten, 2004).

Německý ovčák je silné a svalnaté plemeno střední velikosti (Obrázek 7). Výška psů v kohoutku se pohybuje v rozmezí 60 – 65 cm, výška fen je 55 – 60 cm. Srst je hustá, pevná a pevně přiléhající. Němečtí ovčáci se vyskytují v několika barevných kombinacích. Mohou být jednobarevně černí nebo šedí, častější je kombinace barev černé s hnědými, červenohnědými nebo žlutými znaky. Bílá barva je nežádoucí. Čenich musí mít vždy černý. Oči mají němečtí ovčáci tmavé, středně velké, mandlovitého tvaru (Koudelová, 2010).

Německý ovčák je velmi učenlivý, inteligentní, poslušný, statečný a lehce ovladatelný, nikdy není přehnaně agresivní. Není divu, že právě pes s takovými vlastnostmi se stal nejvíce používaným pracovním psem na světě (Cunliffe, 2004). Své uplatnění našel nejen u policistů, vojáků a záchranářů, ale také jako hlídač a ochránce. Německý ovčák je také výborným slepeckým psem. Skvělých výsledků dosahuje také v různých psích sportech,

at' už jde o prokázání obratnosti, poslušnosti nebo výcvik. Německý ovčák je vždy připraven splnit úkol, je bezpodmínečně věrný svému pánovi a jeho rodině (Verhoef-Verhallen, 2010b).

**Obrázek 7:** Zástupce plemene německý ovčák.



Zdroj: van Houten, 2004.

## 2.7 Užití metody detekce mutace v genu *MDR1*

### 2.7.1 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Amplifikace nukleových kyselin je jedním z nejdůležitějších procesů v oblasti molekulární biologie. Kromě široce používané amplifikace pomocí metody PCR byly navrženy mnohé další techniky amplifikace. Všechny tyto metody jsou však laboratorně náročné nebo vyžadují sofistikovaný nástroj pro samotnou amplifikaci a detekci výsledků. Z toho důvodu se vědci snažili najít způsob překonání těchto omezení a do praxe byly postupně zaváděny mnohé izotermální amplifikační techniky. Jednou z těchto metod je právě i izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkami (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP) (Wong et al., 2018).

V porovnání s nejčastěji používanou technikou amplifikace PCR je LAMP rychlejší, citlivější a účinnější. Vyšší účinnost je přisuzována tomu, že není nutné volit složité teplotní podmínky. Díky metodě LAMP je možné amplifikovat DNA o velmi nízké koncentraci. Během méně než jedné hodiny můžeme z jedné molekuly DNA získat až  $10^9$  kopií, což vede ve srovnání s PCR k obrovské úspoře času (Nagamine et al., 2002). Vzhledem k vysoké citlivosti metody je LAMP používána zejména k detekci mikroorganismů (Mori a Notomi, 2009).

Popisovanou metodu vyvinul v roce 2000 tým japonských vědců (Notomi et al., 2000). O dva roky později byla metoda LAMP doplněna o smyčkové primery, které hybridizují s kmenovými smyčkami a zkrátí reakční dobu metody až na polovinu (Nagamine et al., 2002).

Reakční směs musí mimo primery a templátovou DNA obsahovat také polymerázu. U metody LAMP je nutné použít jiný druh polymerázy než při PCR. Využívá se termostabilních enzymů s dislokázovou aktivitou. Jedná se například o *Bsm* polymerázu izolovanou z bakterie *Bacillus smithii*, nebo *Bst* polymerázu z *Bacillus stearothermophilus*. Oba uvedené enzymy katalyzují syntézu vláken ve směru 5'-3', exonukleázovou aktivitu 5'-3' však nemají. Teplotní optimum pro polymerázu *Bsm* je 60 °C, spolehlivě však syntetizuje DNA do teploty 63 °C. Polymeráza *Bst* je enzymaticky aktivní do teploty 66 °C. Další komponenty reakčního mixu jsou pufr, nukleotidy a hořečnaté ionty. Do reakční směsi je také možné přidat betain na stabilizaci poměru AT a CG bází (Dhama et al., 2014).

Sada primerů na LAMP se skládá z minimálně čtyř primerů, konkrétně se jedná o dva vnitřní (přední: Forward inner primer, FIP a zadní: Backward inner primer, BIP) a dva vnější primery (přední: Forward outer primer, F3 a zadní: Backward outer primer, B3). Uvedené primery odpovídají šesti různým sekvencím cílového genu. Jedná se o oblasti F3c, F2c, F1c na 3' konci a B1, B2, B3 na 5' konci. Primer FIP je složen ze sekvencí F2 a F1c, které jsou komplementární k oblastem F2c a F1. Vnější přední primer F3 je komplementární k oblasti F3c. Zadní vnitřní primer BIP je složen ze sekvencí B2 a B1c, ty jsou komplementární k oblastem B2c a B1. Vnější zadní primer B3 je komplementární k oblasti B3c. Pro urychlení mohou být navíc do reakce přidány dva smyčkové primery, a to přední smyčkový primer (Forward loop primer, Loop F) a zadní smyčkový primer (Backward loop primer, Loop B). Primer Loop F je navržen s použitím komplementárního vlákna mezi oblastmi F1 a F2. Loop B primer je navržen mezi oblastmi B1 a B2. Všechny primery hrají v reakci klíčovou roli. Vnější primery F3, B3 mají roli během necyklického kroku v přesunu vláken. Vnější primery FIP, BIP mají sense i antisense sekvence tak, aby pomáhaly vytvářet smyčky. Smyčkové primery zrychlují amplifikační reakci vazbou na místa, která nejsou vnitřním primerům přístupná (Li et al., 2017).

Výhody metody loop-mediated isothermal amplification jsou vysoká citlivost a účinnost. Největší výhodou popisované metody je však její rychlost a možnost okamžité

diagnostiky. Další výhodou LAMP je nenáročné vybavení, na provedení reakce je potřeba pouze ohřívací blok, který bude poskytovat izotermní podmínky. Jednoduchost metody LAMP je mimo vybavení také ve způsobu analýzy výsledků, kdy je na rozdíl od amplifikace pomocí PCR možné přímé vyhodnocení produktů. LAMP lze také v kombinaci s reverzní transkripcí využít k detekci RNA. Vzhledem k nenáročnému vybavení a možnosti okamžité diagnostiky se metoda LAMP využívá k diagnostice patogenů v polních podmínkách (Wong et al., 2018).

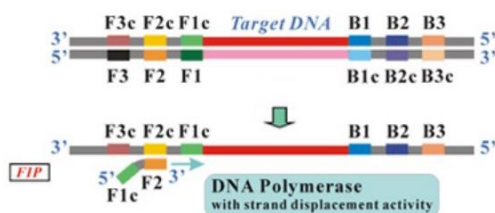
Navzdory robustnosti popisované metody má i technika LAMP svá omezení. Finální produkt metody LAMP je dlouhý řetězec DNA, proto nelze amplifikaci pomocí uvedené techniky využít například pro klonování. Další omezení metody jsou obtížné navržení a optimalizace reakce. Jednou z největších nevýhod metody LAMP je vysoké riziko kontaminace, která vede k falešně pozitivním výsledkům (Wong et al., 2018).

### 2.7.1.1 Princip LAMP

Metodu loop-mediated isothermal amplification lze rozdělit na dvě části, přípravu výchozího materiálu a cyklickou amplifikaci (Notomi et al., 2000).

Syntéza nového řetězce (Obrázek 9) je zahájena hybridizací vnitřního primeru FIP (oblastí F2) k místu F2c, místo F1c zůstává volné (Obrázek 8). Následně vnější primer F3 nasedá na oblast F3c (Obrázek 10) a začne se vytvářet nový, komplementární řetězec (Obrázek 11). Díky dislokázové aktivitě použité termostabilní DNA polymerázy je zahájena řetězová substituční reakce. Vlákno DNA vzniklé díky primeru FIP se oddělí (Obrázek 12) a místo F1c hybridizuje s místem F1, tím vznikne smyčka. Vzniklá smyčková struktura slouží jako šablona pro syntézu řetězce vyvolané hybridizací primeru BIP (oblastí B2) k oblasti B2c, místo B1c zůstává volné (Obrázek 13). Po nasednutí vnějšího primeru B3 na oblast B3c probíhá stejný proces jako v případě primerů FIP a F3 (Obrázek 14), a na druhém konci DNA vznikne další struktura kmenové smyčky (Obrázek 15). Vytvořená struktura již obsahuje všechna rozpoznávací místa a slouží jako výchozí materiál pro cyklickou amplifikaci (Fang et al., 2008).

**Obrázek 8:** Nasednutí vnitřního předního primeru FIP a termostabilní DNA polymerázy.



Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

**Obrázek 9:** DNA polymeráza syntetizuje komplementární řetězec DNA.



Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

**Obrázek 10:** Nasednutí vnějšího předního primeru F3.



Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

**Obrázek 11:** Vzniklé dvojvlákno, tvořené z templátu a nově syntetizované DNA.



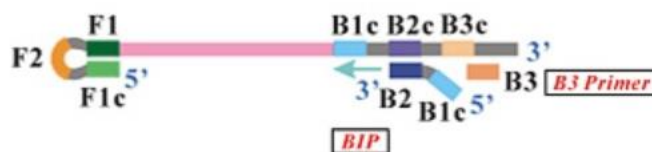
Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

**Obrázek 12:** Uvolněné vlákno DNA, které umožňuje vznik smyčky na 5' konci.



Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

**Obrázek 13:** Na 5' konci DNA se tvoří smyčka. DNA slouží jako templát pro syntézu iniciovanou BIP primerem z 3' konce a následné nasedání vnějšího primeru B3.



Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

**Obrázek 14:** Vzniklá dvouvláknová struktura DNA.



Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

**Obrázek 15:** Vzniklé smyčky na obou koncích vlákna DNA.



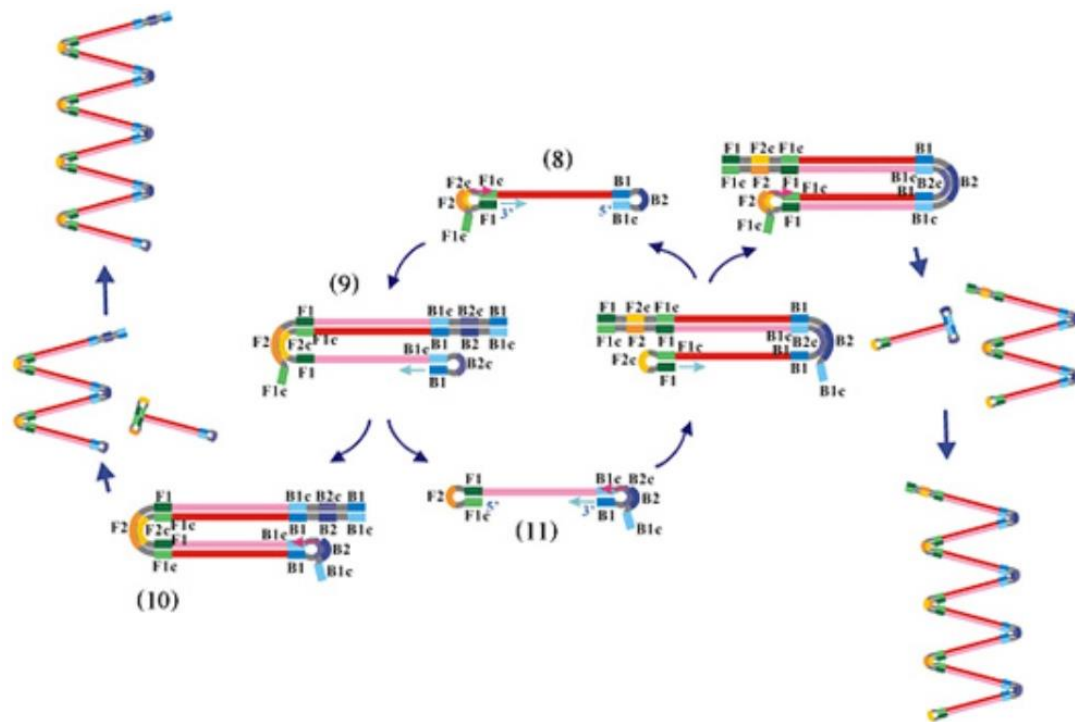
Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>



Ve druhé, cyklické fázi LAMP (Obrázek 16) nasedá vnitřní primer FIP na smyčku v oblasti F2c, tím se zahájí nová DNA syntéza, při které je původní vlákno vytlačeno novým. Vzniklý jednovláknový řetězec vytváří díky komplementárním oblastem B1c a B1 na 3' konci smyčkovou strukturu. Poté začíná od oblasti B1 na 3' konci syntéza DNA a uvolňuje se řetězec spojený s FIP. Uvolněná jednovláknová DNA tvoří díky komplementaritě oblastí F1 – F1c a B1c – B1 na obou koncích smyčky. Vnitřní primer BIP nasedá na oblast B2c a zahájí syntézu DNA, tím se uvolní oblast B1. Výsledkem popisovaného procesu jsou různé struktury skládající se ze střídavě opakovaných cílových sekvencí na stejném vlákně (Fang et al., 2008; Li et al., 2017).

**Obrázek 16:** Cyklická fáze LAMP.

(8) Vlákno DNA se smyčkami na obou koncích, (9) Syntéza DNA od oblasti B1 na 3' konci a současné uvolnění vlákna spojené s FIP, vzniklá struktura může „obtočit“ strukturu vytvořenou v kroku 8, čímž vzniká struktura (10), (11) Syntéza DNA od místa B1 na 3' konci a uvolnění vlákna.



Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

### 2.7.1.2 Vyhodnocení LAMP

Vzniklý amplifikovaný produkt lze detekovat více metodami. Prvotní posouzení je možné pouhým okem. Během reakce totiž dochází k zakalení obsahu zkumavky a podle intenzity vzniklého zákalu lze hodnotit výsledek. Obdobně je možné hodnotit amplifikaci i za

použití fluorescenčního značení a UV světla (Sahoo et al., 2016). Jako další end point variantu metody LAMP, u které se hodnotí výsledek pouhým okem po skončení reakce, můžeme uvést kolorimetrický LAMP (Obrázek 17), který využívá jako indikátor hydroxynaftol modř (Wong et al., 2018). Další jednoduchou možností vizualizace je využití gelové elektroforézy, které je sice levným způsobem detekce, ale nese s sebou velké riziko kontaminace. V průběhu reakce LAMP vzniká velké množství amplifikátu a při otevření reakčních zkumavek může dojít ke kontaminaci způsobené aerosolem v testovacím procesu. Nevýhodou použití gelové elektroforézy při vizualizaci amplifikovaných produktů je také fakt, že výsledný produkt nelze kvantifikovat (Zhou et al., 2014). Stejný problém nemožnosti kvantifikace výsledných produktů nacházíme také u dalšího způsobu detekce výsledku pomocí turbidimetrie. V průběhu LAMP vzniká sraženina magnesium pyrofosfátu, kterou lze po skončení reakce detekovat právě pomocí turbidimetru (Parida et al., 2008).

**Obrázek 17:** Kolorimetrický LAMP. Změna barvy na fialovou značí pozitivní reakci.



Zdroj: Wong et al., 2018.

K vizualizaci výsledků se také používají elektrochemické metody, které jsou rychlejší, jednodušší a mají nižší náklady. Elektrochemické metody využívají k vyhodnocení elektrochemické senzory nebo čipy (Zhang et al., 2014).

Nejpoužívanější metodou detekce produktů LAMP je monitorování amplifikace v reálném čase, které lze provést pomocí turbidimetru nebo spektrofotometrickou analýzou (Parida et al., 2008).

#### **2.7.1.2.1 Real-time LAMP**

Detekce produktů LAMP v reálném čase pomocí turbidimetru je založena na základě velkého množství vznikajícího vedlejšího produktu v průběhu reakce, sraženiny magnesium pyrofosfátu. Na základě toho, že pyrofosforečnan hořečnatý vzniká jako vedlejší produkt při syntéze DNA, můžeme určit pomocí turbidimetrického měření zákalu, vztah mezi množstvím amplifikované DNA a vzniklým zákalem. Křivka turbidity v reálném čase tedy představuje reakční křivku amplifikace LAMP. Turbidimetr je také možné využít pro analýzu kinetiky reakce LAMP. V porovnání s real-time LAMP



pomocí fluorescenčních sond je pomocí turbidimetru snazší získat stabilní základní hodnotu. Výhodou využití turbidimetrie je také fakt, že je možné kvantifikovat amplifikovanou DNA bez jakékoliv potřeby přídavku interkalačního činidla do reakce. Díky turbidimetrii v reálném čase lze kvantifikovat i stopové množství amplifikovaného produktu (Mori et al., 2004).

V případě real-time LAMP pomocí fluorescenčního zařízení se využívá interkalačních činidel, které se váží na dvouvláknovou strukturu, jakmile jsou syntetizovány produkty dsDNA, což způsobí změnu optického signálu. Použitím interkalačního činidla tedy získáme kvantitativní údaj o aktuální koncentraci DNA již po navázání činidla na strukturu DNA. Na základě rostoucí fluorescence v průběhu reakce lze přesně stanovit množství DNA v mikrozkušavce. Vzhledem k dostupnosti a rychlosti integrace s dsDNA se často jako interkalační činidlo používá SYBR Green. Jako monitorovací barvivo v reálném čase je také možné použít ethidium bromid, barvivo SYTO-82 nebo YO-PRO-1 jodid. Real-time monitorovací systémy založené na sondách, jako je například TaqMan, nejsou pro reakci LAMP použitelné. Detekce produktů reakce LAMP v reálném čase založené na fluorescenci je podstatně rychlejší než monitorování prováděné turbidimetricky. Dále je využití fluorescence ve srovnání s turbidimetrií více citlivé, protože je méně ovlivněna přítomností neprůhledných látek ve směsi, jako jsou plazmidy a bílkoviny (Zhang et al., 2014).

K realizaci real-time LAMP se využívají termocyklery, které se používají na real-time PCR nebo speciální přenosné přístroje, jako například Bioranger (Diagenetix, USA), ESEQuant TS2 (Qiagen, DE), Genie II a III (Optigene, UK) a další. Tyto přenosné platformy umožňují amplifikaci pomocí metody LAMP v terénních podmínkách a vizualizovat ji v reálném čase (Tomlinson, 2013).

### **2.7.1.3 Modifikace LAMP**

Metoda loop-mediated isothermal amplification prošla od svého vývoje v roce 2000 řadou pokroků a dnes jsou známy její různé modifikace. Kromě konvenční formy metody LAMP se také často používá RT-LAMP, který využívá enzymu reverzní transkriptázy, jímž je umožněn vznik komplementární DNA z RNA a tím pádem můžeme využít metodu LAMP i k detekci RNA. Další hojně využívanou modifikací je multiplex LAMP, díky němuž je pomocí fluorescenčního značení umožněna detekce více cílových genů najednou. Jako další modifikace můžeme uvést in-disc LAMP nebo elektrický LAMP (Wong et al., 2018).

### 2.7.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce, z anglického Polymerase Chain Reaction (PCR) je rychlou a jednoduchou metodou exponenciálního zmnožení vybrané sekvence DNA (Snustad et al., 2017).

Technika polymerázové řetězové reakce byla poprvé popsána v roce 1983 Kary B. Mullisem, do praxe byla zavedena o dva roky později. Její zavedení do praxe mělo pro obor molekulární biologie obrovský přínos srovnatelný například se zavedením sekvenování DNA (Šmarda et al., 2005).

Reakce PCR je založena na principu replikace nukleových kyselin *in vitro*. Podstatou polymerázové řetězové reakce je amplifikace studovaného úseku analyzovaného genu pomocí enzymu replikázy, DNA polymerázy. K amplifikaci můžeme vybrat jakýkoliv úsek DNA, pokud známe jeho okrajové sekvence. PCR proběhne pouze tehdy, pokud dva krátké oligonukleotidové primery hybridizují s okrajovými sekvencemi zkoumaného úseku DNA (Brown, 2007). Uvedené oligonukleotidové primery se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují k sobě. Od těchto primerů je po přidání DNA polymerázy a nukleotidů zahájena syntéza nových vláken na obou řetězcích (Šmarda et al., 2005).

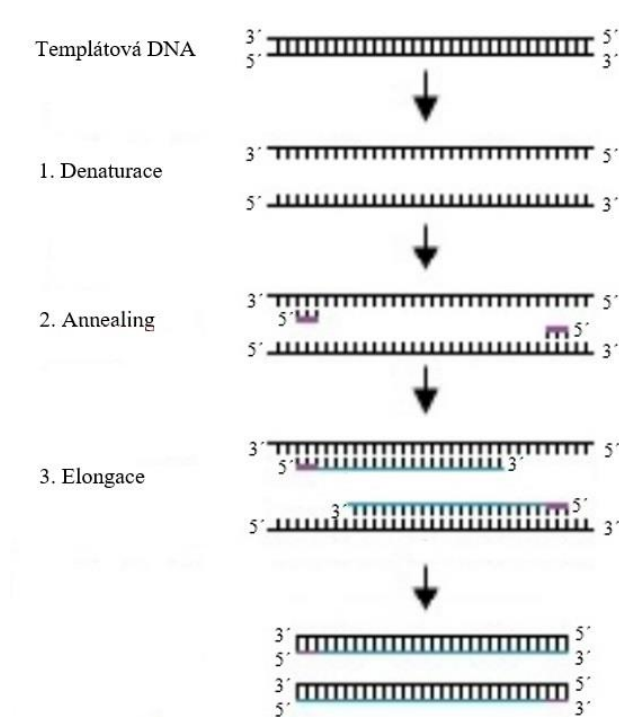
PCR reakční směs se skládá z minimálně jednoho páru ohraničujících oligonukleotidových primerů o velikosti kolem 20 bazí, komplementárním k sekvencím cílového úseku. Dále musí reakční směs obsahovat cílovou DNA, která slouží jako templát. Nezbytná je termostabilní DNA polymeráza a směs čtyř deoxyribonukleotidů. Všechny tyto komponenty jsou smíchány s vhodným reakčním puforem udržujícím stabilní pH po celou dobu reakce (Ruml et al., 2002).

Zpočátku plnila funkci replikázy DNA polymeráza I izolovaná z bakterie *E. coli*. Tento enzym se však během denaturace inaktivuje teplotou, z toho důvodu musel být pokaždé po denuraci přidán do reakce nový enzym (Snustad et al., 2017). K rapidnímu zvýšení využívání metody PCR došlo v polovině 80. let, k čemuž nejvíce přispěl objev termostabilní DNA polymerázy, která byla izolována z bakteriálního kmene *Thermus aquaticus* (*Taq*). Tento kmen bakterií byl objeven v gejzírech Yellowstonekého národního parku. Uvedená polymeráza, nazvaná *Taq* DNA polymeráza I je termostabilní, a tudíž zůstává během denaturačního kroku PCR aktivní (Beránek, 2016).

Polymerázová řetězová reakce je metoda, při které se pravidelně střídají tři kroky. Během těchto kroků probíhají tři odlišné děje s rozdílnými teplotními nároky. Díky termostabilní polymeráze je možná opakovaná syntéza DNA ve formě cyklů (Šmarda et al., 2005). PCR je zahájena denaturací DNA na jednořetězcové úseky. Denaturace probíhá při teplotě okolo 94 °C. V následujícím kroku se teplota snižuje na 55 – 65 °C, kdy dochází k vazbě oligonukleotidových primerů ke komplementárním úsekům jednořetězcové DNA, tzv. annealing. Teplota nasedání primerů je velmi individuální, je závislá na složení a množství použitých bazí. Po annealingu se teplota zvyšuje na 72 °C, tento krok se označuje jako elongace, při které dochází prostřednictvím DNA polymerázy k syntéze nových řetězců DNA. Denaturace, annealing a elongace se cyklicky opakují (Obrázek 18). Počet cyklů se pohybuje v rozmezí 25 – 35 (Hue-Roye a Vege, 2008).

Reakce se provádí v přístroji zvaném termocykler, který je schopen rychlých a přesných změn teplot. Cyklickým opakováním jednotlivých teplot se exponenciálně vytváří až miliarda kopií cílového úseku DNA (Rumlová et al., 2003).

**Obrázek 18:** Průběh polymerázové řetězové reakce.



Zdroj: vlastní.

Analýza výsledných PCR produktů probíhá ve velkém procentu případů pomocí elektroforézy. Principem elektroforetické separace je pohyb záporně nabitých fosfátových skupin nukleových kyselin v elektrickém poli ke kladně nabitě elektrodě.

Rychlost pohybu molekul závisí na jejich velikosti, kterou lze stanovit porovnáním s molekulárním standardem (Lee et al., 2012).

### **2.7.3 PCR-RFLP**

Jednou z velmi často používaných modifikací PCR je standartní PCR v kombinaci s restričním štěpením amplifikačních produktů. Zkratka RFLP pochází z anglického označení metody Restriction Fragment Length Polymorphism, do češtiny se tento název překládá jako polymorfismus délky restričních fragmentů. Díky metodě RFLP je možné na základě přítomnosti či absence specifického restričního místa identifikovat mutované alely (Snustad et al., 2017).

Metoda PCR-RFLP se dělí na dva hlavní kroky, klasickou PCR a následné restriční štěpení. Nejprve se pomocí PCR s použitím specifických oligonukleotidových primerů amplifikuje studovaná oblast daného genu. Výsledné PCR produkty se detekují elektroforeticky. Následně jsou amplifikované produkty štěpeny zvolenou endonukleázou (Šmarda et al., 2005). Restriktázy či restriční endonukleázy jsou enzymy izolované z bakterií, kterým slouží jako ochrana před nežádoucími viry. Tyto enzymy štěpí DNA na specifických místech, jejich působením pak vznikají z amplikonu fragmenty rozdílné délky, které je možné analyzovat elektroforézou. Součet délek vzniklých fragmentů by měl být shodný s délkou původního PCR produktu (Beránek, 2016).

Výhodami metody PCR-RFLP jsou možnost přesného určení místa mutace, nenáročný provedení a snadná interpretace výsledků. Další výhodou je poměrně vysoká citlivost, v úvodu reakce postačuje poměrně malé množství DNA. Nevýhodou popisované metody je, že rozpoznávací místo restričních endonukleáz musí být ve většině případů palindromickou sekvencí (Knoll and Vykoukalová, 2002).

Metoda PCR-RFLP se používá nejenom pro přímou analýzu mutací podmiňujících onemocnění, ale také pro nepřímou vazebnou analýzu, která slouží k popisu segregace patologické alely mezi generacemi (Beránek, 2016).

Polymorfismus délky restričních fragmentů se ukázal jako nenahraditelný při konstrukci genetických map (Snustad et al., 2017).

### **3 Cíle práce a hypotézy**

#### **3.1 Cíle práce**

1. Screening vzorků DNA ovčáckých psů na přítomnost mutace v genu *MDR1* metodami LAMP a PCR-RFLP.
2. Optimalizace metod loop-mediated isothermal amplification a restriční analýzy pro detekci mutace genu *MDR1* u ovčáckých psů.
3. Srovnání použitých vyšetřovacích metod.
4. Zpracování literárního přehledu dosavadních poznatků o mutaci genu *MDR1* u ovčáckých psů.

#### **3.2 Hypotézy**

1. Předpokládám, že výhodou metody LAMP bude v porovnání s metodou PCR-RFLP rychlost získání výsledků.
2. Předpokládám, že metodou loop-mediated isothermal amplification půjde výsledný genotyp určit lépe než restriční analýzou.
3. Předpokládám, že výsledky obou metod budou ve většině případů shodné.

## 4 Materiál a metody

Výchozí biologický materiál představovaly vzorky získané stěrem buněk z bukální sliznice ovčáckých psů. Stěry byly odebírány od pěti plemen, konkrétně se jednalo o zástupce plemen australský ovčák, border kolie, dlouhosrstá kolie, krátkosrstá kolie a německý ovčák. Ve všech případech se jednalo o feny a psy s průkazem původu. Vzorky byly postupně sbírány v období od 13. 4. 2019 do 20. 11. 2019. Do analýzy bylo celkem zahrnuto 140 ovčáků, jednalo se o 82 fen a 58 psů (Tabulka 4).

Vzorky krátkosrstých a dlouhosrstých kolií byly odebrány v rámci klubové výstavy kolií a sheltí v Humpolci dne 1. 6. 2019. Vzorky border kolií pro tuto práci poskytla Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D. Zbylých 73 vzorků německých a australských ovčáků bylo odebráno v různých chovatelských stanicích v Jihočeském kraji a v kraji Vysočina.

Stěry byly odebrány sterilními odběrovými tampony FLOQSwabs od firmy COPAN. Každému psu byly odebrány dva stěry, každý z jiné strany mordy. Aby nedošlo ke kontaminaci vzorku potravou, bylo nutné, aby byl pes minimálně půl hodiny před odběrem bez stravy. Při odběru byl pro každého psa vyplněn informační dotazník a po vyhodnocení dostal majitel výstupní zprávu s výsledky.

**Tabulka 4:** Zastoupení jednotlivých plemen.

Plemeno	Počet vzorků	Pes	Fena
Australský ovčák	20	5	15
Border kolie	31	15	16
Dlouhosrstá kolie	24	12	12
Krátkosrstá kolie	12	6	6
Německý ovčák	53	20	33
Celkem	140	58	82

### 4.1 Extrakce DNA

Extrakce DNA bývá u většiny molekulárně biologických metod nezbytným prvním krokem analýzy. Při tomto procesu dochází k separaci DNA od ostatních buněčných složek. Jsou známy různé metody extrakce nukleových kyselin, které jsou založeny na odlišných principech (Šmarda et al., 2005). Pro extrakci genomové DNA byl v rámci této diplomové práce využit komerčně dodávaný kit Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit od firmy Geneaid. Uvedený kit využívá schopnosti DNA vázat se v přítomnosti chaotropních solí na povrch kolonky. Nečistoty jsou odstraněny v promývacích krocích a čistá DNA je v posledním kroku eluována elučním puforem do nové zkumavky (příbalová informace k soupravě *Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit*, 2017).

### Pracovní postup:

1. Do 1,5 ml mikrozkušavky napipetovat 500  $\mu$ l S1 Bufferu a 20  $\mu$ l proteinázy K.
2. Přidat tampon se vzorkem a krouživými pohyby uvolnit stěr do Bufferu.
3. 10 minut směs inkubovat při teplotě 60 °C.
4. Tampon přenést pinzetou do Filter Column, centrifugovat 2 min při 14000  $\times$  g.
5. Eluát přidat k inkubovanému vzorku.
6. Přidat 500  $\mu$ l S2 Bufferu a 1  $\mu$ l Carrier RNA, vortexovat a stočit.
7. 10 minut směs inkubovat při teplotě 60 °C.
8. Přidat 500  $\mu$ l ethanolu a směs zvortexovat.
9. Do nové kolonky napipetovat 750  $\mu$ l vzorku, centrifugovat 1 min při 14000  $\times$  g.
10. Vylít eluát, do kolonky napipetovat zbytek vzorku, centrifugovat 1 min.
11. Spodní, sběrnou mikrozkušavku vyhodit a přendat kolonku do nové.
12. Přidat 400  $\mu$ l W1 Bufferu, centrifugovat 30 sekund při 14000  $\times$  g, vylít eluát.
13. Přidat 600  $\mu$ l Wash Bufferu, centrifugovat 30 sekund při 14000  $\times$  g.
14. Vylít eluát a centrifugovat 3 min na max.
15. Kolonku s navázanou DNA dát do nové 1,5 ml mikrozkušavky označené štítkem.
16. Přidat 70  $\mu$ l Elution Bufferu, inkubovat 3 min při pokojové teplotě.
17. Centrifugovat 1 min na max.
18. Pro dlouhodobé uskladnění je třeba izolovanou DNA uchovat při -20 °C (příbalová informace k soupravě *Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit*, 2017).

Po extrakci bylo provedeno stanovení kvantity a kvality DNA pomocí přístroje UV/VIS Shimadzu BioSpec-nano. Tímto přístrojem byla měřena koncentrace DNA a poměr absorbancí 260/280 a 260/230, tyto poměry udávají čistotu izolované DNA. Uvedený přístroj pracuje na principu spektrofotometrie a může být využit pro kvantifikaci DNA, RNA i proteinů. Výhodou popisovaného přístroje je měření malých objemů (od 1  $\mu$ l), rychlá a jednoduchá kvantifikace.

Kvalita DNA byla také hodnocena na 1% agarózovém gelu (1,2 g agarózy + 120 ml 1 $\times$  TBE pufru), do kterého bylo přidáno interkalační činidlo ethidium bromid. Ethidium bromid navázaný na DNA emituje pod UV zářením světlo. Elektroforéza probíhala v prostředí 1 $\times$  TBE pufru po dobu 30 minut při napětí 6 V/cm. Výsledek byl vyhodnocen za pomoci transiluminátoru (Syngene, UK) s UV světlem o vlnové délce 312 nm, snímacího kamerového systému a programu GeneSys (New England BioGroup™, USA).

## 4.2 LAMP

Pro vyšetření mutace genu *MDRI* u ovčáckých psů byly v této práci využity dvě metody. Jednou z nich byla právě metoda loop-mediated isothermal amplification.

Metoda LAMP byla provedena na přístroji QuantStudio™ 6 Flex Real – Time PCR System (Applied Biosystems™ – Life Technologies). Data byla analyzována pomocí příslušného programu QuantStudio™ Real-Time PCR System v1.3 (Applied Biosystems™ – Life Technologies).

**Tabulka 5:** Sekvence použitých primerů, metoda LAMP.

Primer	Sekvence (5'→3')
F3	CGC TAT TCA AAT TGG CTT GA
B3	CTG AAA CTT CCT GGG GAT CT
FIP_wt	TaT GTC ATG TTT CCA AAA ACC AGC ATT GTA TAT GTT GGT GGG GAC
FIP_mut	GCc GTC ATG TTT CCA AAA AGT AGC TTG TAT ATG TTG GTG GGG AC
BIP	ATC CAC ACT GGA AGG TCT TGG TCT GAA TTC ACA GAA CTC TGC
Loop F	TTC TGG GGG AAA AGG GAG
Loop B	GGC TAA ACA TCC TTC TAA GTA ACA

(Stiedl and Weber, 2017, syntetizováno firmou Macrogen, KOR)

Použité vnější primery F3, B3 byly naředěny na finální koncentraci 0,2 µM. Smyčkové primery Loop F a Loop B byly naředěny na 0,4 µM. Vnitřní primery FIP\_wt, FIP\_mut a BIP byly naředěny na koncentraci 1,6 µM. Všechny vzorky vyšetřené metodou LAMP pro účely screeningu byly testovány ve dvou opakování a všechny pokusy obsahovaly negativní kontroly.

Pro každý vzorek byly připraveny 2 reakční mixy s finálním objemem 25 µl (jeden pro alelu wild type, druhý pro mutovanou alelu), které se skládaly z:

- 15 µl Master mixu: Isothermal Master Mix (Optigene, UK)
- 3,2 µl PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, CZ)
- 0,4 µl primeru BIP, pracovní koncentrace 100 pmol/µl
- 0,4 µl primeru FIP\_wt pro zdravou alelu / pro mutovanou alelu 0,4 µl primeru FIP\_mut, pracovní koncentrace 100 pmol/µl
- 0,5 µl primeru F3, pracovní koncentrace 10 pmol/µl
- 0,5 µl primeru B3, pracovní koncentrace 10 pmol/µl
- 1 µl primeru Loop F, pracovní koncentrace 10 pmol/µl



- 1  $\mu\text{l}$  primeru Loop B, pracovní koncentrace 10 pmol/ $\mu\text{l}$
- 3  $\mu\text{l}$  templátové DNA, naředěné na koncentraci 10 ng/ $\mu\text{l}$

Připravené reakční směsi byly po centrifugaci vloženy do real-time termocykleru, kde byl spuštěn příslušný program. Vzorčky byly inkubovány po dobu 70 minut při teplotě 64 °C se záznamem fluorescence každých 60 sekund. Následoval denaturační krok se zvýšením teploty na 98 °C po dobu dvou minut.

### 4.3 PCR

Pomocí polymerázové řetězové reakce byla ověřena specificita primerů FIP\_wt, FIP\_mut, BIP a B3. Byly namíchaný 4 PCR reakce, které měly stejné složení, lišily se pouze v kombinaci použitých primerů. Jednalo se o kombinace FIP\_wt + BIP, FIP\_mut + BIP, FIP\_wt + B3 a FIP\_mut + B3. Reakční směs s finálním objemem 25  $\mu\text{l}$  byla namíchána z 9,5  $\mu\text{l}$  PCR H<sub>2</sub>O, 12,5  $\mu\text{l}$  PPP Master Mixu (Top-Bio, CZ), 1  $\mu\text{l}$  FIP\_wt nebo FIP\_mut primeru (pracovní koncentrace 100 pmol/ $\mu\text{l}$ ) a 1  $\mu\text{l}$  BIP primeru (pracovní koncentrace 100 pmol/ $\mu\text{l}$ ) nebo B3 primeru (pracovní koncentrace 10 pmol/ $\mu\text{l}$ ). Do této směsi byl přidán 1  $\mu\text{l}$  DNA o koncentraci 10 ng/ $\mu\text{l}$ .

Pro každou tuto PCR reakční směs byly namíchaný čtyři reakce, tři obsahovaly vzorek DNA se známým genotypem (recesivní homozygot, heterozygot a dominantní homozygot), čtvrtá reakce neobsahovala templátovou DNA a sloužila jako negativní kontrola. Takto namíchané reakční směsi byly vloženy do termocykleru (Biometra T3000), ve kterém byl nastaven příslušný program (Tabulka 6).

**Tabulka 6:** PCR reakční protokol.

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	1 min	1 cyklus
Denaturace	94 °C	15 s	30 cyklů
Annealing	58 °C	15 s	
Elongace	72 °C	1 min	
Terminální extenze	72 °C	7 min	1 cyklus
Chlazení	4 °C	$\infty$	1 cyklus

Produkty PCR reakce byly separovány na 2% agarózovém gelu (2,4 g agarózy + 120 ml 1 $\times$  TBE pufru), do kterého byly kvůli vizualizaci přidány 4  $\mu\text{l}$  ethidium bromidu. Elektroforéza probíhala po dobu 40 minut při napětí 5 V/cm. Jako standard byl použit

100 bp DNA ladder (New England Biolabs, UK). Agarózový gel byl vizualizován pomocí UV světla, snímacího kamerového systému a programu GeneSys.

#### 4.4 PCR-RFLP

Druhou zvolenou metodou pro detekci mutace v genu *MDR1* bylo využití principů polymerázové řetězcové reakce a polymorfismu délky restričních fragmentů. Tato metoda se skládá ze dvou hlavních kroků. Nejprve se pomocí reakce PCR s využitím dvou specifických oligonukleotidových primerů amplifikuje vyšetřovaná oblast zkoumaného genu. V následujícím kroku se k amplifikovanému PCR produktu přidá restriční enzym, který štěpí DNA ve specifickém místě. Výsledek štěpení se pak odečítá na agarózovém gelu.

##### 1. Amplifikace

Pro každý vzorek byl připraven PCR reakční mix s finálním objemem 25  $\mu$ l, který se skládal z:

- 12,5  $\mu$ l PPP Master Mixu (Top-Bio, CZ)
- 10,5  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, CZ)
- 0,5  $\mu$ l primeru F, pracovní koncentrace 10 pmol/ $\mu$ l, sekvence použitého primeru je uvedena v tabulce 7 (Tabulka 7)
- 0,5  $\mu$ l primeru R, pracovní koncentrace 10 pmol/ $\mu$ l, sekvence použitého primeru je uvedena v tabulce 7 (Tabulka 7)
- 1  $\mu$ l templátové DNA, naředěné na koncentraci 10 ng/ $\mu$ l

**Tabulka 7:** Sekvence použitých primerů, metoda PCR-RFLP.

Primer	Sekvence (5'→3')
Primer F	GCA GTG GGG TGA GAA CTA GA
Primer R	CGC AAG CCA TGT AAG GTA TG

(Mizukami et al., 2013, syntetizováno firmou Macrogen, KOR).

Amplifikace DNA probíhala v konvenčním termocykleru Biometra T3000. V uvedeném termocykleru byla nejprve provedena optimalizace PCR reakce (Tabulka 8).

**Tabulka 8:** PCR reakční protokol.

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	10 min	1 cyklus
Denaturace	95 °C	30 s	40 cyklů
Annealing	57 °C	30 s	
Elongace	72 °C	30 s	
Terminální extenze	72 °C	7 min	1 cyklus
Chlazení	4 °C	∞	1 cyklus

Produkty PCR reakce byly vizualizovány na 2% agarózovém gelu v 1× TBE pufru. Do gelu byly přidány 4 µl ethidium bromidu. Elektroforéza probíhala půl hodiny při napětí 5 V/cm. Jako molekulární standard byl použit 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, UK). Výsledek byl vyhodnocen pomocí UV prosvěcovací lampy, dokumentačního zařízení InGenius3 (Syngene, UK) a příslušného programu GeneSys.

## **2. Restrikční štěpení PCR produktů**

Pro detekci mutace genu *MDR1* u ovčáckých psů se používá restrikční enzym izolovaný z bakterie *Moraxella bovis*, označovaný jako *MboI*. Tento enzym štěpí amplifikační produkty na specifické fragmenty v sekvenci 5'... ^GATC ... 3' nebo na druhém vlákně DNA v sekvenci 3'... CTAG^ ... 5'. Sekvenci GAGC neštěpí (Mizukami et al., 2013).

Pro každý vzorek byla připravena směs na restrikční štěpení, která se skládala z:

- 2 µl reakčního pufru CutSmart® buffer (New England Biolabs, UK)
- 2,5 µl PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, CZ)
- 0,5 µl enzymu *MboI* (New England Biolabs, UK)
- 15 µl PCR produktu

Vzniklá směs byla inkubována při 37 °C po dobu 6 hodin.

Výsledek restrikčního štěpení byl vizualizován pomocí gelové elektroforézy na 2% agarózovém gelu, do kterého byly přidány 4 µl ethidium bromidu. Elektroforéza probíhala v prostředí 1× TBE pufru po dobu 75 minut při 5 V/cm. Jako standard byl použit 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, UK). Výsledek byl zobrazen pomocí UV transluminátoru, snímacího kamerového systému a příslušného PC softwaru.

### 3. Vyhodnocení

Amplifikační produkt má pro použitý restriční enzym *MboI* dvě štěpná místa. Jedno z nich (fragment o velikosti 103 bp) je přítomné u všech genotypů a s hledanou cílovou sekvencí nemá žádnou spojitost. Druhé štěpné místo je místo sledované mutace. Právě v tomto místě dochází ke štěpení na fragmenty specifických velikostí. Podle velikosti těchto fragmentů můžeme určit výsledný genotyp vyšetřovaného vzorku.

Na agarózovém gelu můžeme pozorovat 3 možné výsledky štěpení:

- Dva fragmenty o velikosti 313 bp a 103 bp. Jedná se o genotyp G/G. Takový výsledek budeme pozorovat u recesivních homozygotů, tzn. nemocných jedinců. V praxi se tento výsledek označuje jako -/-.
- U zdravých jedinců, dominantních homozygotů, budeme na gelu pozorovat tři fragmenty o velikostech 191 bp, 122 bp a 103 bp. Výsledný genotyp T/T, označení +/+.
- V posledním případě docházelo ke štěpení na čtyři fragmenty o velikostech 313 bp, 191 bp, 122 bp a 103 bp. Takový výsledek je typický pro heterozygotní jedince, tzv. přenašeče. Výsledný genotyp je tedy T/G. V praxi se setkáváme s označením takových jedinců jako +/-.

## 5 Výsledky

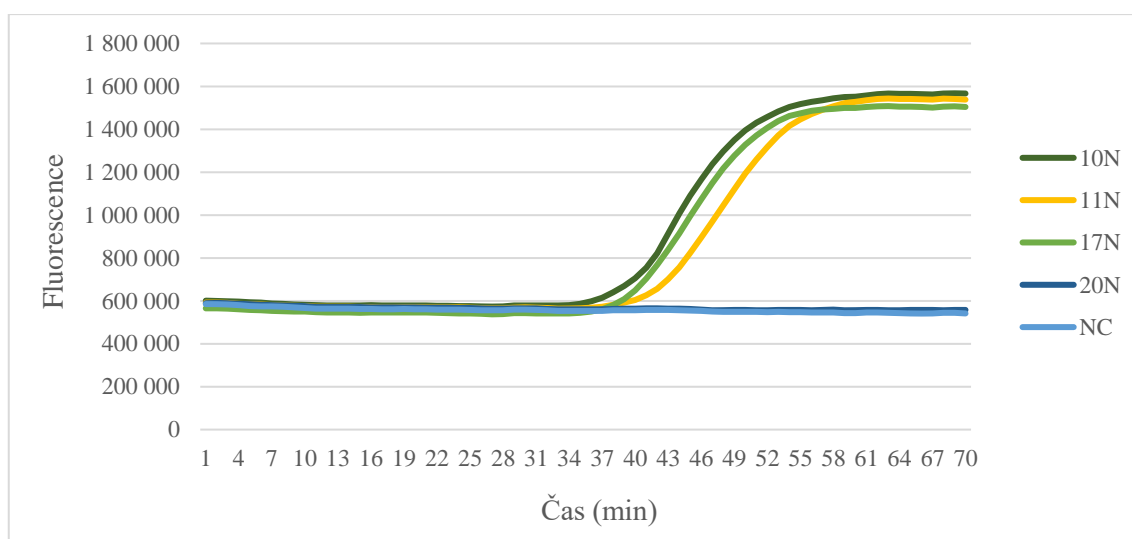
Jak již bylo uvedeno, vyšetřovaný soubor tvořilo 140 vzorků DNA ovčáckých psů. U některých z testovaných plemen je u zvířat s průkazem původu vyšetření mutace genu *MDR1* doporučeno. Z toho důvodu byl u několika testovaných zvířat znám výsledek vyšetření popisované mutace z akreditované laboratoře, což nám usnadnilo optimalizaci použitých metod.

### 5.1 LAMP

Před samotným screeningem vzorků metodou loop-mediated isothermal amplification bylo zapotřebí metodu optimalizovat, k čemuž byly využity vzorky se známým genotypem. Pro detekci mutované a wild type alely musely být použity odlišné sekvence primerů (jednalo se o odlišnost pouze v jednom primeru, konkrétně se jednalo o vnitřní přední primer FIP – pro alelu wild type byl použit primer FIP\_wt a pro mutovanou FIP\_mut primer, ostatní užití primery byly v reakčních směsích shodné). Z toho důvodu musely být pro každý vzorek připraveny dvě reakční směsi a metoda LAMP musela být optimalizována pro obě alely zvlášť (Obrázek 19, 20 a 21).

Připravené reakční mixy byly inkubovány v real-time termocykleru po dobu 70 minut při teplotě 64 °C se záznamem fluorescence každých 60 sekund.

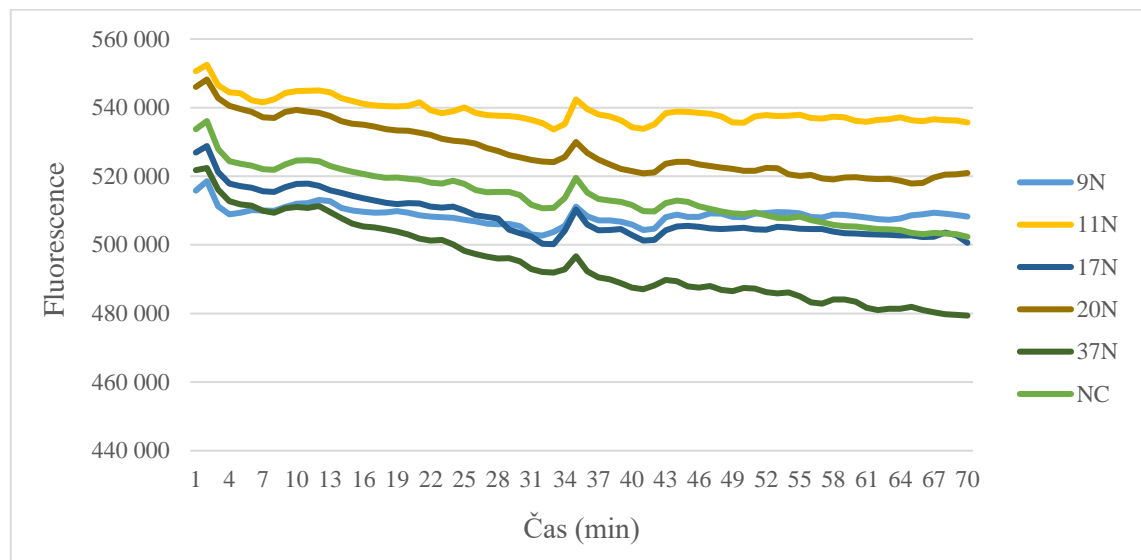
**Obrázek 19:** Výsledek optimalizace metody LAMP na vyšetření mutace genu *MDR1* pro alelu wild type. Pro optimalizaci byly použity vzorky se známým genotypem, 10N +/+, 11N +/-, 17N +/+ a 20N -/-. NC – negativní kontrola.



Na obrázku 19 je viditelný nárůst fluorescence u vzorků 10N, 11N a 17N, což znamená, že tyto vzorky mají minimálně jednu alelu zdravou, bez mutace. Počátek nárůstu

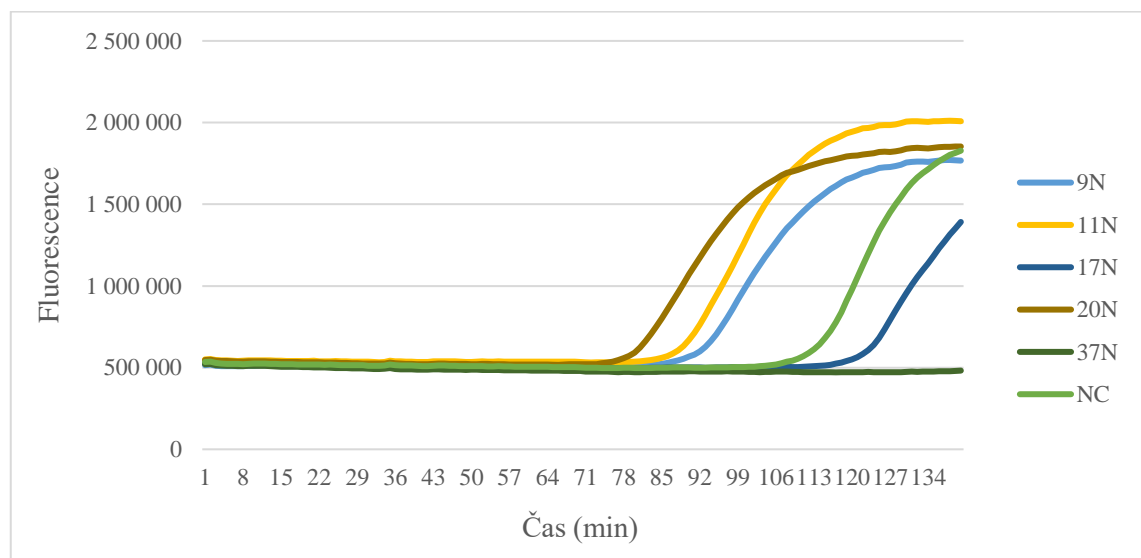
fluorescence je u uvedených vzorků patrný v časovém rozmezí 30 – 40 minut. U vzorku 20N není viditelná žádná amplifikace, jedná se o vzorek s mutací na obou alelách, jde tedy o nemocného jedince. Výsledek vyšetření vzorku 20N je tedy -/-.

**Obrázek 20:** Optimalizace metody LAMP na vyšetření mutace *MDR1* genu pro mutovanou alelu. Pro optimalizaci byly použity vzorky se známým genotypem, 9N +/-, 11N +/-, 17N +/+, 20N -/- a 37N -/-. NC – negativní kontrola.



Na obrázku 20 není patrný nárůst fluorescence ani u jednoho vzorku. Z toho důvodu byla reakce provedena znovu s prodloužením doby inkubace na 140 minut (Obrázek 21).

**Obrázek 21:** Výsledek optimalizace metody LAMP na vyšetření mutace *MDR1* genu pro mutovanou alelu po 140 minutách. Pro optimalizaci byly použité stejné vzorky jako v předchozím případě.



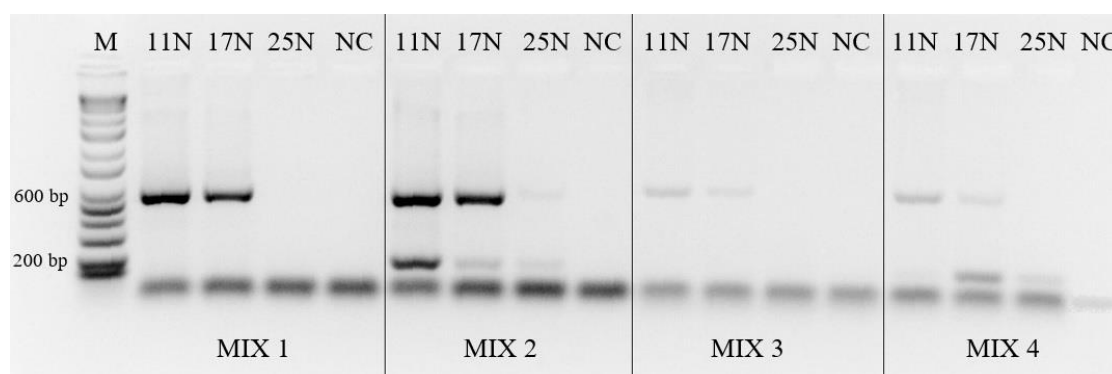
Na obrázku 21 je patrný počátek nárustu fluorescence u prvního vzorku až po 70. minutě. Nárůst fluorescence je po 140 minutách inkubace viditelný u pěti z šesti případů. Jedním z nich je však negativní kontrola, která má po celou dobu reakce zůstat bez nárustu fluorescence. Jelikož byly pro optimalizaci metody použity vzorky se známým genotypem, tak byla očekávána pozitivní reakce u vzorků 9N, 11N, 20N a 37N. U vzorku 37N nedošlo ani po 140 minutách inkubace k nárustu fluorescence, i přestože právě tento vzorek nese mutaci na obou alelách. Naopak u vzorku 17N je viditelná pozitivní reakce, i když se jedná o vzorek s ověřeným genotypem  $+/+$  a při testování mutované alely by u tohoto vzorku neměla být zaznamenána změna fluorescence.

Optimalizace metody LAMP pro mutovanou alelu byla několikrát zopakována. Jednotlivá opakování se lišila teplotou amplifikace, dobou inkubace a testováním různých vzorků, ale žádný z pokusů nepřinesl požadované výsledky. Po těchto neúspěšných pokusech bylo předpokládáno, že je chyba v ředění použitých primerů. Skrz tento předpoklad bylo následně provedeno několik dalších experimentů s různým ředěním primerů. Ani tyto pokusy však nebyly úspěšné. Z toho důvodu byla provedena polymerázová řetězová reakce s cílem ověření specifity použitých primerů (Obrázek 22).

## 5.2 PCR

Polymerázová řetězová reakce byla provedena s cílem ověření specifity primerů použitých při analýze metodou LAMP.

**Obrázek 22:** Výsledek PCR zobrazen na 2% agarózovém gelu. M – 100 bp DNA ladder (NEB, UK). NC – negativní kontrola. Pro ověření specifity primerů byly namíchány 4 PCR reakce, které se lišily kombinacemi užitých primerů. V mixu 1 byly použity primery FIP\_wt a BIP, mix 2 obsahoval primery FIP\_mut a BIP, mix 3 tvořily primery FIP\_wt v kombinaci s primerem B3 a mix 4 se skládal z primerů FIP\_mut a B3. Pro všechny mixy byly použity stejné vzorky DNA se známým genotypem, 11N  $+/-$ , 17N  $+/+$  a 25N  $-/-$ .



Mix 1 obsahoval primery FIP\_wt a BIP, z toho důvodu byla očekávána pozitivní reakce u vzorků 11N a 17N. Mix 2 se skládal z primerů FIP\_mut a BIP, proto byla očekávána reakce u vzorků 11N a 25N. Na obrázku 22 je však viditelná silná reakce u vzorku 17N. Vzorek 25N vypovídá v případě mixu 2 pouze slabým amplifikovaným produktem. Navíc jsou u všech vzorků v případě mixu 2 viditelné další amplikony o velikosti cca 200 bp. Mix 3 tvořila kombinace primerů FIP\_wt a B3, tudíž byla očekávána reakce pouze u vzorků 11N a 17N. Mix 4 obsahoval primery FIP\_mut a B3, z toho důvodu se předpokládala pozitivní reakce u vzorků 11N a 25N, k čemuž jako v případě mixu 2 nedošlo a pozorujeme pouze slabé produkty u vzorků 11N a 17N. Navíc jsou u mixu 4, stejně jako u mixu 2, patrné slabé amplikony o velikosti cca 200 bp u vzorků 17N a 25N. Z obrázku 22 a výše uvedeného popisu je patrné, že primer FIP\_wt v kombinaci s BIP i B3 primerem dávají očekávané a specifické výsledky. V případě primeru FIP\_mut však dochází k nespecifickým reakcím. Na základě toho, že se reakční mixy pro wild type a mutovanou alelu lišily ve složení pouze v primeru FIP, můžeme tvrdit, že vzniklé nespecifické reakce a tím pádem neúspěšná optimalizace metody LAMP pro mutovanou alelu tkví právě v použitém primeru FIP\_mut.

Použitá kombinace primerů pro mutovanou alelu není vhodná, primery spolu pravděpodobně tvoří sekundární struktury a z toho důvodu dochází k falešně pozitivním výsledkům.

Alelově specifická detekce LAMP není vhodná ani z hlediska pozdního nárůstu fluorescence. Výhoda metody LAMP je zejména v její rychlosti reakce, která se pohybuje od 15 do 60 minut. V případě pozdního nárůstu fluorescence může docházet k nespecifické hybridizaci primerů, amplifikaci negativní kontroly, nespecifické amplifikaci vzorků a tím pádem může dojít ke vzniku falešně pozitivních výsledků.

Metodu loop-mediated isothermal amplification se pro mutovanou alelu nepodařilo optimalizovat, proto nemohl být proveden screening vzorků. Vyšetření wild type alely umožní rozeznat pouze nemocné jedince. Heterozygotní jedince od zdravých rozeznat pouze pomocí analýzy wild type alely nelze.

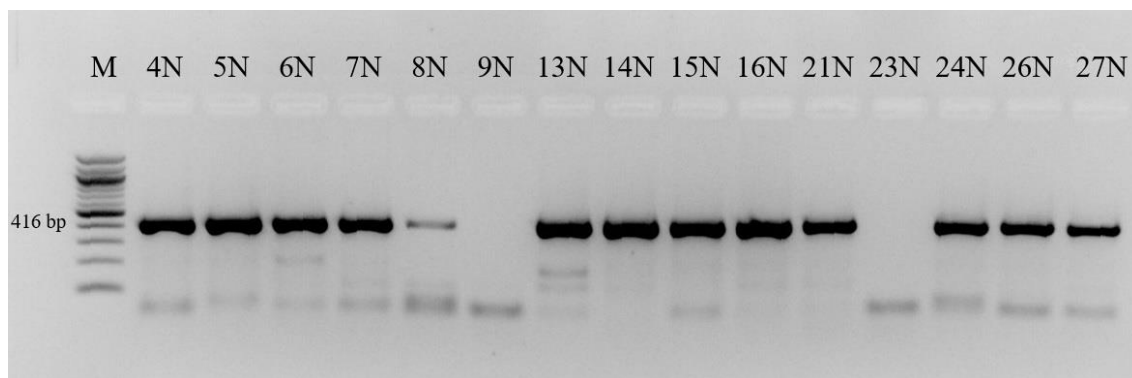
### 5.3 PCR-RFLP

Metodou PCR-RFLP bylo vyšetřeno všech 140 vzorků DNA ovčáckých psů. U dvou vzorků opakovaně nedošlo k úspěšné amplifikaci (Obrázek 23), důvodem byla s největší pravděpodobností nízká koncentrace DNA těchto vzorků. Před samotným screeningem



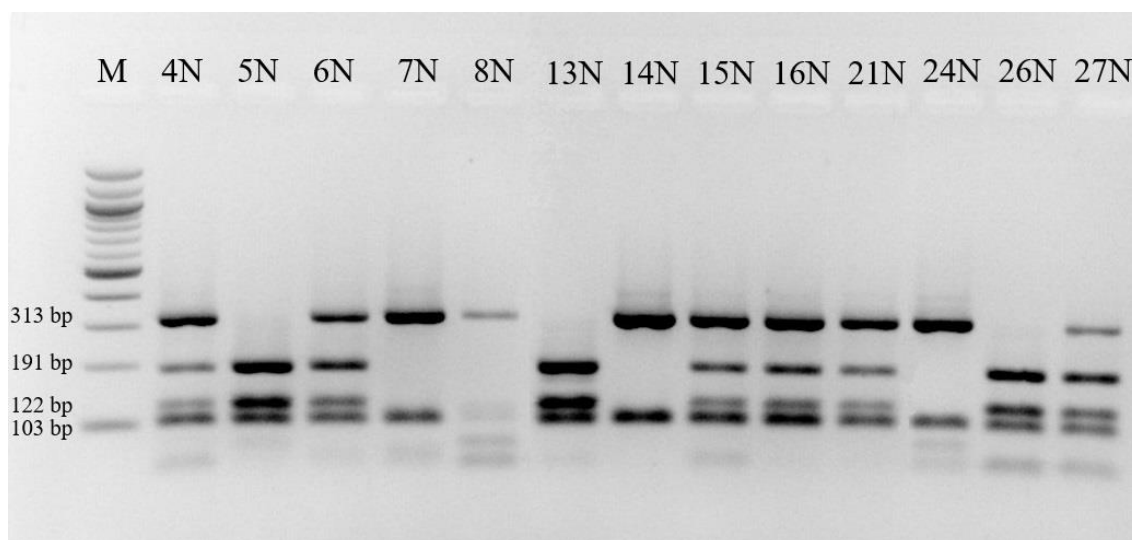
vzorků bylo zapotřebí metodu optimalizovat. Pro optimalizaci metody byly použity vzorky DNA se známým genotypem.

**Obrázek 23:** Kontrola PCR produktů na 2% agarózovém gelu. Výsledné amplikony měly velikost 416 bp. U vzorků 9N a 23N amplifikace neproběhla. M – 100 bp DNA ladder (NEB, UK).



Vzorky, u kterých neproběhla amplifikace nebyly zařazeny do další analýzy. PCR produkty byly štěpeny restrikním enzymem *MboI* při teplotě 37 °C po dobu šesti hodin. Výsledek restrikního štěpení byl vizualizován pomocí gelové elektroforézy na 2% agarózovém gelu (Obrázek 24).

**Obrázek 24:** Výsledek restrikního štěpení. M – 100 bp DNA ladder (NEB, UK).



Z obrázku 24 je patrné, že štěpení proběhlo úspěšně u všech vzorků a je možné určit výsledné genotypy.

Použitý enzym *MboI* štěpí PCR produkty ve dvou místech, jedno z nich (fragment o velikosti 103 bp) je přítomné u všech genotypů a s výsledkem nemá žádnou spojitost. U vzorků 7N, 8N a 24N jsou na obrázku 24 viditelné dva fragmenty o velikosti 313 bp a

103 bp, takový výsledek nesou jedinci s mutovanými alelami a označuje se jako -/-. U zdravých jedinců, bez mutace ani v jedné alele (označení výsledku +/+), budeme na gelu pozorovat tři fragmenty o velikostech 191 bp, 122 bp a 103 bp, což na obrázku 24 odpovídá vzorkům 5N, 13N a 26N. V posledním možném případě jsou na gelu patrné čtyři fragmenty o velikostech 313 bp, 191 bp, 122 bp a 103 bp, což je typické pro heterozygotní jedince (označení výsledku +/-). Zdraví přenašeči jsou na obrázku 24 vzorky 4N, 6N, 15N, 16N, 21N a 27N.

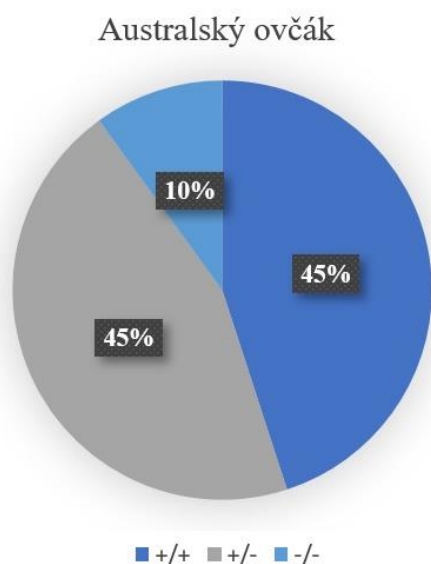
V následujících tabulkách (Tabulka 9 – Tabulka 14) jsou uvedeny výsledné genotypy získané metodou PCR-RFLP u jednotlivých plemen. Obrázky (Obrázek 25 – Obrázek 29) zobrazují výsledky graficky.

**Tabulka 9:** Výsledné genotypy – australský ovčák.

	<b>Pes</b>	<b>Fena</b>	<b>Celkem</b>
<b>+/+</b>	1	8	9
<b>+/-</b>	3	6	9
<b>-/-</b>	1	1	2
<b>Celkem</b>	5	15	20

Vyšetřovaný soubor tvořilo celkem 20 australských ovčáků. Zdravých jedinců bylo celkem 9, stejné množství představovali i zdraví přenašeči. Nemocní jedinci představovali 10 % ze všech vyšetřených australských ovčáků.

**Obrázek 25:** Grafické zobrazení výsledků – australský ovčák

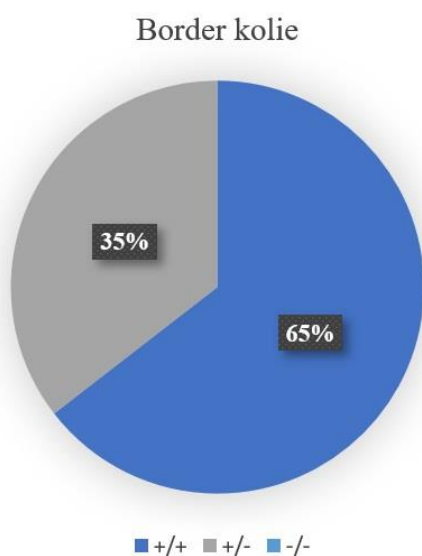


**Tabulka 10:** Výsledné genotypy – border kolie.

	<b>Pes</b>	<b>Fena</b>	<b>Celkem</b>
<b>+/+</b>	10	10	20
<b>+/-</b>	5	6	11
<b>-/-</b>	0	0	0
<b>Celkem</b>	15	16	31

Celkem bylo vyšetřeno 31 vzorků DNA border kolíí. Ani jeden z vyšetřovaných vzorků nebyl recesivní homozygot. Zdravých jedinců bylo celkem 20. Heterozygotní výsledek byl určen v 11 případech.

**Obrázek 26:** Grafické zobrazení výsledků – border kolie

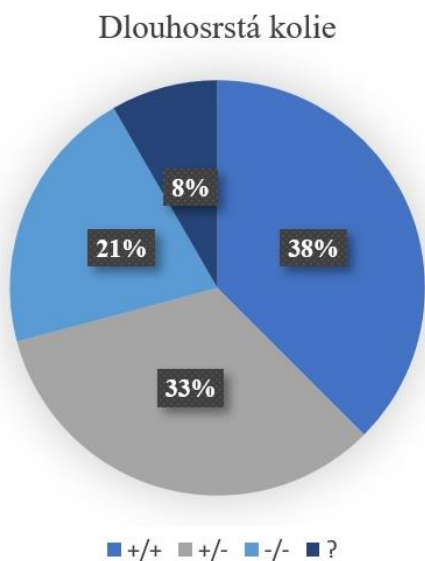


**Tabulka 11:** Výsledné genotypy – dlouhosrstá kolie.

	<b>Pes</b>	<b>Fena</b>	<b>Celkem</b>
<b>+/+</b>	5	4	9
<b>+/-</b>	5	3	8
<b>-/-</b>	2	3	5
<b>?</b>	0	2	2
<b>Celkem</b>	12	12	24

Vyšetřovaný soubor plemene dlouhosrstá kolie představovalo celkem 24 vzorků. U dvou vzorků neproběhla úspěšně amplifikace. V testovaném souboru bylo celkem 9 zdravých jedinců, 8 přenašečů a 5 postižených jedinců.

**Obrázek 27:** Grafické zobrazení výsledků – dlouhosrstá kolie

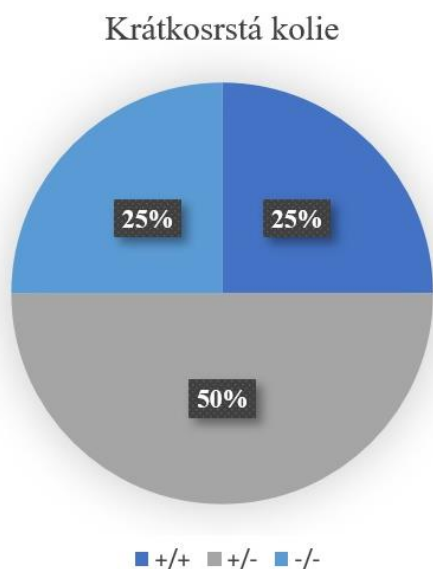


**Tabulka 12:** Výsledné genotypy – krátkosrstá kolie.

	Pes	Fena	Celkem
+/+	2	1	3
+/-	1	5	6
-/-	3	0	3
<b>Celkem</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>12</b>

Celkem bylo testováno 12 vzorků DNA krátkosrstých kolí. U třech jedinců byla objevená mutace na obou alelách, u 6 jedinců byla zjištěna pouze jedna mutovaná alela, zbylí tři jedinci byli bez mutace.

**Obrázek 28:** Grafické zobrazení výsledků – krátkosrstá kolie

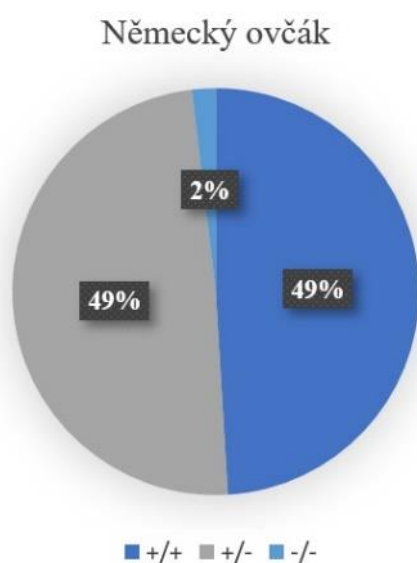


**Tabulka 13:** Výsledné genotypy – německý ovčák.

	<b>Pes</b>	<b>Fena</b>	<b>Celkem</b>
<b>+/+</b>	10	16	26
<b>+/-</b>	10	16	26
<b>-/-</b>	0	1	1
<b>Celkem</b>	20	33	53

Největší množství vzorků DNA bylo odebráno od plemene německý ovčák, celkem se jednalo o 53 vzorků, z toho byla mutace na obou alelách prokázána pouze u jednoho jedince. Zdravých jedinců bylo celkem 26, stejné množství představovali i heterozygoti.

**Obrázek 29:** Grafické zobrazení výsledků – německý ovčák



Výsledky potvrdili největší výskyt postižených jedinců u plemene krátkosrsté kolie, kde bylo zjištěno 25 % recesivních homozygotů. S 21 % následuje v pořadí množství postižených jedinců kolie dlouhosrstá. Největší procentuální zastoupení zdravých jedinců – 65 % bylo zjištěno u plemene border kolie, u stejného plemene nebyl v testovaném souboru odhalen ani jeden postižený jedinec. Největší zastoupení dominantních homozygotů bylo předpokládáno u plemene německý ovčák, který se však s 49 % umístil až na druhém místě. Zdravých přenašečů bylo v testovaném souboru německých ovčáků odhaleno stejné procentuální zastoupení jako jedinců bez mutace. Vysoké procento heterozygotů vyskytujících se u plemene německý ovčák bylo překvapivé, protože u uvedeného plemene není testování popisované mutace běžné, proto nejsou v odborné literatuře dostupná data ke srovnání. V testovaném souboru německých ovčáků byl dokonce odhalen jeden vzorek s mutací na obou alelách. Největší zastoupení přenašečů bylo zjištěno u plemene krátkosrsté kolie, kde bylo 50 % z testovaných vzorků

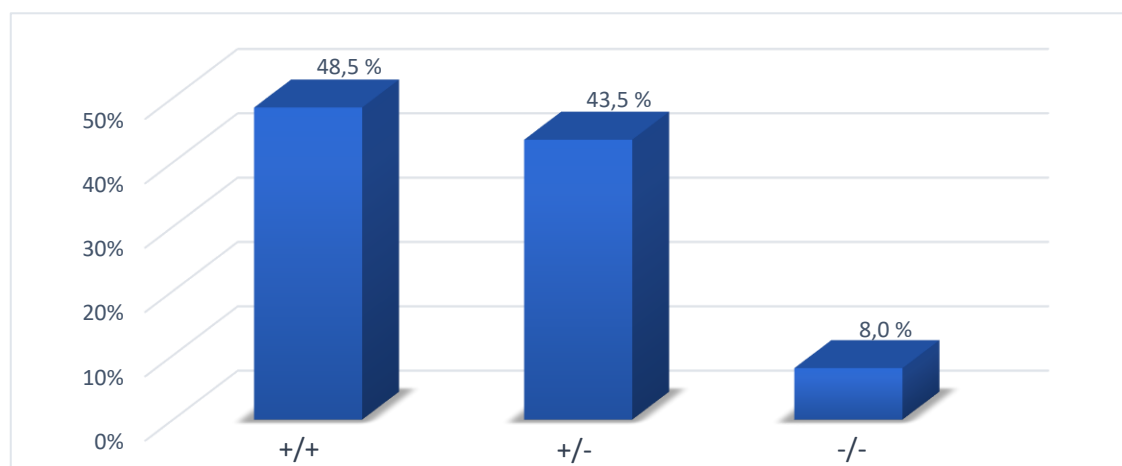
heterozygotních. Nejméně heterozygotních jedinců bylo odhaleno v testovaném souboru plemene border kolie, kde množství přenašečů dosáhlo 35 %.

**Tabulka 14:** Výsledné genotypy – souhrnná tabulka.

Plemeno	Počet vzorků	+/+	+/-	-/-
Australský ovčák	20	9	9	2
Border kolie	31	20	11	0
Dlouhosrstá kolie	22	9	8	5
Krátkosrstá kolie	12	3	6	3
Německý ovčák	53	26	26	1
Celkem	138	67	60	11

Metodou PCR-RFLP bylo celkem úspěšně vyšetřeno 138 vzorků DNA ovčáckých psů, konkrétně se jednalo o 80 vzorků fen a 58 vzorků psů. Ve vyšetřovaném souboru bylo 67 zdravých jedinců, z toho 39 fen a 28 psů. Zdravých přenašečů bylo v testovaném souboru odhaleno 60, jednalo se o 36 fen a 24 psů. U zbývajících 11 vzorků DNA byla zjištěna mutace na obou alelách, konkrétně se jednalo o 5 vzorků fen a 6 vzorků psů. Procentuálně bylo v testovaném souboru odhaleno 48,5 % zdravých jedinců, 43,5 % heterozygotů a 8 % nemocných jedinců (Obrázek 30).

**Obrázek 30:** Grafické zobrazení výsledných genotypů získaných metodou PCR-RFLP.



## 6 Diskuse

O mutaci v genu *MDRI* u ovčáckých psů bylo již vydáno mnoho publikací. Tato diplomová práce byla inspirována článkem z roku 2017 od autorů Stiedl a Weber, kteří k detekci popisované mutace využili netradiční metodu loop-mediated isothermal amplification. Uvedená metoda se totiž běžně používá k detekci mikroorganismů a použití této techniky k detekci konkrétní mutace u ovčáckých psů se zdá zajímavou, zejména vzhledem k rychlosti a citlivosti popisované metody. Metoda LAMP má však svá úskalí, a to zejména v návrhu a optimalizaci reakce.

Optimalizace metody loop-mediated isothermal amplification byla provedena se vzorky o známém genotypu. Tyto vzorky byly získány od ovčáckých psů, kteří byli testováni na mutaci genu *MDRI* akreditovanou laboratoří. Optimalizace metody LAMP byla úspěšná pouze pro alelu wild type, pro mutovanou alelu se nepodařilo metodu ani po několika pokusech optimalizovat. Z toho důvodu byla provedena PCR reakce s cílem ověření specifity použitých primerů. Výsledek reakce PCR dokázal, že v případě kombinace použitých primerů pro mutovanou alelu dochází k nespecifickým reakcím. Sekvence primerů použitých v této práci byly převzaty z článku vydaného v roce 2017 autory Stiedl a Weber, tyto primery však pro detekci mutované alely pomocí metody LAMP nejsou vhodné, protože v průběhu reakce dochází k nespecifickým reakcím, díky kterým nejsou získané výsledky spolehlivé.

Použité sekvence primerů byly navrženy tak, že mutovaná oblast zasahovala do vnitřního předního primeru FIP. Z toho důvodu byly použity dvě sekvence FIP primerů, jeden pro wild type alelu FIP\_wt a druhý pro mutovanou alelu FIP\_mut, ostatní použité primery byly v obou mixech shodné. Sekvence primerů lze však navrhnout tak, aby mutovanou oblast obsahovaly vnější primery F3 nebo B3, v případě použití smyčkových primerů lze navrhnout výskyt mutované oblasti v primerech Loop F nebo Loop B. Návrhem primerů pro AS-LAMP právě do smyčkových primerů se zabývali autoři Ding et al ve své studii publikované v roce 2019. Úkolem smyčkových primerů je urychlení amplifikace. Obsazením studované, mutované oblasti ve smyčkovém primeru získáme spojení rychlé, účinné amplifikace se specifickou alelickou konstitucí. Smyčkové primery jsou navrženy tak, aby stabilizovali specifickou hybridizaci, a naopak destabilizovali hybridizaci nespecifickou. Pro reakci LAMP je zásadní správný návrh primerů. Zahrnutím mutované oblasti do smyčkových primerů je možné získat lepší výsledky.

Jednou z hlavních výhod metody LAMP je její rychlost, překročení tresholdu lze u real-time zobrazení s použitím smyčkových primerů sledovat v některých případech již od 8. minuty analýzy. Celková doba analýzy metodou LAMP obvykle nepřekračuje 60 minut. Autoři Hardinge a Murray uvádějí ve své studii vydané v roce 2019, že při prodloužení reakční doby LAMP na 150 a více minut může po 100. minutě docházet k nespecifickým reakcím, které mohou vést k falešně pozitivním výsledkům. Při nárůstu fluorescence u negativní kontroly po sté minutě je velmi nepravděpodobné, že by byl tento nárůst fluorescence způsoben kontaminací vzorku. V takovém případě by došlo k amplifikaci mnohem dříve. Autoři Hardinge a Murray se ve své práci zabývají hledáním způsobů redukce falešně pozitivních výsledků v průběhu reakce LAMP. Možnost snížení falešně pozitivních výsledků našli autoři této studie v použití fluorescenčně značených FIP primerů (označených fluoroforem JOE a SYTO-9). Tato kombinace využívá monitorování amplifikace v reálném čase při dvou různých vlnových délkách fluoroforů, jeden pro SYTO-9, druhý pro JOE a funguje tedy jako duální detekční metoda. Další fluorescenční barvy, které se používají ve značení primerů při LAMP reakcích jsou SYTO-13, SYTO-82 a další (Oscorbin et al., 2016). Využití fluorescenčně značených sond v qLAMP zvyšuje specificitu reakce. Použitím sond s fluorofory o různých vlnových délkách je také možné provádět multiplex reakce, díky kterým je možné detekovat více mutací v jedné reakci.

Jako referenční metoda k metodě LAMP byla v této práci zvolena restriční analýza, která se v praxi k vyšetření mutace *MDR1* genu u ovčáckých psů běžně využívá. Technikou PCR-RFLP byl vyšetřen soubor 140 vzorků. U dvou vzorků nebylo možné výsledek vyhodnotit, z toho důvodu je znám výsledek vyšetření u 138 testovaných psů.

Po vyhodnocení výsledků získaných restriční analýzou bylo zjištěno, že 48,5 % ze všech vyšetřených vzorků bylo dominantně homozygotních. Zdravých přenašečů bylo ve vyšetřovaném souboru odhaleno 43,5 %. Zbývajících 8 % představovali recesivně homozygotní jedinci.

Gramer et al ve svém článku z roku 2011 uvádějí největší výskyt alespoň jedné mutované alely u plemene kolie (59 %), do skupiny kolie byly v rámci jejich výzkumu zařazeny jak dlouhosrsté, tak krátkosrsté kolie. V této práci byla zjištěna frekvence výskytu mutované alely u dlouhosrstých a krátkosrstých kolí 44 %. Na druhém místě se v rámci této práce s frekvencí výskytu mutované alely 32,5 % umístilo plemeno australský ovčák, u stejného plemene autoři Gramer et al uvádí relativní alelovou frekvenci 22 %. Plemeno německý



ovčák se s 26,4 % umístil na třetím místě. Nejmenší výskyt mutované alely byl v práci autorů Gramer et al zjištěn u plemene border kolie (1 %). Nejméně jedinců s mutací v genu *MDR1* bylo i v rámci této práce také odhaleno u plemene border kolie, ale s vyšším zastoupením mutované alely (18 %). Pořadí frekvence zastoupení mutované alely u jednotlivých plemen se shoduje s autory Gramer et al. Odlišné procentuální zastoupení je dáno velikostí testované populace.

Dříve se k vyšetření mutace genu *MDR1* u ovčáckých psů hojně využívala metoda PCR, tuto metodu využili k testování i autoři Geyer et al ve své studii publikované v roce 2005. Využití samotné PCR reakce má však svá úskalí v odečítání výsledků. Analýza PCR produktů sice probíhá pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu, ale rozdíl mezi produkty wild type a mutované alely jsou pouze 4 báze, z toho důvodu může být jejich rozlišení obtížné. Skrz tento problém se začaly k detekci popisované mutace využívat různé modifikace PCR, jako například PCR-RFLP nebo AS-PCR. Alelově specifickou PCR (AS-PCR) využili k detekci mutace *MDR1* genu autoři Baars et al ve své studii publikované v roce 2008. AS-PCR využívá specificky navržených primerů pro wild type a mutovanou alelu. Po dokončení reakce PCR jsou vzniklé fragmenty separovány na agarózovém gelu, vizualizovány pod UV zářením a vyhodnoceny.

Při použití metody PCR-RFLP k detekci popisované mutace se využívá restrikční enzym *MboI*, který byl využit i v rámci praktické části této práce. Autoři Mizukami et al ve své studii publikované v roce 2013 uvádí proč je využití právě této restriktázy vhodné. Restrikční enzym *MboI* má pro analyzovaný PCR produkt dvě štěpná místa. Jedno z nich je štěpné místo sledované mutace a druhé je přítomné u všech genotypů a s hledanou cílovou sekvencí nemá spojitost, poskytuje však záruku štěpné funkce použité endonukleázy. Takovou výhodu mnoho jiných restrikčních enzymů nemá.

Volba restrikčního enzymu při analýze metodou PCR-RFLP je velmi důležitá, některé enzymy mohou štěpit PCR produkty na podobně dlouhé fragmenty a jejich analýza pomocí agarózového gelu pak není možná. K analýze takových produktů se pak musí použít polyakrylamidový gel, toho využili například autoři Teanpaisan a Dahlén ve své publikaci vydané v roce 2006. Autoři se ve své práci zabývají rozlišením jednotlivých druhů bakterie *Lactobacillus*, které jsou u lidí často spojovány se zubním kazem.

Primární vzorky v této práci byly získány stěrem buněk z bukalní sliznice ovčáckých psů. Někteří autoři uvádějí, že je analýza DNA získané odběrem z krve lepší než použití DNA

izolované z buněk bukalní sliznice. Odběr pomocí bukalních tamponů s sebou nese větší riziko bakteriální kontaminace, která může být problémem při následné analýze, například v průběhu reakce PCR mohou vznikat nespecifické amplikony. Baars et al ve své práci publikované v roce 2008 zabývali detekcí mutace *MDRI* genu AS-PCR u ovčáckých psů. V této studii testovali autoři vzorky DNA izolované jak z krve, tak z bukalních stěrů a při porovnání výsledků zjistili, že se výsledky genotypizace nijak neliší. Využití vzorků DNA izolovaných z buněk získaných stěrem z bukalní sliznice je vhodnější vzhledem k tomu, že se nejedná o invazivní odběr.

Jedním z cílů této diplomové práce bylo srovnání použitých metod. Metodu loop-mediated isothermal amplification se nepodařilo optimalizovat pro obě alely. S využitím jiných sekvencí primerů pro mutovanou alelu (např. Ding et al) by se však s největší pravděpodobností metodu podařilo optimalizovat a využití metody LAMP k detekci mutace v genu *MDRI* u ovčáckých psů by bylo vhodné. Výsledky vyšetření by bylo možné odečíst již po cca 45 minutách analýzy. Technika PCR-RFLP je časově náročná zejména díky času potřebnému k restrikci amplifikovaných produktů, který se s využitím restrikčního enzymu *MboI* pohybuje okolo šesti hodin. Celé vyšetření restrikční analýzou pak dosahuje cca 10 hodin, což je ve srovnání s metodou LAMP obrovský rozdíl a využití metody LAMP pro detekci mutace by znamenalo velkou úsporu času. Analýza metodou PCR-RFLP je navíc náročnější na potřebu laboratorního vybavení, pro tuto metodu je nezbytný termocykler a elektroforéza. Pro vyšetření metodou LAMP je teoreticky potřeba pouze ohřívací blok umožňující udržení stálé teploty.

Vzhledem k časové náročnosti by byla z popsaných metod lepší volbou technika loop-mediated isothermal amplification, ta má však svá velká úskalí v návrhu a optimalizaci reakce, které představovaly problém i v této práci. Metoda PCR-RFLP poskytuje přesné a správné výsledky, je však časově velmi náročná a bylo by vhodné ji nahradit rychlejší metodou, která však bude dávat stejně přesné výsledky. Takovou metodou může být právě technika LAMP.

## 7 Závěr

Během procesu šlechtění docházelo u psů ke vzniku a hromadění mnoha geneticky podmíněných chorob. Genetické vyšetření je mnohdy jediným způsobem, jak výskyt takového onemocnění odhalit a díky němu předejít nežádoucím následkům dané choroby. Z toho důvodu jsou genetická vyšetření důležitá a pro některé choroby by měla být podmínkou pro zařazení psa do chovu, čímž by se předešlo přenosu některých nebezpečných mutací do dalších generací.

Genetické vyšetření mutace *MDRI* genu není u ovčáckých psů povinné, je pouze doporučeno, a to jen u několika ovčáckých plemen. Například u plemene německý ovčák není testování popisované mutace vůbec běžné, a právě u tohoto plemene bylo v rámci této práce zaznamenáno 49 % heterozygotních jedinců. Dokonce byl v testovaném souboru plemene německý ovčák odhalen jeden recesivně homozygotní jedinec. Tyto výsledky byly u plemene, které se běžně na popisovanou mutaci nevyšetřuje, překvapivé a jsou důkazem důležitosti genetického testování.

Jedním z cílů této diplomové práce byla optimalizace metod loop-mediated isothermal amplification a restrikční analýzy pro detekci mutace genu *MDRI* u ovčáckých psů a následný screening vzorků DNA. Uvedený cíl práce byl naplněn pouze částečně, neboť metodu LAMP se podařilo optimalizovat pouze pro wild type alelu. Mutovanou alelu se pro metodu LAMP skrz nescifické reakce použitých primerů nepodařilo ani po několika různých pokusech optimalizovat. Z toho důvodu nebylo možné touto metodou provést screening vzorků. Nescifickou reakci použitého primeru pro mutovanou alelu by pravděpodobně bylo možné vyřešit vlastním návrhem jiných primerů. Screening vzorků DNA ovčáckých psů byl proveden pouze metodou PCR-RFLP, výsledné frekvence genotypů se shodují s výsledky z dostupné odborné literatury.

Dalším cílem práce bylo srovnání použitých metod. Restrikční analýza je přesnou a citlivou metodou, nevýhoda popisované metody však tkví v její časové náročnosti. S tímto problémem se u metody LAMP vzhledem k její rychlosti nesetkáme, výsledky vyšetření jsou pomocí LAMP známy již do několika desítek minut. Technika LAMP má však svá úskalí v návrhu a optimalizaci reakce, což bylo problémem i v praktické části této práce.

Diplomové práci byly stanovené tři hypotézy, které vzhledem k neúspěšné optimalizaci metody LAMP nemůžeme potvrdit ani vyvrátit.

## 8 Seznam použité literatury

- Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., Chang, G., 2009. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* 323, 1718–1722. <https://doi.org/10.1126/science.1168750>
- Baars, C., Leeb, T., von Klopmann, T., Tipold, A., Potschka, H., 2008. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs. *Vet. J.* 177, 394–397. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.020>
- Beránek, M., 2016. Molekulární genetika pro bioanalytiky, 1. ed. Karolinum, Univerzita Karlova v Praze.
- Brown, T.A., 2007. Klonování genů a analýza DNA, 1. ed. Olomouc: Univerzita Palackého.
- Buš, A., 2005. Otrava psů ivermektinem [WWW Document]. *Veterinářství*. URL <https://www.vetweb.cz/otrava-psu-ivermektinem/> (accessed 1.3.20).
- Císařovský, M., 2008. PES: nekonečný příběh od pravěku do třetího tisíciletí, 1. ed. Canis, Praha.
- Cunliffe, J., 2004. Encyklopedie psů, 1. ed. Praha: Slovart.
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G., 2001. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res.* 11, 1156–1166. <https://doi.org/10.1101/gr.GR-1649R>
- Deferme, S., Augustijns, P., 2003. The effect of food components on the absorption of P-gp substrates: a review. *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 153–162. <https://doi.org/10.1211/002235702603>
- Deshpande, D., Hill, K.E., Mealey, K.L., Chambers, J.P., Giese, M.A., 2016. The Effect of the Canine ABCB1-1Δ Mutation on Sedation after Intravenous Administration of Acepromazine. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 636–641. <https://doi.org/10.1111/jvim.13827>
- Dhama, K., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Kapoor, S., Kumar, A., Thomas, P., 2014. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* 17, 151–166. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.151.166>

- Ding, S., Chen, R., Chen, G., Li, M., Wang, J., Zou, J., Du, F., Dong, J., Cui, X., Huang, X., Deng, Y., Tang, Z., 2019. One-step colorimetric genotyping of single nucleotide polymorphism using probe-enhanced loop-mediated isothermal amplification (PE-LAMP). *Theranostics* 9, 3723–3731. <https://doi.org/10.7150/thno.33980>
- Dowling, P., 2006. Pharmacogenetics: It's not just about ivermectin in collies. *Can. Vet. J.* 47, 1165–1168.
- Ducháček, L., Lamka, J., 2014. *Veterinární vademecum pro farmaceuty*, 2. ed. Karolinum, Univerzita Karlova v Praze.
- Fang, X., Li, J., Chen, Q., 2008. One new method of nucleic acid amplification—Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Virol. Sin.* 23, 167–172. <https://doi.org/10.1007/s12250-008-2929-8>
- Freedman, A.H., Gronau, I., Schweizer, R.M., Vecchyo, D.O.-D., Han, E., Silva, P.M., Galaverni, M., Fan, Z., Marx, P., Lorente-Galdos, B., Beale, H., Ramirez, O., Hormozdiari, F., Alkan, C., Vilà, C., Squire, K., Geffen, E., Kusak, J., Boyko, A.R., Parker, H.G., Lee, C., Tadisotla, V., Siepel, A., Bustamante, C.D., Harkins, T.T., Nelson, S.F., Ostrander, E.A., Marques-Bonet, T., Wayne, R.K., Novembre, J., 2014. Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs. *PLOS Genet.* 10, e1004016. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004016>
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Leidolf, R., Moritz, A., Petzinger, E., 2005a. Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 28, 545–551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2005.00692.x>
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Moritz, A., Petzinger, E., 2005b. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 28, 95–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00625.x>
- Geyer, J., Janko, C., 2012. Treatment of MDR1 Mutant Dogs with Macrocyclic Lactones. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 969–986. <https://doi.org/10.2174/138920112800399301>
- Gramer, I., Leidolf, R., Döring, B., Klintzsch, S., Krämer, E.-M., Yalcin, E., Petzinger, E., Geyer, J., 2011. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Vet. J.* 189, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.012>

- Hardinge, P., Murray, J.A.H., 2019. Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43817-z>
- Hodges, L.M., Markova, S.M., Chinn, L.W., Gow, J.M., Kroetz, D.L., Klein, T.E., Altman, R.B., 2011. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet. Genomics* 21, 152–161. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283385a1c>
- Hooiveld, G.J., van Montfoort, J.E., Meijer, D.K., Müller, M., 2001. Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 12, 525–543. [https://doi.org/10.1016/s0928-0987\(01\)00101-4](https://doi.org/10.1016/s0928-0987(01)00101-4)
- Hue-Roye, K., Vege, S., 2008. Principles of PCR-based assays. *Immunohematology* 24, 170–175.
- Kirkness, E.F., Bafna, V., Halpern, A.L., Levy, S., al, et, 2003. The dog genome: Survey sequencing and comparative analysis. *Sci. Wash.* 301, 1898–903.
- Knoll, A., Vykoukalová, Z., 2002. Molekulární genetika zvířat - Metody detekce polymorfizmů DNA genů, 1. ed. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.
- Koudelová, J., 2010. Německý ovčák I., 1. ed. České Budějovice: Nová Forma.
- Lanceau, Y., 2007. Psi - 1001 fotografií, 1. ed. Čestlice: Rebo.
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., Kim, Y.H., 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp. JoVE.* <https://doi.org/10.3791/3923>
- Lehne, G., 2000. P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Curr. Drug Targets* 1, 85–99. <https://doi.org/10.2174/1389450003349443>
- Li, Y., Fan, P., Zhou, S., Zhang, L., 2017. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb. Pathog.* 107, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.016>
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J., Zody, M.C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., Ponting, C.P., Galibert, F., Smith, D.R., deJong, P.J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, 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, 803–819. <https://doi.org/10.1038/nature04338>
- Mealey, K., 2016. MDR1 GENE MUTATIONS & DRUG THERAPY [WWW Document]. *Clin. Brief.* URL [https://vcpl.vetmed.wsu.edu/docs/librariesprovider17/default-document-library/ask\\_-mdr1-gene-mutations-may-2016.pdf?sfvrsn=de7acb38\\_2](https://vcpl.vetmed.wsu.edu/docs/librariesprovider17/default-document-library/ask_-mdr1-gene-mutations-may-2016.pdf?sfvrsn=de7acb38_2)
- Mealey, K.L., 2008. Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: Heartworm prevention and pharmacogenetics. *Vet. Parasitol., Special issue: Heartworm Revisited* 158, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.009>
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M., Cantor, G.H., 2001. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11, 727–733. <https://doi.org/10.1097/00008571-200111000-00012>
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Waiting, D.K., 2002. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of collies from the northwestern United States. *Am. J. Vet. Res.* 63, 479–481. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.479>
- Mealey, K.L., Munyard, K.A., Bentjen, S.A., 2005. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Vet. Parasitol.* 131, 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.004>
- Merola, V.M., Eubig, P.A., 2012. Toxicology of Avermectins and Milbemycins (Macrocyclic Lactones) and the Role of P-Glycoprotein in Dogs and Cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 42, 313–vii. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.12.005>
- Mizukami, K., Yabuki, A., Chang, H.-S., Uddin, M.M., Rahman, M.M., Kushida, K., Kohyama, M., Yamato, O., 2013. High Frequency of a Single Nucleotide Substitution (c.-6-180T>G) of the Canine MDR1/ABCB1 Gene Associated with Phenobarbital-Resistant Idiopathic Epilepsy in Border Collie Dogs. *Dis. Markers* 35, 669–672. <https://doi.org/10.1155/2013/695918>
- Moore, S., 2001. *Kolie*, 1. ed. Fortuna Libri, Praha.

- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., Notomi, T., 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods* 59, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.12.005>
- Mori, Y., Notomi, T., 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 15, 62–69. <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* 16, 223–229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63.
- Oscorbin, I.P., Belousova, E.A., Zakabunin, A.I., Boyarskikh, U.A., Filipenko, M.L., 2016. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *BioTechniques* 61, 20–25. <https://doi.org/10.2144/000114432>
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P.K., Rao, P.V.L., Morita, K., 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* 18, 407–421. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>
- Parker, H.G., Kim, L.V., Sutter, N.B., Carlson, S., Lorentzen, T.D., Malek, T.B., Johnson, G.S., DeFrance, H.B., Ostrander, E.A., Kruglyak, L., 2004. Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog. *Science* 304, 1160–1164. <https://doi.org/10.1126/science.1097406>
- Pechandová, K., Buzková, H., Slanař, O., Perlík, F., 2006. Efluxní transmembránový transportér - P-glykoprotein. *Klin. Biochem. Metab. Časopis Čes. Spol. Klin. Biochem.* 14, 196–201.
- Räber, H., 1994. *Encyklopedie - plemena psů*, 1. ed. Ostrava: Blesk.
- Reimann, N., Bartnitzke, S., Nolte, I., Bullerdiel, J., 1999. Working with canine chromosomes: current recommendations for karyotype description. *J. Heredity* 90, 31–34. <https://doi.org/10.1093/jhered/90.1.31>



- Ruml, T., Rumlová, M., Pačes, V., 2002. Genové inženýrství, 1. ed. VŠCHT Praha.
- Rumlová, M., Ruml, T., Pačes, V., 2003. Základní metody genového inženýrství, 1. ed. Praha: JPM Tisk.
- Sahoo, P.R., Sethy, K., Mohapatra, S., Panda, D., 2016. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet. World* 9, 465–469. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.465-469>
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J., 2005. *Metody molekulární biologie*, 1. ed. Brno: Masarykova univerzita.
- Smrček, M., Smrčková, L., 2012. *Psi celého světa*, 1. ed. Grada, Praha.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J., Relichová, J., Doškař, J., 2017. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita.
- Stiedl, C.P., Weber, K., 2017. Fast and simple detection methods for the 4–base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene by PCR and isothermal amplification. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29, 176–180. <https://doi.org/10.1177/1040638716683213>
- Teanpaisan, R., Dahlén, G., 2006. Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species. *Oral Microbiol. Immunol.* 21, 79–83. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00259.x>
- Thorpe-Vargus, S., 2009. Dog Genetic Diversity Articles at DogDimension.org [WWW Document]. URL <http://dogdimension.com/DiversitySite/thorp-vargas02.shtml> (accessed 11.22.19).
- Tomlinson, J., 2013. In-Field Diagnostics Using Loop-Mediated Isothermal Amplification, in: Dickinson, M., Hodgetts, J. (Eds.), *Phytoplasma: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 291–300. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_25)
- vanHouten, D., 2004. *Německý ovčák*, 1. ed. Dobřejovice: Rebo Productions.
- Verhoef-verhallen, E., 2014. *Psi: velký atlas plemen*, 4. ed. Čestlice: Rebo.
- Verhoef-Verhallen, E., 2010a. *Psi - praktická encyklopedie*, 1. ed. Čestlice: Rebo.
- Verhoef-Verhallen, E., 2010b. *Německý ovčák*, 1. ed. Čestlice: Rebo.

vonHoldt, B.M., Pollinger, J.P., Lohmueller, K.E., Han, E., Parker, H.G., Quignon, P., Degenhardt, J.D., Boyko, A.R., Earl, D.A., Auton, A., Reynolds, A., Bryc, K., Brisbin, A., Knowles, J.C., Mosher, D.S., Spady, T.C., Elkahoun, A., Geffen, E., Pilot, M., Jedrzejewski, W., Greco, C., Randi, E., Bannasch, D., Wilton, A., Shearman, J., Musiani, M., Cargill, M., Jones, P.G., Qian, Z., Huang, W., Ding, Z.-L., Zhang, Y., Bustamante, C.D., Ostrander, E.A., Novembre, J., Wayne, R.K., 2010. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* 464, 898–902. <https://doi.org/10.1038/nature08837>

Wayne, R.K., vonHoldt, B.M., 2012. Evolutionary genomics of dog domestication. *Mamm. Genome* 23, 3–18. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9386-7>

Wong, Y.-P., Othman, S., Lau, Y.-L., Radu, S., Chee, H.-Y., 2018. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 124, 626–643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>

Zhang, X., Lowe, S.B., Gooding, J.J., 2014. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens. Bioelectron.* 61, 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.039>

Zhou, D., Guo, J., Xu, L., Gao, S., Lin, Q., Wu, Q., Wu, L., Que, Y., 2014. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Sci. Rep.* 4, 4912. <https://doi.org/10.1038/srep04912>

## 9 Seznam zkratek

A	adenosin
ABC	ATP binding cassette's
ATP	adenosintrifosfát
B3	backward outer primer, vnější zadní primer
BIP	backward inner primer, vnitřní zadní primer
bp	pár nukleových bází
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
F3	forward outer primer, vnější přední primer
FIP	forward inner primer, vnitřní přední primer
G	guanin
kb	kilobáze
LAMP	loop-mediated isothermal amplification, izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkami
Loop B	backward loop primer, zadní smyčkový primer
Loop F	forward loop primer, přední smyčkový primer
<i>MDR1</i>	multi-drug resistance, mnohočetná léková rezistence
NC	negativní kontrola
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PCR-RFLP	polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism, polymerázová řetězová reakce – polymorfismus délky restrikčních fragmentů
Pgp	P-glykoprotein
RNA	ribonukleová kyselina
T	thymin
UV	ultraviolet, ultrafialové