

Detekce polymorfismu v genu *MDR1* u ovčáckých a honáckých plemen psů

Diplomová práce

Vedoucí práce:
Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Marieta Staroveská

Tímto bych chtěla poděkovat mému vedoucímu práce panu Prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D. za jeho věcné připomínky a pomoc při vytváření diplomové práce.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci: **Detekce polymorfismu v genu *MDR1* u ovčáckých a honáckých plemen psů** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 Autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne 28. dubna 2016

Abstract

This thesis is focused on polymorphism of *MDR1* gene and related drug resistance. Resistance is caused by deletion of four nucleotids, that resulting in a frame shift and synthesis of nonfunctional transport of P-glycoprotein. The text describes a polymorphism of *MDR1* (*ABCB1*) gene, which results in reduced resistance to drugs belonging to the group of macrocyclic lactones. It also describes inheritance of this phenomenon and it deals with the detection of mutation using PCR (polymerase chain reaction) and by fragmentation analyses. A review of literature study is a form of research solely from scientific publications. 128 dogs were included into the own analysis. The results confirmed that Collies had the highest presence of deletions (29,73 %) with a high number of carriers in the study population of dogs (54,05 %). The percentage of affected individuals in the breed of Australian Shepherd and Sheltie was significantly lower (7,32 % and 6 %), but the percentage of carriers were also high in both Australian Shepherds (34,14 %) and the breed Sheltie (48 %).

Keywords

MDR1 gene, *ABCB1* gene, P-glycoprotein, drug resistance, hypersensitivity, Ivermectin, pharmacogenetics, polymorphism, membrane transporter, *Canis lupus familiaris*

Abstrakt

Práce je zaměřena na polymorfismus v genu *MDR1* a s ním související rezistenci vůči léčivům. Rezistence je způsobena delecí čtyř nukleotidů, která má za následek posun čtecího rámce a syntézu nefunkčního transportního P-glykoproteinu. V textu je popsán polymorfismus v genu *MDR1* (*ABCB1*), jež má za následek sníženou rezistenci vůči léčivům patřících do skupiny makrocyclických laktonů. Také popisuje dědičnost tohoto fenoménu a zabývá se detekcí mutace pomocí metody PCR (polymerázové řetězcové reakce) a metody fragmentační analýza. Literární přehled práce je zpracován formou rešerše, čerpající výhradně z vědeckých publikací. Do vlastní analýzy bylo zařazeno celkem 128 psů. Výsledky potvrdili nejvyšší výskyt delece u plemene kolie (29,73 %), s vysokým počtem přenašečů ve sledované populaci psů (54,05 %). Procento postižených jedinců u plemene australský ovčák a šeltie bylo výrazně nižší (7,32 % a 6 %), ale procento přenašečů bylo taktéž vysoké jak u plemene australský ovčák (34,14 %), tak u plemene šeltie (48 %).

Klíčová slova

MDR1 gen, *ABCB1* gen, P-glykoprotein, léková rezistence, hypersenzitivita, Ivermectin, farmakogenetika, polymorfismus, membránový transportér, *Canis lupus familiaris*

Obsah

1	ÚVOD	9
2	CÍL PRÁCE	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	PŮVOD PSA	11
3.2	FARMAKOGENETIKA A FARMAKOGENOMIKA	12
3.3	GENOM A KARYOTYP PSA	13
3.4	GEN <i>MDR1</i>	15
3.4.1	<i>Lokalizace genu MDR1</i>	15
3.5	MEMBRÁNOVÝ TRANSPORTÉR P-GLYKOPROTEIN	15
3.5.1	<i>Substráty P-glykoproteinu</i>	18
3.6	POLYMORFISMUS V GENU <i>MDR1</i>	19
3.6.1	<i>Bodový polymorfismus</i>	19
3.6.2	<i>Repetitivní sekvence</i>	19
3.6.3	<i>Konformační polymorfismus</i>	19
3.6.4	<i>Výskyt polymorfismu genu MDR1</i>	20
3.7	MODEL DĚDIČNOSTI MUTACE V GENU <i>MDR1</i>	24
3.8	PROBLÉMOVÁ LÉČIVA A CHARAKTERISTIKA JEJICH PŮSOBENÍ	24
3.8.1	<i>Ivermektin</i>	25
3.9	METODY DETEKCE POLYMORFISMU GENU <i>MDR1</i>	26
3.10	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZCOVÁ REAKCE	26
3.11	METODY PCR PRO DETEKCI <i>MDR1</i> MUTACE	27
3.11.1	<i>Zjištění přítomnosti mutované alely za pomoci polymerázové řetězové reakce (PCR) a gelové elektroforézy (ELFO)</i>	27
3.11.2	<i>Metoda TaqMan® alelické diskriminace pomocí real-time PCR</i>	29
4	METODIKA	32
4.1	SLEDOVANÁ POPULACE ZVÍŘAT	32
4.2	IZOLACE DNA	33
4.2.1	<i>Izolace DNA z chlupových cibulek</i>	33
4.2.2	<i>Izolace DNA z krve</i>	35
4.3	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZCOVÁ REAKCE (PCR)	36
4.3.1	<i>Základy přípravy PCR</i>	36
4.3.2	<i>Složení reakční směsi</i>	37
4.3.3	<i>Průběh PCR</i>	37
4.3.4	<i>Výběr a návrh primerů</i>	38

4.3.5	<i>Optimalizace PCR</i>	39
4.3.6	<i>Složení reakční směsi</i>	41
4.4	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	42
4.4.1	<i>Vizualizace elektroforetických gelů</i>	43
4.4.2	<i>Postup a vyhodnocení gelové elektroforézy</i>	43
4.5	FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA	45
4.5.1	<i>Analýza výstupních dat</i>	46
5	VÝSLEDKY	48
5.1	VÝPOČET FREKVENCÍ ALEL A GENOTYPŮ	48
5.2	HODNOCENÍ GENETICKÉ ROVNOVÁHY DLE HARDY-WEINBERGOVA ZÁKONA	51
6	DISKUZE	53
7	ZÁVĚR	55
8	LITERATURA	56
9	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	61
9.1	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	61
9.2	SEZNAM TABULEK	62
9.3	SEZNAM GRAFŮ	62
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	63
11	PŘÍLOHY	64
11.1	PŘÍLOHA Č. 1 – VYSVĚTLENÍ POJMŮ	64
11.2	PŘÍLOHA Č. 2 – REGISTR TESTOVANÝCH PSŮ	65
11.3	PŘÍLOHA Č. 3 – VZOR DOTAZNÍKU A VÝSTUPNÍ ZPRÁVY PRO MAJITELE PSA.....	69

1 ÚVOD

Mutace v genu *MDR1* (multiple drug resistance gene) je delece čtyř párů bází ve 4. exonu. Díky této deleci následně dochází k posunu čtecího rámce a předčasnému vytvoření stop kodonu, který má za následek ukončení syntézy transportní bílkoviny P-glykoproteinu, který je nezbytný pro odbourávání léčiv z mozku zpět do krve. Hematoencefalická bariéra CNS se stává propustnou pro léčiva, což vede k otravě organismu. Mezi příznaky otravy organismu patří slinění, zvracení, slepota, kóma až smrt. Fenomén toxicity byl poprvé popsán u plemene kolie a vyskytl se po zavedení nových antiparazitik v roce 1980. Tato práce je zaměřena na detekci polymorfismu u plemen kolie, šeltie a australský ovčák, u kterých se podle doposud provedených studií vyskytuje nejčastěji. Při výběru léků pro psy těchto plemen je nutné věnovat pozornost složení léčiv. Genetický test rychle a spolehlivě odhalí případnou deleci v genu *MDR1*. K vyšetření je třeba vzorek DNA izolovaný z krve, slin nebo chlupových cibulek psů. Pomocí testování v populacích psů je možné eliminovat výskyt tohoto fenoménu. Některé kluby chovatelů výsledky testování vyžadují před uchovněním psů, ale v České republice toto zatím není podmínkou, což vede k nekontrolovanému připarování postižených jedinců.

2 CÍL PRÁCE

Diplomová práce si klade za cíl přiblížit problematiku výskytu polymorfismu v genu *MDR1* a jeho vztahu k citlivosti na určitá léčiva. Práce je zaměřena na membránový transportér P-glykoprotein, protein kódovaný genem *MDR1*, jehož nefunkčnost je způsobena právě delecí čtyř nukleotidů a následným posunem čtecího rámce a vytvořením předčasného stop kodonu, jež má za následek produkci nefunkčního proteinu. Dále se věnuje zastoupení jednotlivých genotypů v populaci u různých plemen v ČR i v zahraničí, rizikovým léčivům, a možnostem identifikace postižených jedinců pomocí metod PCR, gelové elektroforéza a fragmentační analýza. Metodická část práce je věnována právě identifikaci postižených jedinců v populaci metodou PCR a následnému vyhodnocení za pomoci fragmentační analýzy. Minimální počet vzorků od každého plemene byl stanoven na třicet. Konečný počet vyhodnocených vzorků byl 128. Vzorky izolované z krve byly odebrány na Akademii věd v Liběchově s laskavým svolením prof. Ing. Antonína Stratila, DrSc. , zatímco vzorky testované pro KCHKŠ byly odebrány na klubové výstavě v Mladé Boleslavi dne 7.11.2015 a izolovány z chlupových cibulek.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Původ psa

Pes domácí (*Canis lupus familiaris*) je nejstarší a zároveň největší domestikovaná šelma provázející člověka minimálně 14 tisíc let. První fosilní nálezy ostatků podobných psovitém šelmám pochází ze Sibíře - stáří asi 33 000 let. Domestikace psa započala v době, kdy lidstvo vedlo kočovný lovecko-sběrný způsob života. Předpokládáme, že se jedná o zdomácnělého vlka obecného (*Canis lupus*), který patřil mezi dominantní predátory Severní Ameriky a Eurasie. Jako domestikační centra označujeme jihovýchodní Asii, Blízký Východ a Evropu. (FREEDMAN et al., 2014)

Byla analyzována jaderná DNA tří zástupců vlka obecného (celkem 10 milionů jednonukleotidových míst, tzv. SNP) každý z jiného teoretického domestikačního centra (viz. Obrázek 1) – Chorvatsko (Evropa), Izrael (Blízký Východ), Čína (východní/jihovýchodní Asie), dvou prastarých linií psa – Basenji (Afrika) a Dingo (Austrálie), jednoho zástupce moderního psa (boxer) a DNA šakala obecného (*Canis aureus*).



Obrázek 1 Teoretická domestikační centra psa (FREEDMAN et al., 2013)

Výsledky analýzy ukázaly, že u vlka i psa došlo v minulosti k efektu zvanému bottleneck (zmenšení populace). (FREEDMAN et al., 2013)

Pes a vlk se liší jak velikostí bottlenecku, tak i dobou, kdy údajně nastal. U vlka proběhl bottleneck daleko dříve a ve větším rozsahu, kdyžto u psů proběhl až během domestikace. Genový tok (křížení) probíhal v době před nebo v průběhu domestikace. Basenji a Dingo žijí v oblastech, kde se vlk běžně nevyskytuje a oba zástupci jsou navzájem odděleni geograficky – Afrika a Austrálie - přesto vidíme stopy po křížení s vlkem, z čehož lze usuzovat, že křížení proběhlo na území Asie. (LÍZAL, 2012)

Tento jev je pravděpodobně příčinou podobnosti mezi psem a současným vlkem (podobnost zřejmě není důsledkem domestikace vlka, protože bottlenecky dokazují odlišnou historii). Z tohoto můžeme usoudit, že pes vzniká vedle linií vlka, pravděpodobně domestikací společného předchůdce dnešního vlka a moderního psa. (FREEDMAN et al., 2014)

Vlk obecný (*Canis lupus*) i pes domácí (*Canis lupus familiaris*) patří do rodu *Canis*, čeledě psovitých (*Canidae*), řádu šelem (*Carnivora*), třídy savců (*Mammalia*), kmenu strunatců (*Chordata*) a říše živočichů (*Animalia*). (BIOLIB, 2009)

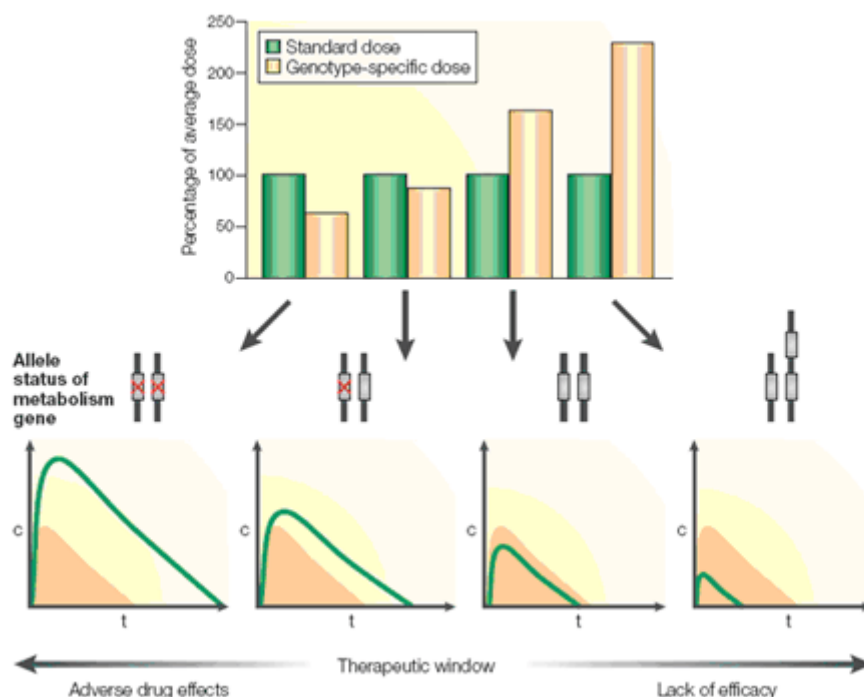
3.2 Farmakogenetika a farmakogenomika

Individualita jedince v reakci na podanou látku (lék) provází lidstvo již odnepaměti. Jedno z prvních známých farmako/nutrigenetických zjištění je připisováno Pythagorovi. Ten si povšiml, že někteří lidé jsou schopni požit favové boby bez vedlejších účinků a jiní nikoli. Podstata tohoto jevu byla objasněna až za 2400 let. (CARSON, 1956)

Farmakogenetika studuje dědičně podmíněnou variabilitu odpovědi organismu na léky, které jsou klinicky významné. Dále se zabývá procesy, které jsou spojené se vstřebáváním léků, jako je vazba na protein, přenos přes buněčnou membránu, distribuce v organismu, interakce s buněčnými receptory, biotransformace, a v neposlední řadě vylučování léčiv z organismu. Všechny tyto procesy jsou v různé míře ovlivněny genetickými faktory. (FARMAKOGENETIKA, 2016)

Synonymně se slovem farmakogenetika je používán pojem farmakogenomika, obor studující působení léků na organismus na základě genetické výbavy člověka, zejména přítomnosti genových polymorfismů u genů důležitých pro účinek léku či jeho metabolismus (viz. Obrázek 2). Na základě farmakogenomiky se podávají jen léky, které jsou u konkrétního pacienta a konkrétní nemoci účinné. V praxi se uplatňuje

především při léčbě nádorových onemocnění. Vyšetření je možné díky komerčním čipům (microarray), od r. 2005 je vyšetření k dispozici i v ČR.



Obrázek 2: Dávkování farmaka dle genotypu

Zdroj: <http://biol.lfl.cuni.cz/ucebnice/farmakogenetika.htm>

„Při standardizované léčbě pacientů se společnou diagnózou analyzuje farmakogenetika kvalitativně odlišné reakce na základě specifických genetických polymorfismů, zatímco farmakogenomika poskytuje detailnější, kvantitativní informaci o individuální reakci na léčbu pomocí genomických nebo transkriptomických profilů“ (ŠEDA a ŠEDOVÁ, 2005).

Současný technologický vývoj je jedním z hlavních důvodů rozvoje farmakogenetických metod. Ten přinesl možnost analyzovat genetické informace nejen modelových organismů, ale i člověka. Náhled a zhodnocení výstupních dat, která jsou mnohorozměrná, zajišťují bioinformatické metody s matematickým a statistickým aparátem. (THORTON-WELLS et al., 2004)

3.3 Genom a karyotyp psa

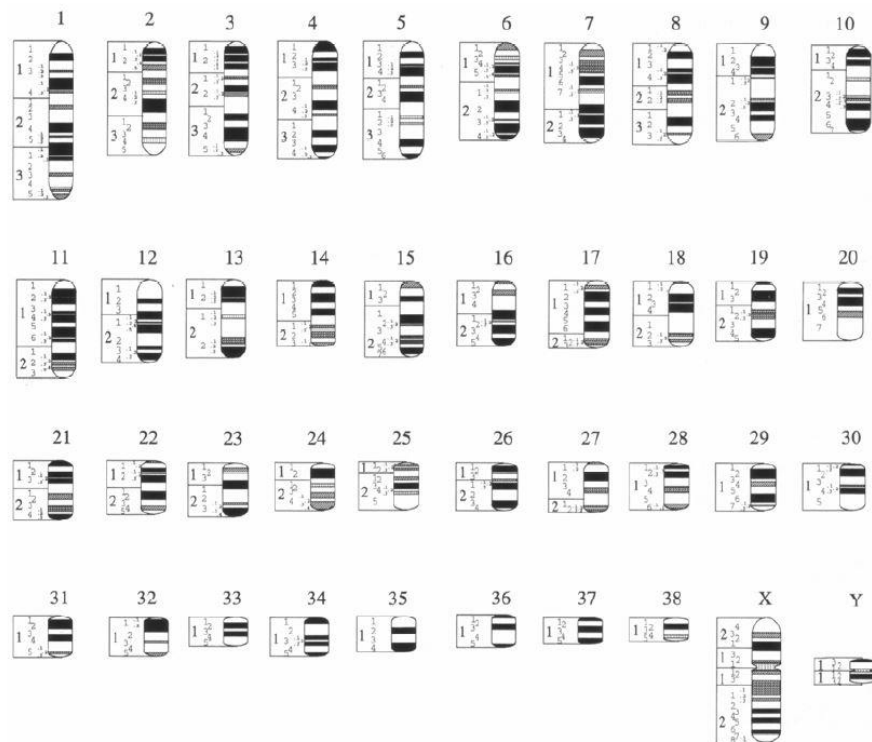
Diploidní karyotyp psa je tvořen 38 páry akrocentrických autosomů, velkým submetacentrickým chromozomem X a malým metacentrickým chromozomem Y (viz. Obrázek 3). (GUSTAVSSON, 1964)

Genom psa má délku 2,4 Gb což je méně než u člověka. Geny činí pouze 5 % z celkové DNA, větší část je nekódující. Počet genů však není pravděpodobně konečný a další studie přinesou přesnější výsledky. Genom člověka je o 18 % větší (2,9 Gb) než genom psa, zatímco genom myši je o 6 % větší (2,5 Gb), než genom psi. (KIRKNESS et al.,2003)

Pes je pátým savcem ze všech zhruba 5500 druhů savců žijících na zemi, u kterého se podařilo genom analyzovat. Pouze 0,2 % DNA je velmi konzervativní částí, která se nachází u všech živočišných druhů a nekóduje strukturu žádného proteinu. (DOSTÁL, 2007)

Předpokládané frekvence výskytu jednonukleotidových frekvencí (SNPs) kolísají v rozmezí 1 SNP na 400 – 1500 bp. (BROUILLETTE et al., 2000) a četnost SNPs již popsaných, je v přibližné shodě s odhady jejich výskytu (1 SNP/1000 – 2000 bp) v lidském genomu. (SACHIDANANDAM et al., 2001)

Podíl repetitivních sekvencí je odhadován na 31 %, což je méně než v případě lidského i myšího protějšku.(KIRKNESS et al., 2003)



Obrázek 3 Ideogram psa. (REIMANN et al.,1996)

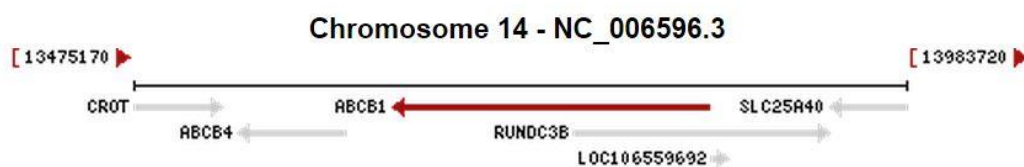
3.4 Gen *MDR1*

Název genu *MDR1* je odvozen z anglického *multi-drug resistance*. Jedná se o gen mnohočetné rezistence k lékům, kódující transportní bílkovinu P-glykoprotein (označován jako ABC transportér), který je zodpovědný za transport léčiva z mozkomíšní tekutiny do krve. P-glykoprotein je efluxní transmembránová pumpa, která má významnou roli v absorpci, distribuci a eliminaci řady léčiv a je důležitým obranným mechanismem před vstupem xenobiotik do organismu. Nadměrná exprese genu, který tento protein kóduje, často vede k rezistenci na podávanou terapii. (PECHANDOVÁ et al., 2006)

Mutace genu *MDR1* je zapříčiněna delecí čtyř párů bází ve 4. exonu. Následný posun čtecího rámce vede k vytvoření předčasného stop kodonu, tedy k ukončení syntézy P-glykoproteinu. Hematoencefalická bariéra v CNS se stává propustnou pro léčiva, což vede k otravě projevující se sliněním, zvracením, slepotou, kómatem až smrtí. (MEALEY, 2001) (GEYER et al., 2005).

3.4.1 Lokalizace genu *MDR1*

MDR1 gen je lokalizován na chromozomu 14 (viz. Obrázek 4). Celkem se skládá z 28 exonů a mutace je lokalizována v exonu 4. Značení mutace se liší podle autorů, časté je označení nt230(del4), nebo také *MDR1-1 Δ*. Defektnímu genu chybí 4 páry bází. (GEYER et al., 2005).



Obrázek 4 Lokalizace *MDR1* (*ABCB1*) genu na chromozomu 14

Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAQ63650.3>

3.5 Membránový transportér P-glykoprotein

P-glykoprotein řadíme do skupiny ABCs (ATP binding cassette's) transportérů. Tyto membránové pumpy jsou závislé na přítomnosti molekul ATP a exkretují obvykle kationty nebo neutrální hydrofobní léčiva ven z buněk. (HOOIVELD et al., 2001)

Poprvé byl izolován z ovariálních buněk lékově rezistentního čínského křečka (*Cricetulus griseus*) v roce 1976. Molekulová hmotnost P-glykoproteinu je 170 kDa a je

složen z 1279 aminokyselin, jejichž pořadí je znázorněno na Obrázek 5. (GEYER et al., 2005)

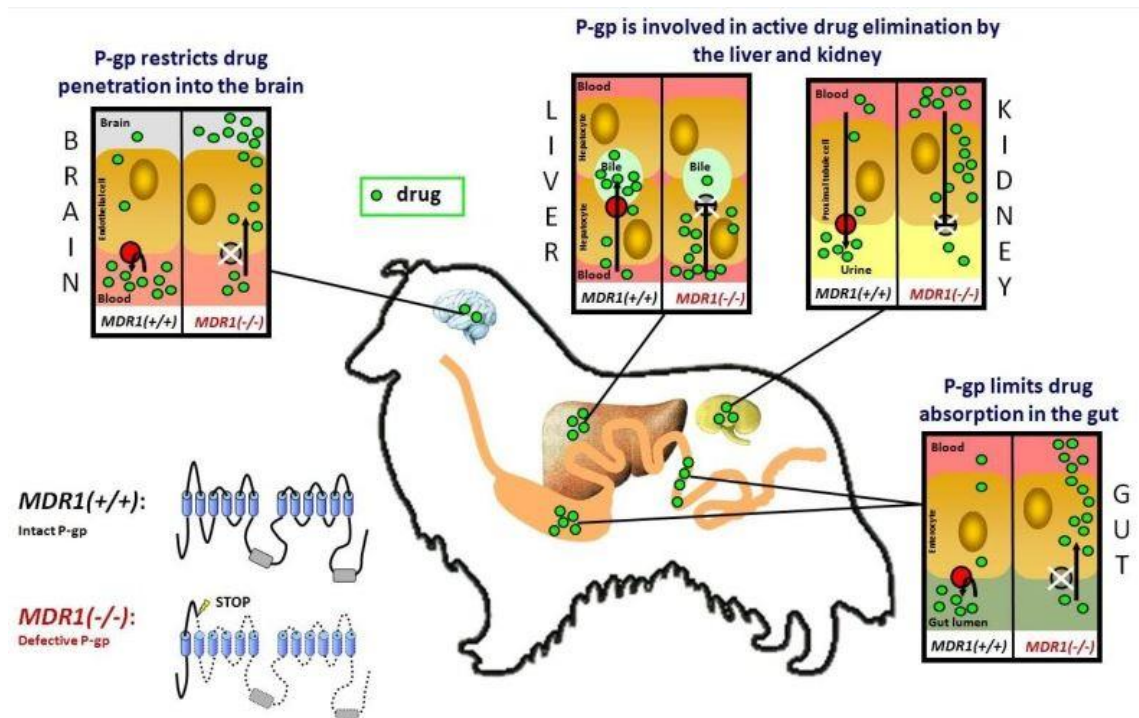
```

1 mdiegerngr lgknmyklnk rnkkekekrp tvsafamfry snwldklymv vgtlaaiihg
61 aalplmmlvf gdmtdsfsnp gnmipanitn lnmsnisase iyehleeemt tyayyytgig
121 agvlvaayiq vsfwclaagr qtfkirkqff hsimrqeigw fdvhdvgeln trltddvski
181 ndgigdkigm ffqsmstfft gfivgftrgw kltlvilais pvlgltaalw akimssftdk
241 ellayakaga vaeevlaair tviafaggqk elerynkne eakrigikka itanisvgva
301 flmyasyal afwywnhlgk lkeysigqvl tvffsvlvga fsigqaspnv eafanargaa
361 yeifriidnm psidsyseag hkpdnikgnl efrnvhsyp srkevkiikg lnkvesgqt
421 valvgnsgcg ksttvqlmrr lydptdgvvs idgqdirtnm vrylreitgv vsqepvlfat
481 tiaenvrygr edvtmdeiek avkeanaynf imklphkfdt lvgergaqls ggqkqriaia
541 ralvrnpkil lldeatsald teseavvqva ldkarkgrtt iviahrlstv rnadviafgd
601 ngvivergnh eelmrqkgyv frlvmtqtag neidlensas esrgekmdlv emsakesgss
661 lirrrsshks fhgaaggdkg lstteaqlen vppvsfwrim klnltepyf lgvicaiin
721 gglqafavv fskivgvftr ndddetkrn sdlfslfli lgiisfitff lqgftfgkag
781 eiltkrlrym vfksmlrqdv swfddpkntt galttrland aaqvkgatgs rlaviaqnia
841 nltgiiisl vygwqltlll laivpiiia gvvemkmlsg qalkdkkele gsgkiateai
901 enfrtvvslt reqkfenmya qslqpyrns lekahifgit fsftqammyf syagcfrfga
961 flvarelmsf envllvsvav vfgamavqv ssfapdyaka kisashiimi leklpkidsy
1021 steglkpgtl egnmtfkdvv fnyptrpdip vlqglnlqvk kgqtlalvgp sgcgkstvvq
1081 lierfydpla gtvlldgkev nqlnvqlra hlgivsqepi lfdcsiaeni aygdnsrvvs
1141 qdeiikaake anihafidsl pdkyntvrgd kgtqlsggqk qriaiaralv rqpfilllde
1201 atsapdtese kvvqealdka regrtcuvia hrlstiqnad mivvfqngrv kecghhql1
1261 aqkgyfsmv svqaggkrq

```

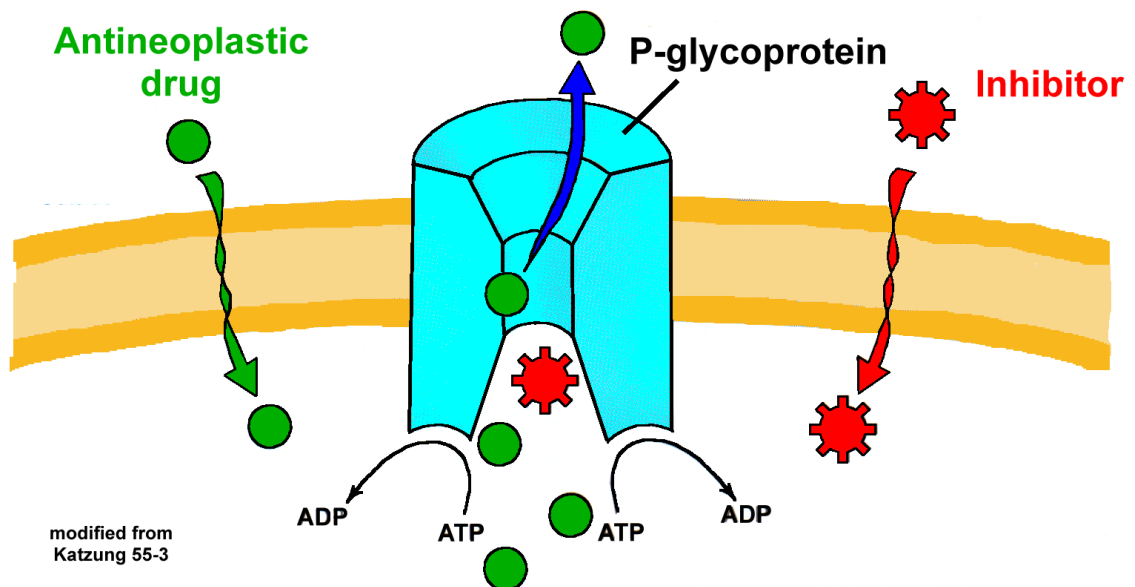
Obrázek 5: Pořadí aminokyselin v P-glykoproteinu (NCBI, 2014)

Struktura P-glykoproteinu byla objasněna v roce 2009. Transportní proteiny jsou integrální součástí buněčných membrán. Slouží k přenosu chemicky odlišných endogenních i exogenních látek. Jsou přítomny v mnoha orgánech (ledviny, játra, střeva, plíce,..) a podílejí se na aktivním transportu nejen iontů, aminokyselin, peptidů, cukrů a v neposlední řadě také léčiv a jejich metabolitů. Odbourávání léčiv z jednotlivých orgánů u zdravého a postiženého jedince je znázorněno na Obrázek 6. (ALLER et al., 2009)



Obrázek 6 Odbourávání léčiv u zdravých a postižených jedinců (SOCIETA' ITALIANA COLLIES, 2008)

Struktura P-glykoproteinu (viz. Obrázek 7) morfologicky připomíná váleček o průměru 10 nm a s výškou 8 nm. Z jedné poloviny je skryt v buněčné membráně, jejíž fosfolipidová dvojvrstva je široká asi 4nm. Strukturně tvoří P-glykoprotein vodní kanál, který je uzavřen ve směru k cytoplazmě a otevřen k extracelulárnímu prostoru. (CHIN et al., 1989)



Obrázek 7 Struktura P-glykoproteinu (LookForDiagnosis, 2016)

P-glykoprotein je předmětem studia mechanismu rezistence nádorových buněk k vysokým dávkám chemoterapeutik, což velmi komplikuje protinádorovou léčbu. Tento fenomén je označován jako „MDR“ neboli „multiple drug resistance“. Zvýšená exprese P-glykoproteinů na membránách nádorových buněk je hlavní příčinou rezistence buněk k protinádorové léčbě. Mutací dochází k zablokování tvorby P-glykoproteinu a léčivo se v mozku hromadí a způsobuje zdravotní komplikace. (LEHNE, 2000)

3.5.1 Substráty P-glykoproteinu

P-glykoprotein je typický svou interakcí s velkým množstvím látek, které se často chemicky i funkčně velmi liší. Seznam substrátů P-glykoproteinů (viz. Obrázek 8). Tyto substráty jsou přírodní látky, nebo jejich syntetické deriváty. Kromě mnoha xenobiotik a léčiv různých farmakoterapeutických skupin sem patří i endogenní hormony a jiné látky. (DOWLING et al., 2006).

Chemotherapeutics	Cardiac Drugs
Doxorubicin	Digoxin
Mitoxantrone	Diltiazem
Paclitaxel	Losartan
Vinblastine	Quinidine
Vincristine	Verapamil
Antimicrobials/Antifungals	Steroids
Doxycycline	Aldosterone
Erythromycin	Cortisol
Itraconazole	Dexamethasone
Ketoconazole	Estradiol
Rifampin	Hydrocortisone
Tetracycline	Methylprednisolone
Immunosuppressants	Miscellaneous
Cyclosporin A	Amitriptyline
Tacrolimus	Butorphanol
Antiemetics	Ivermectin
Domperidone	Morphine
Ondansetron	Moxidectin
H1-antihistamines	Phenothiazines
Fexofenadine	Phenytoin
Terfenadine	Selamectin
H2-antihistamines	
Cimetidine	
Ranitidine	

Obrázek 8: Substráty P-glykoproteinu (DOWLING et al., 2006)

3.6 Polymorfismus v genu *MDR1*

Slovo polymorfismus znamená mnohotvárnost; pochází z řeckého *polys* = mnoho, *morfe* = tvar (KUCIEL et al., 2004). Za geneticky polymorfní je považován znak s minimálně dvěma geneticky podmíněnými variantami v jedné populaci, které se nachází v nejméně 1% frekvenci. Podle objektu studia lze polymorfismus členit na: polymorfismus DNA, polymorfismus biochemický, polymorfismus morfologický a polymorfismus imunologický. (ŘEHOUT et al., 2003)

Polymorfismus můžeme rozdělit dle jeho podstaty na:

- a) bodová mutace
- b) repetitivní sekvence (minisatelitní nebo mikrosatelitní)
- c) konformační polymorfismus (SSCP, DGGE, TGGE)

(KNOLL et VYKOUKALOVÁ, 2002)

3.6.1 Bodový polymorfismus

Bodový polymorfismus je způsoben změnou v sekvenci bází. Nejčastěji se jedná o záměnu nukleotidu nebo delecii několika bází v určitém místě DNA. V praxi je tento polymorfismus detekován jako polymorfismus délky restrikčních fragmentů neboli RFLP z anglického „restriction fragment length polymorphism“. Bodový polymorfismus je označován jako SNP („single nucleotide polymorphism“). Polymorfní místo se jeví jako mendelisticky děděný gen s kodominantní dědičností a vyskytuje se s určitou frekvencí, která se v populacích může lišit. (ŘEHOUT et al., 2003)

3.6.2 Repetitivní sekvence

Jedná se o sekvence, které se v genomové DNA vyskytují v kopiích. Zvýšená pozornost je v poslední době věnována minisatelitům a mikrosatelitům. Satelity přítomné v genomu mohou v rámci populace obsahovat různý počet opakujících se bází a lišit se i v délce. Tyto varianty se také chovají jako mendelisticky děděné geny. (ŘEHOUT et al., 2003)

3.6.3 Konformační polymorfismus

Rozlišujeme polymorfismus konformace jednořetězců (SSCP) a polymorfismus konformace dvouřetězců (DSCP). Diagnostická metoda analýzy tohoto polymorfismu využívá tvorby rozdílné sekvenčně specifické struktury ssDNA (jednořetězcové DNA)

nebo ssRNA ovlivňující mobilitu jednořetězců při nenedenaturujících elektroforetických podmínkách. Metoda využívá schopnosti denaturovaných produktů PCR vytvářet duplexy DNA, pokud jsou podrobeny pomalé renaturaci. Duplexy vyznačují se úplnou komplementaritou (homoduplexy), a hybridní molekuly, jejichž řetězce se vyznačují neúplnou komplementaritou (heteroduplexy), mají v nenedenaturujících gelech rozdílné elektroforetické pohyblivosti. (ŠMARDA et al., 2008)

Praktické možnosti využití polymorfismu:

- ověřování původu
- určování paternity
- fylogenetické studie
- ontogenetické studie
- využití jako genetických markerů za předpokladu existence vazby s genem pro hospodářsky významný znak či vlastnost. (URBAN et al., 2004)

Výskyt bodových polymorfismů, neboli záměn jedné báze za jinou na specifickém místě genu (tzv. Single Nucleotide Polymorphism – SNPs), je v genu *MDR1* vysoký. V současnosti je známo více než 50 SNPs. (SAKAEDA et al., 2002)

Systematický screening polymorfismů v genu *MDR1* byl poprvé uskutečněn v roce 2000 a našel 15 různých polymorfismů. Z těchto polymorfismů 12 nemění sekvenci aminokyselin a 7 je lokalizováno v intronech. Tři polymorfismy vedou k záměně aminokyselin a mohou tak změnit funkčnost proteinu. Tyto polymorfismy se vyskytují v exonu 2(Asn21Asp), 5(Phe103Leu) a 11(Ser400Asn). Polymorfismus exonu 26 v pozici 3435(C3435T) nezpůsobuje změny v sekvenci aminokyselin, ale mění intenzitu exprese proteinu v duodenu a ovlivňuje tedy farmakokinetiku, především absorpci substrátu Pgp – digoxinu. Jeden polymorfismus se může vyskytnout zároveň s polymorfismem jiným, jedná se o tzv. haplotyp. (HOFFMEYER et al., 2000)

3.6.4 Výskyt polymorfismu genu *MDR1*

Mutace genu *MDR1* je způsobena delecí čtyř párů bází ve 4. exonu. Následný posun čtecího rámce vede k vytvoření předčasného stop kodonu, tedy k ukončení syntézy P-glykoproteinu, který je nefunkční. Hematoencefalická bariéra v CNS se stává propustnou pro léčiva, což vede k otravě projevující se sliněním, zvracením, slepotou, kómatem až smrtí. (MEALEY, 2001, GEYER, 2005).

Naprostou náhodou byl v 90. letech zjištěn vztah mezi knockoutovaným MDR u myší a substrátem P-glykoproteinu – Ivermektinem. K dispozici byly dvě skupiny myší. První skupina bez mutace v genu *MDR1*, tedy s původním typem alel (wild type) a druhá s mutací. Obě skupiny myší vypadaly na první pohled zdravě, nejevily žádné známky zdravotních potíží, byly plodné, bez anatomických abnormalit. Z toho bylo vyvozeno, že P-glykoprotein není pro organismus nezbytný. Obě skupiny byly napadeny parazity, a proto byl použit přípravek ivermectin. První skupina myší nejevila žádné známky zdravotních problémů, kdežto všechny myši MDR knockoutované byly nalezeny mrtvé, s koncentrací Ivermektinu v mozku stokrát vyšší, než byla u myší s divokým typem alel. (DOWLING et al., 2006)

U kolií byl „fenomén Ivermektinové toxicity“ poprvé popsán v roce 1983 (PRESTON, 1983). Neurologická toxicita byla popsána u některých kolií v dávkách, které jsou minimální ve srovnání s dávkami běžně užívanými u jiných plemen psů. I přes urputnou snahu mezi léty 1980 a 1990, se nepodařilo objasnit příčinu tohoto fenoménu. (PAUL et al., 1987)

V posledních letech byla tato mutace podrobněji popsána u kolií, u kterých se v genu *MDR1* vyskytuje delece čtyř bází, dochází k posunu čtecího rámce a předčasné produkci stop kodonu, což má za následek syntézu nefunkční transportní bílkoviny P-glykoproteinu. (MEALEY et al., 2001).

V Německu byla provedena analýza celkem 6544 genotypů. Více než polovina z celkového počtu vzorků byla odebrána koliím a australským ovčákům. Mutace genu *MDR1* byla detekována u 9 plemen (Collie, Longhaired Whippet, Shetland Sheepdog, Miniature Australian Shepherd, Australian Shepherd, Wäller, White Swiss Shepherd, Old English Sheepdog, and Border Collie) i kříženců (viz. Tabulka 1).

Tabulka 1: Výsledky studie genotypů 6544 psů (GRAMER et al., 2011)

Dog breed	No. of dogs, Σ6544	Allelic frequency (%) <i>MDRI</i> (-)	Genotype (%)		
			<i>MDRI</i> (+/+)	<i>MDRI</i> (+/-)	<i>MDRI</i> (-/-)
Collie ^a	2227	59	19	45	36
Longhaired Whippet	20	45	25	60	15
Shetland Sheepdog	960	30	49	43	8
Miniature Australian Shepherd	72	24	54	43	3
Australian Shepherd	1908	22	62	32	6
Wäller	110	17	65	35	0
White Swiss Shepherd	274	14	75	23	2
Old English Sheepdog	67	4	92	8	0
Border Collie	527	1	98.7	0.9	0.4
Herding breed mix ^b	261	8	86	12	2
Mixed breed ^c	118	2	97	3	0

a Psi klasifikovani jako americké kolie

b Kříženci, jejichž matka nebo otec byly plemene kolie nebo border kolie

c Kříženci neznámých rodičů

Frekvence výskytu mutace se výrazně liší v různých zemích světa a u různých plemen psů. Analýza provedená v Německu potvrdila, že u 81 % kolií a 75 % vipetů byla prokázána alespoň jedna mutovaná alela tzv. heterozygotního genotypu *MDRI* (+/-) nebo mutované alely obě tzv. homozygotního genotypu (-/-).

Frekvence výskytu u šeltií byla 51 %, u miniaturních australských ovčáků 46 % a u australských ovčáků 38 %. U border kolií a bílých švýcarských ovčáků se genotyp (-/-) objevil vzácně. (GRAMER et al., 2011)

Shrnutí výsledků z předešlých studií provedených po celém světě je znázorněno v Tabulka 2. Frekvence alel se celosvětově velmi liší a kolísá od 1 % (n=42) v Japonsku, 7 % (n=448) v USA a 36 % (n=49) ve Velké Británii.

Tabulka 2 Shrnutí výsledků studií z celého světa (GRAMER et al., 2011)

		US ^c	US ^a	Germany ^e	UK ^b	France ^f	Japan ^d	Germany ^g	UK ^a	North-west US ^h	Australia ⁱ
Collie	MDRI(+/+)	22.6%	26.0%	23.9%	7.1%	20.0%	25.0%	50.0%	14.9%	22.5%	12.1%
	MDRI(+/-)	42.0%	46.0%	43.1%	40.5%	32.0%	33.3%	50.0%	51.1%	42.5%	63.6%
	MDRI(-/-)	35.4%	28.0%	33.0%	52.4%	48.0%	41.7%	0%	34.0%	35.0%	24.3%
	n	1424	161	578	42	25	12	14	94	40	33
	AF	56%	51%	55%	73%	64%	58%	25%	60%	56%	56%
Shetland Sheepdog	MDRI(+/+)	88.2%	84.2%	45.7%	40.8%		97.6%	33.3%			57.1%
	MDRI(+/-)	10.5%	14.7%	48.6%	47.0%		2.4%	0%			42.9%
	MDRI(-/-)	1.3%	1.1%	5.7%	12.2%		0%	66.7%			0%
	n	448	190	140	49		42	3			7
	AF	7%	8%	30%	36%		1%	67%			21%
Australian Shepherd	MDRI(+/+)	53.0%	68.5%	67.9%	32.1%		44.4%	33.3%			35.7%
	MDRI(+/-)	37.0%	29.8%	25.2%	42.9%		44.4%	66.7%			42.8%
	MDRI(-/-)	10.0%	1.7%	6.9%	25.0%		11.2%	0%			21.5%
	n	1421	178	333	28		9	3			14
	AF	29%	17%	20%	46%		33%	33%			43%
Border Collie	MDRI(+/+)	98.4%	100.0%	99.1%	95.3%			87.5%			
	MDRI(+/-)	1.3%	0%	0.6%	4.7%			12.5%			
	MDRI(-/-)	0.3%	0%	0.3%	0%			0%			
	n	306	222	334	43			8			
	AF	1%	0%	1%	2%			6%			
Old English Sheepdog	MDRI(+/+)	97.5%	92.7%	87.5%	78.8%						
	MDRI(+/-)	2.5%	7.3%	12.5%	21.2%						
	n	40	151	24	33						
	AF	1%	4%	6%	11%						
	Australian Shepherd Miniature	MDRI(+/+)	63.1%	51.8%							
MDRI(+/-)		33.7%	44.6%								
MDRI(-/-)		3.2%	3.6%								
n		285	56								
AF		20%	26%								
Longhaired Whippet	MDRI(+/+)	41.7%	32.6%								
	MDRI(+/-)	58.3%	51.7%								
	MDRI(-/-)	0%	15.7%								
	n	24	89								
	AF	29%	42%								
McNab	MDRI(+/+)		68.6%								
	MDRI(+/-)		28.6%								
	MDRI(-/-)		2.8%								
	n		35								
	AF		17%								
Silken Windhound	MDRI(+/+)	68.8%	65.5%								
	MDRI(+/-)	31.2%	33.3%								
	MDRI(-/-)	0%	1.2%								
	n	16	84								
	AF	16%	18%								
German Shepherd	MDRI(+/+)	89.8%	100.0%								
	MDRI(+/-)	8.4%	0%								
	MDRI(-/-)	1.8%	0%								
	n	166	95								
	AF	6%	0%								
English Shepherd	MDRI(+/+)	100.0%	85.7%								
	MDRI(+/-)	0%	14.3%								
	n	28	91								
	AF	0%	7%								
	Wäller	MDRI(+/+)			62.9%						
MDRI(+/-)				37.1%							
n				62							
AF				19%							

Mutantní varianta genu byla nalezena ve všech zeměpisných oblastech u obou plemen psů (australský ovčák i kolie). Frekvence výskytu mutovaných alel u australských ovčáků a šeltiů jsou v Austrálii podstatně vyšší, než u stejných studií provedených v USA. (NEFF et al., 2004)

Studie provedená v USA ukázala, že přecitlivělost na Ivermektin je poměrně častá, dominantních homozygotů bylo v testované populaci 22,6 %, heterozygotních jedinců 42 % a recesivních homozygotů 35,4 %. (MEALEY et al., 2002).

Výsledky studie provedené v Austrálii jsou odlišné, 12 % populace je homozygotní pro normální alelu, 64 % heterozygotních jedinců a 24 % testované populace je homozygotních pro alelu mutovanou. Výsledky studií provedených v Austrálii a USA

se významně lišily. Například frekvence alely mutované u plemene australský ovčák v USA (178 psů), byla 17 %, zatímco v Austrálii dokonce 69 %. Podobné výsledky jsou hlášeny u plemene šeltie (190 psů) v USA 8,4 % a v Austrálii 43 %. Díky těmto výsledkům byly značně pozměněny léčebné metody u ovčáckých psů v Austrálii. (MEALEY, 2005)

3.7 Model dědičnosti mutace v genu *MDR1*

Dědičnost mutace v genu *MDR1* je autosomálně recesivní, postižený jedinec je tedy recesivní homozygot (aa), který od obou rodičů zdědil recesivní defektní alelu (a). Heterozygotní jedinec (Aa) je zdravý, ale je zde riziko předání recesivní alely potomkům. Dominantní homozygot (AA) je zdravý a nehrozí zde žádné riziko přenosu defektní alely na potomky. Postižení jedinci jsou v běžné praxi označováni jako „affected“ nebo také -/-, přenašeči jako „carrier“ nebo +/- a zdraví, normální jedinci jako „normal“ nebo +/+. (LABOKLIN, 2007)

V tomto systému je obecně delece označována jako minus. Označení vychází z toho, že delece znamená „vypuštění / vymazání“ části genu (v případě *MDR1* chybí 4 páry bází), proto je pro deleci zvolen symbol „-“ minus. (GEYER et al., 2005a)

Tabulka 3: Kombinace různých genotypů genu *MDR1* a výsledky křížení

Otec / matka	Zdravý (aa;+/+)	Přenašeč (aa;+/-)	Postižený (aa;-/-)
Zdravý (aa;+/+)	100% AA	50 % AA 50 % Aa	100% Aa
Přenašeč (aa;+/-)	50 % AA 50 % Aa	25 % AA 50 % Aa 25 % aa	50 % Aa 50 % aa
Postižený (aa;-/-)	100% Aa	50 % Aa 50 % aa	100% aa

3.8 Problémová léčiva a charakteristika jejich působení

Nepřiměřená reakce organismu je typická pro léčiva, jež jsou substráty P-glykoproteinu. Jedná se o přírodní látky nebo jejich syntetické deriváty. (DOWLING et al., 2006)

Léčiva způsobující nepřiměřené reakce organismu psů jsou nejčastěji odvozena od avermektinů. Avermektiny jsou fermentované produkty aktinomycet rodu *Streptomyces avermitilis*. Na základě chemické struktury jsou tato léčiva řazena do skupiny makrocyclických laktonů. Avermektiny působí povrchově proti členovcům a vnitřně proti

nematodům. Nejsou však účinné proti tasemnicím a motolicím. (DUCHÁČEK a LAMKA, 2014)

Avermektiny působí na specifické receptory střední části těla parazita a blokují jím vyloučené proteiny, které parazita chrání před působením imunitního systému hostitele. Avermektin tedy zajistí zničení parazita imunitním systémem hostitele. (DUCHÁČEK a LAMKA, 2014)

„Avermektiny interferují s přenosem nervových impulsů u parazita zvýšeným uvolňováním inhibičního neurotransmiteru kyseliny 17 gama-aminomáselné (GABA) z presynaptických nervových zakončení a zvýšeným vázáním na postsynaptické receptory. To vede k otevření postsynaptických chloridových kanálů, které způsobují hyperpolarizaci neuronů a potlačení funkce neuronů. Mohou také působit na chloridové kanály nezávisle na GABA receptorech. U bezobratlých, u kterých se GABA receptory nacházejí v periferním nervovém systému, to způsobuje paralýzu, dysfunkci nervových buněk a smrt parazita. U savců, kde se GABA receptory nacházejí pouze v CNS, by výsledkem nadměrného uvolnění GABA a její postsynaptické vazby byla difuzní porucha funkce mozečku a kůry mozkové. Avšak u savců avermektiny neprostupují snadno hematoencefalickou bariérou. Bezpečnost Ivermektinu pro savce závisí na aktivitě P-glykoproteinu v hematoencefalické bariéře. P-glykoprotein transportuje makrocyclické laktony, mezi které patří i Ivermektin, ven z buněk CNS a zvířata s defektními hladinami P-glykoproteinu v hematoencefalické bariéře jsou citlivá na toxicitu makrocyclických laktonů“ (BUŠ, 2005).

3.8.1 Ivermektin

Ivermektin je širokospektrální antiparazitikum, které se hojně využívá ve veterinární medicíně proti nematodům a antropodům. Nejčastěji se aplikuje u skotu, koní, ovcí, koz a prasat. Použití u psů je preventivní, při podezření na srdeční červivost a je podáváno v minimální dávce s dostatečným časovým odstupem a pouze v USA. Pro použití u psů není v ČR lék schválen. I přes tento fakt se u nás vyskytují léčiva, která Ivermektin obsahují a jsou primárně určena k léčbě kožních parazitálních infekcí. (BUŠ, 2005)

Psi s mutací v genu *MDR1*, kterým byla orálně podána dávka 120-150 µg/kg hmotnosti, vykazují známky toxicity – ataxie, ospalost, rozšíření zornic, slinění a svalový třes (GEYER et al., 2005). U kolíí způsobuje nežádoucí reakce už i dávka 50-

100 µg/kg živé hmotnosti (BUŠ, 2005). Přehled nejčastějších problémových léčiv je uveden v Tabulka 4.

Tabulka 4: Přehled nejpoužívanějších veterinárních léčiv

	Účinná látka	Účinek	Veterinární léčivo
Nikdy nepodávat psům s <i>MDR1</i> mutací	Ivermektin	Antiparazitika	Ivomec®, Eqmimax®
	Doramektin		Dectomax®
	Moxidektin		Equest®
	Loperamid	Antidiarhotika	Imodium®
Podání možné pod dohledem veterináře	Acepromazin	Sedativa	Sedalin
		Opiáty	Morfium
Podání možné v předepsaných dávkách			Stronghold®, Advocate®

3.9 Metody detekce polymorfismu genu *MDR1*

Detekce polymorfismu je založena na rozlišení mutované alely od alely původní (wild type). Nejčastěji je polymorfismus detekován u plemen kolie, šeltie, australský ovčák a staroanglický ovčák.

Základní metoda detekce polymorfismu je amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR) a následné vyhodnocení na základě gelové elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (6,5 %). Další metoda podle (KLINTZSCH, 2010) je založena na principu detekce mutace za pomoci amplifikace specifickými primery a real-time PCR, která je založena na metodě TaqMan® alelické diskriminaci. V ČR nabízí komerční testování firma Genomia a detekce je prováděna fragmentační analýzou.

3.10 Polymerázová řetězcová reakce

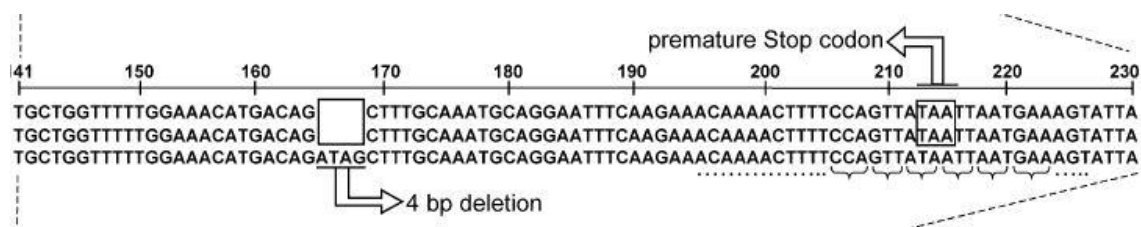
Polymerázová řetězcová reakce (PCR, z angl. Polymerase Chain Reaction) je založena na amplifikaci DNA in vitro. Jedná se o poměrně rychlou základní metodu sloužící k získání dostatečného množství specifických kopií DNA. Pro použití PCR je nutné znát pořadí bází na začátku i konci sekvenci DNA, aby bylo možné syntetizovat komplementární oligonukleotidy. (SNUSTAD a SIMMONS, 2009)

Uměle syntetizované oligonukleotidy slouží jako primery pro syntézu komplementárního řetězce DNA. Při syntéze vzniká z jednořetězcové molekuly dvouřetězcová, která je následnou denaturací separována na dvě jednořetězcové, které jsou v dalším kroku opět doplněny na dvouřetězcovou. Při PCR se tyto kroky cyklicky opakují a umožňují postupně denuraci, vznik jednořetězcových molekul DNA, nasedání primerů, syntézu DNA a vznik dvouvláknové molekuly DNA.

3.11 Metody PCR pro detekci *MDR1* mutace

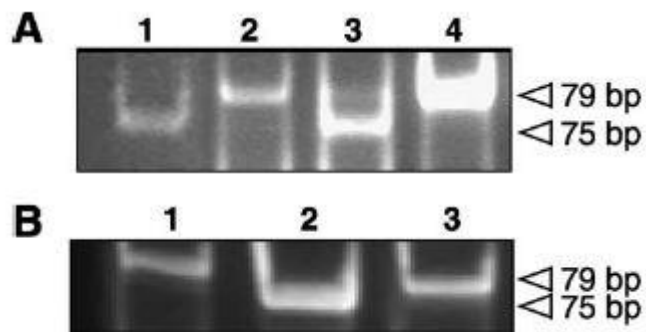
3.11.1 Zjištění přítomnosti mutované alely za pomoci polymerázové řetězcové reakce (PCR) a gelové elektroforézy (ELFO)

(ROULET, 2003) uvádí, že genomická DNA byla purifikována za pomoci QuiAMP DNA mini kitu (Qiagen, France). Specifické primery byly navrženy tak, aby amplifikovaly PCR fragmenty a znázornily místo delece (viz. Obrázek 9) nukleotidů u senzitivních kolí. Reakční směs obsahovala přímý primer (F 5'–CCTCTCATGATGCTGGT–3') a zpětný primer (R 5'–TGAAATTCCTGCATTTGCA–3').



Obrázek 9 Znázornění původní (wild type) a deletované alely (ROULET et al., 2003)

PCR amplifikace proběhla celkem ve 30 cyklech (95 C/30 s; 60 C/45 s; 72 C/30 s). Z analýzy byl vyhodnocen původní typ alely o délce 79bp a mutovaná alela o délce 75bp (viz. Obrázek 10). DNA fragmenty byly vyhodnoceny pomocí gelové elektroforézy (12% gel, pufr TBE) a zobrazeny prostřednictvím Geldoc UV transluminátoru. (ROULET et al., 2003)



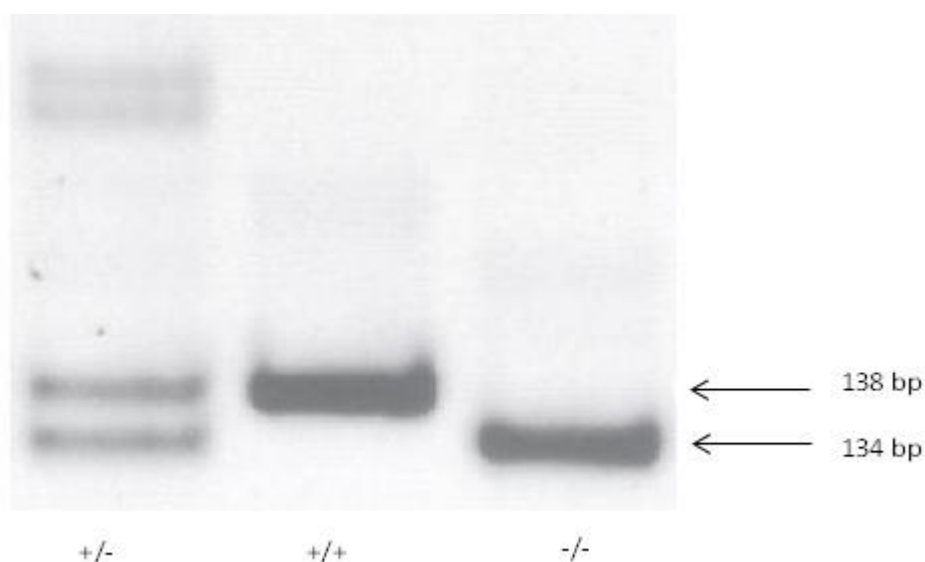
Obrázek 10 Znáznornění původní a deletované alely pomocí gelové elektroforézy (ROULET et al., 2003)

Obdobnou metodiku uvádí i (GEYER et al., 2005b). Genomová DNA byla izolována z krve pomocí kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Německo). Reakční směs obsahovala přímý primer (F 5'-ATT GGC TTG ATA GGT TGT ATA TG-3') a zpětný primer (R 5'-AAG TTT TGT TTC TTG AAA TTC CTG-3'). PCR proběhla v termocykleru za následujících podmínek: denaturace proběhla při teplotě 94 °C po dobu 2 minut. Annealing se opakoval, v 10 cyklech se teplota nejdříve zvýšila na 95 °C, poté se udržovala na 55 °C po dobu 15 sekund a v každém z těchto 10 cyklů se teplota snižovala o 0,5 °C, následovalo dalších 22 cyklů, teplota se opět zvýšila na 95 °C po dobu 15 sekund a poté snížila na 50 °C po dobu 15 sekund. Následovalo ještě zvýšení teploty na 72 °C po dobu 10 sekund a v každém cyklu se prodlužovala doba o 5 sekund. Konečná elongace proběhla při teplotě 72 °C po dobu 10 minut. (GEYER et al., 2005).

Z analýzy byla vyhodnocena původní alela o délce 138 bp a mutovaná alela o délce 134 bp. Restrikční enzymy bohužel nerozpoznaly místo v amplifikované sekvenci. Rozdíl mezi fragmenty (viz. Obrázek 12) byl viditelný na gelové elektroforéze (polyakrylamidový gel; 6,5%), ze které byla detekována homozygotní (-/-) a heterozygotní (+/-) mutace. (GEYER et al., 2005b).

MDR1_F		ATTGGCTTGATAGGTTGTATATG
MDR1_wt	1	ATTGGCTTGATAGGTTGTATATGTTGGTGGGGACAATGGCTGCCATCATCCATGG
MDR1_del4	1	ATTGGCTTGATAGGTTGTATATGTTGGTGGGGACAATGGCTGCCATCATCCATGG
consensus	1	*****
MDR1_wt	56	AGCTGCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCA
MDR1_del4	56	AGCTGCACTCCCTCTCATGATGCTGGTTTTTGGAAACATGACAG----CTTTGCA
consensus	56	*****.....*****
MDR1_R		CAGGAATTTCAAGAAACAAACTT
MDR1_wt	111	AATGCAGGAATTTCAAGAAACAAACTT
MDR1_del4	107	AATGCAGGAATTTCAAGAAACAAACTT
consensus	111	*****

Obrázek 11 Znárodnění rozdílů v sekvenci původní a mutované alely (GEYER et al., 2005b)

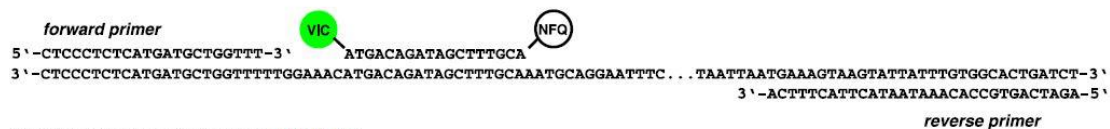


Obrázek 12 Výsledky gelové elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (GEYER et al., 2005b)

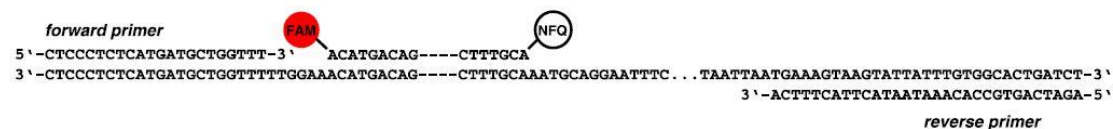
3.11.2 Metoda TaqMan® alelické diskriminace pomocí real-time PCR

(KLINTZSCH, 2010) provedl testování pomocí real-time PCR. Krevní vzorky byly odebrány celkem od 62 psů 25 různých plemen. Genomová DNA byla izolována z krve. Obrázek 14 znázorňuje specifický přímý primer vybraný z exonu 4 (F 5'-ATT GGC TTG ATA GGT TGT ATA TG-3') a zpětný z intronu 4 (R 5'-AAG TTT TGT TTC TTG AAA TTC CTG-3'). Následně proběhla amplifikace pomocí PCR. Z analýzy byl vyhodnocen původní typ alely o délce 138 bp a mutovaná alela o délce 134 bp (viz. Obrázek 14). Fragmenty byly rozlišeny elektroforézou na agarosovém gelu (6,5%).

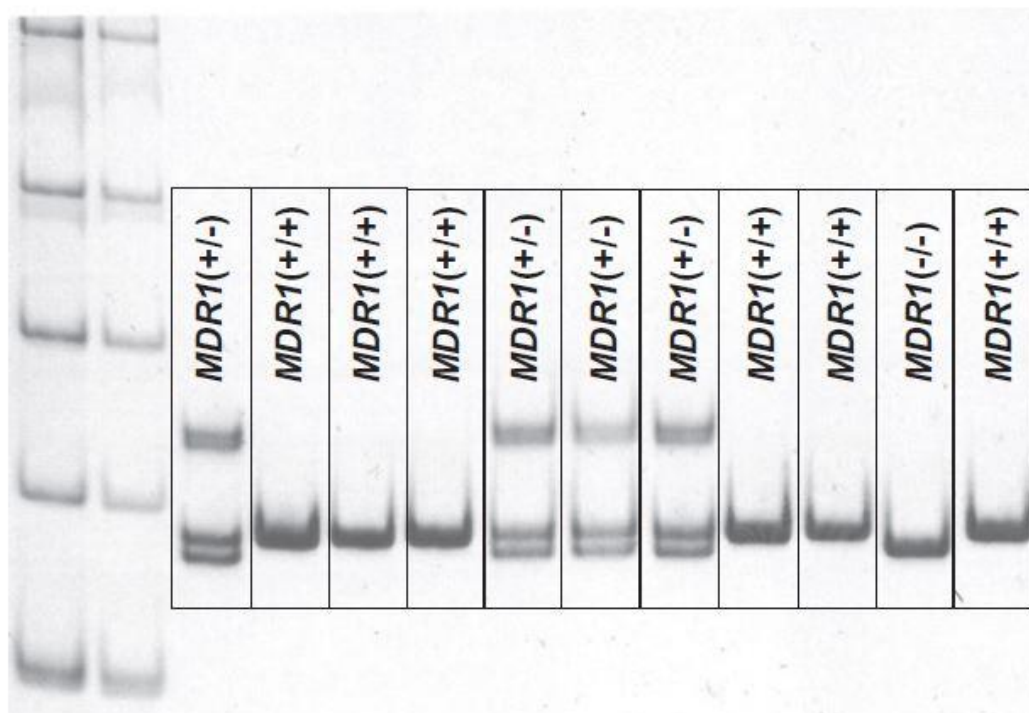
normal allele *MDR1*(+)



nt230[del4] mutant allele *MDR1*(-)



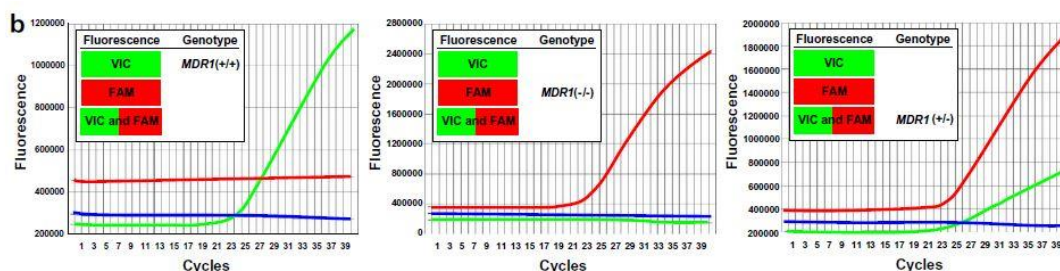
Obrázek 13 Znárodnění sekvence navrženého přímého a zpětného primeru (KLINTZSCH et al., 2010)



Obrázek 14 Výsledky gelové elektroforézy (KLINTZSCH et al., 2010)

Následně byla provedena další PCR, přímý primer byl navržen stejně jako u první reakce (F 5'-ATT GGC TTG ATA GGT TGT ATA TG-3') a zpětný primer byl odvozen od intronu čtvrté sekvence genu *MDR1* (R 5'-CAA GGT CTA GAT AAG GTG GTT C-3') pro získání 449bp. Pro reakční mix alelické diskriminace byl přímý primer navržen takto (F 5'-CTC CCT CTC ATG ATG CTG GTT TT-3') a zpětný takto (R 5'-AGA TCA GTG CCA CAA ATA ATA CTT ACT TTC A-3'). Součástí reakční směsi je specifická fluorescenční oligonukleotidová TaqMan sonda (TaqMan probes, Applied Biosystems), a to VIC-5'-ATG ACA GAT AGC TTT GCA-3'-NFQ pro hybridizaci s *MDR1* normální alelou a FAM-5'-ACA TGA CAG CTT TGC A-3'-NFQ pro hybridizaci s *MDR1* mutovanou alelou. Posledním krokem byla jednokroková real-

time PCR, jejíž průběh je znázorněn na Obrázek 15. (KLINTZSCH et al., 2010).
Shrnutí výsledků analýzy pro jednotlivá plemena psů je znázorněno v Tabulka 5.



Obrázek 15 Průběh real-time PCR (KLINTZSCH et al., 2010)

Tabulka 5 Frekvence výskytu alel u jednotlivých plemen psů (KLINTZSCH et al., 2010)

Dog breed	Number of dogs	
	MDR1(+/+)	MDR1(-/-)
Australian Cattle Dog	1	0
Australian Shepherd	4	1
Beagle	4	0
Bearded Collie	1	0
Berger Blanc Suisse	1	3
Old English Sheepdog	1	0
Border Collie	4	0
Boxer	1	0
Cairn Terrier	1	0
Collie	1	9
Great Dane	1	0
German Wirehaired Pointer	1	0
Elo	1	0
Galgo Espaniol	1	0
Golden Retriever	2	0
Jack Russell Terrier	1	0
Laekenois	1	0
Lagotto Romagnolo	2	0
Podenco	1	0
Praszký Krysavik	2	0
Shar Pei	1	0
Shetland Sheepdog	1	1
Springer Spaniel	1	0
Staffordshire Bull Terrier	1	0
Wäller ^a	1	0
Crossbreed	11	0

^a plemena neuznaná FCI

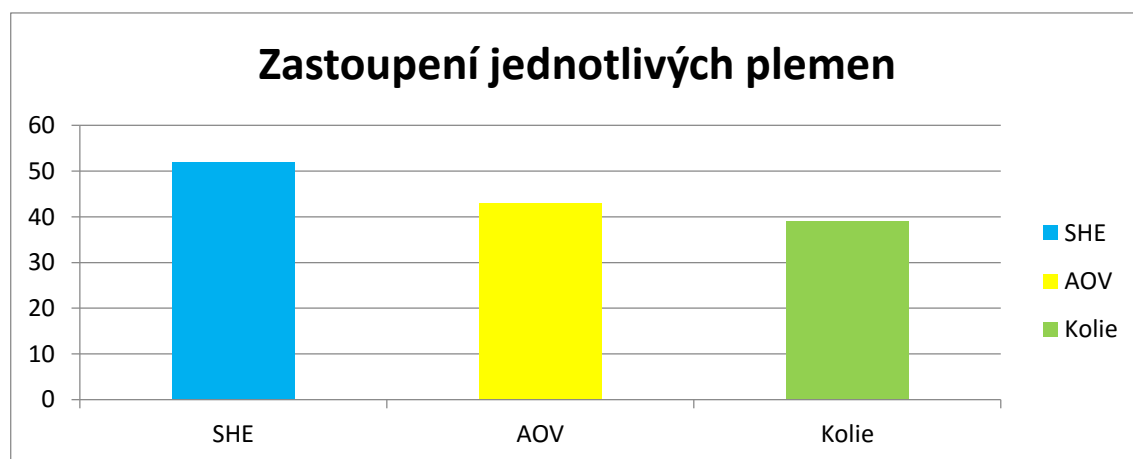
4 METODIKA

4.1 Sledovaná populace zvířat

Do sledované populace zvířat byli zařazeni jedinci plemene kolie, šeltie a australský ovčák. Do analýzy bylo zahrnuto celkem 134 vzorků, konkrétně 39 kolií, 52 šeltií, 43 australských ovčáků. 104 vzorků bylo odebráno s laskavým svolením pana prof. Ing. Antonína Stratila, DrSc. v rámci magisterské praxe na Akademii věd v Liběchově a 30 vzorků bylo odebráno v rámci klubové výstavy kolií a šeltií v Mladé Boleslavi dne 7.11.2015. Při odběru vzorků byl pro každého psa vyplněn informační dotazník a po vyhodnocení obdržel majitel výstupní zprávu s výsledky (viz. Přílohy). Do studie bylo zařazeno 58 psů, 59 fen a 17 jedinců neznámého pohlaví (viz. Tabulka 6). Tabulka 7 znázorňuje zastoupení jednotlivých plemen ve studii. Celkem 6 vzorků nebylo správně amplifikováno ani při opakovaném provádění PCR, proto bylo do studie zahrnuto pouze 128 vzorků.

Tabulka 6 Zastoupení jednotlivých pohlaví

Pohlaví	Počet vzorků
Fena	59
Pes	58
Neznámé	17
Celkem	134



Graf 1 Zastoupení jednotlivých plemen

Tabulka 7 Zastoupení jednotlivých plemen

Plemeno	Počet vzorků
SHE	52
AOV	43
Kolie	39
Celkem	134

4.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla u 104 vzorků provedena z krve pomocí GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, USA). Zbylých 30 vzorků bylo izolováno z chlupových cibulek psů pomocí Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) GB100/GB300. Po izolaci bylo provedeno stanovení koncentrace izolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), kde byla měřena koncentrace DNA a poměr absorbance 260/280, který udává čistotu izolované DNA. Dále byla provedena kontrola kvality a kvantity izolované DNA pomocí gelové elektroforézy na 2% agarosovém gelu při napětí 120V po dobu 20 minut. Izolace pomocí izolační soupravy Geneaid je založena na principu absorpce DNA na silikát. Materiál je nejdříve lyzován pomocí lyzačního pufru a enzymu proteinázy K. Buněčný lyzát se přenesse na izolační kolonu, jejíž součástí je silikátový povrch. V přítomnosti chaotropních solí adhezuje DNA na silikát. Kolonka je dále promyta roztoky a následně uvolněna pomocí elučního pufru.

4.2.1 Izolace DNA z chlupových cibulek

Potřebné vybavení a reagenty

- Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Tissue)
- Kolonka
- 2 ml zkumavka
- 1,5 ml zkumavka/ 1 vzorek
- Pufry- GT, GBT, W1, Wash, Elution
- Proteináza K
- 96-100 % ethanol
- Stojan na zkumavky

- Sada pipet a špičky
- Vortex
- Centrifuga
- Termální blok (60 °C)

Před začátkem:

- nahřát termální bloky na 60°C
- dát nahřát eluční pufr (Elution buffer) na 60°C

4.2.1.1 Postup při izolaci DNA z chlupových cibulek

1. Do 1,5 ml eppendorfovy zkumavky nastříháme alespoň 20 chlupových cibulek. Chlupová cibulka je umístěna na dně zkumavky.
2. Přidáme 20 µl Geneaid proteinázy K.
3. Přidáme 300 µl GT pufru, lehce promícháme špičkou pipety a roztok propipetujeme (chlupy nevortexujeme). Inkubujeme při 60 °C nejméně 3 hodiny (ideálně přes noc). Během inkubace občas vortexujeme.
4. Přidáme 300 µl pufru GBT, vortexujeme a vložíme na 20 min do termostatu na 60 °C. V termostatu zahřejeme i eluční pufr. Vzorek přibližně 1 minutu zchladíme při pokojové teplotě a přidáme 200 µl ethanolu, vortexujeme.
5. Připravíme si 2ml centrifugační zkumavky, do kterých vložíme kolonky, které zachytí DNA na křemičité membráně. Do kolonky přepipetujeme celý objem tekutiny a centrifugujeme při 13.000 rpm/1,5 minuty.
6. Kolonku umístíme do čisté 2ml zkumavky a spodní zkumavku obsahující filtrát vyhodíme. Přidáme 400 µl pufru W1, centrifugujeme při 13.000/1,5 minuty.
7. Slijeme odfiltrovanou tekutinu a kolonku opět vložíme do centrifugační zkumavky a centrifugujeme prázdnou kolonku. Přidáme 600 µl Wash pufru W1, centrifugujeme při 13.000 rpm/1,5 minuty.
8. Opět slijeme odfiltrovanou tekutinu a kolonku vložíme do centrifugační zkumavky a centrifugujeme prázdnou kolonu bez přidání pufrů při 13.000 rpm 1,5 minuty.
9. Spodní zkumavky vyhodíme a kolonku vložíme do čisté a popsané 1,5ml eppendorfovy zkumavky. Přidáme 50 µl elučního pufru vytemperovaného na 69 °C. Pufr aplikujeme přímo do středu kolonky, abychom zajistili kontakt

celé křemičité membrány s pufrům a důkladné eluování DNA z membrány. Eluční pufr necháme inkubovat s membránou kolonky 5 minut při pokojové teplotě, centrifugujeme při 8.000 rpm/1 minutu.

10. Kolonku vyhodíme a zkumavku s izolátem uchováváme při -20°C k dalším analýzám.

4.2.2 Izolace DNA z krve

Potřebné vybavení a reagentie:

- GeneElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit
- Kolona a 2 ml zkumavky
- Pufry – Lysis Solution T (LS-T), Lysis Solution C (LS-C), Column Praparation Solution (CPS), Wash Solution (WS), Elution Solution (ES)
- Proteináza K (20 mg/ml)
- 96-100 % ethanol
- Stojan na zkumavky
- 1,5 ml zkumavka/ 1 vzorek
- Sada pipet a špičky
- Vortex
- Centrifuga
- Termální bloky (55 °C a 70 °C)

Před začátkem:

- Nahřát termální bloky
- Do stojanu nachystat kolonu vloženou do centrifugační zkumavky a 1 čistou 2 ml zkumavku

4.2.2.1 Postup izolace DNA z krve

1. K 200 μ l krve v 1,5 ml zkumavce přidáme 200 μ l pufru LS-C a 20 μ l proteinázy K, vortexujeme 15sekund.
2. Inkubujeme 10 minut při 55 °C.
3. Do připravené kolony napipetujeme 500 μ l pufru CPS, centrifugujeme při 13.000 rpm/1 min. Vydáme kolonu odpad z centrifugační zkumavky vylijeme, kolonu vrátíme zpět.

4. K lyzátu přidáme 200 μ l ethanolu, vortexujeme 5-10 sekund.
5. Směs získanou v kroku 4 aplikujeme do připravené kolony, centrifugujeme při 8200 rpm/ 1 min.
6. Vyjmeme kolonu a odpad vylijeme, kolonu vrátíme zpět a napipetujeme do ní 500 μ l pufu WS, centrifugujeme při 8200 rpm/ 1 min.
7. Vyjmeme kolonu a vylijeme dopad, kolonu vrátíme zpět a napipetujeme do ní 500 μ l pufu WS, centrifugujeme při 8200 rpm/ 1 min.
8. Vyjmeme kolonu, odpad vylijeme, kolonu vrátíme zpět a centrifugujeme při 13.000/ 1 min.
9. Zkumavku s odpadem vyhodíme, kolonku umístíme do 2ml zkumavky, napipetujeme 100 μ l ES pufu, necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, poté centrifugujeme při 8200 rpm/ 1 min.
10. Kolonku vyhodíme a zkumavku s izolátem uchováme při -20°C k dalším analýzám.

Izolovanou DNA lze dlouhodobě uchovat při teplotě -70°C .

4.3 Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

4.3.1 Základy přípravy PCR

Ke správnému postupu PCR je nutné znát sekvenci DNA v amplifikovaném úseku. Sekvenci snadno zjistíme prostřednictvím DNA databází (GenBank, ENSEMBL) nebo sekvenováním. V dalším kroku přípravy je nutné navrhnout a objednat sekvence primerů, podle kterých se bude syntetizovat komplementární DNA. Nezbytnou součástí přípravy je výpočet a zkouška optimální teploty pro annealing (nasedání primerů) a následné navržení složení a profilu reakce. Po provedení PCR je nutná kontrola reakce pomocí gelové elektroforézy (ELFO), popřípadě purifikace reakčního produktu a sekvenování.

Průměrná účinnost PCR je odhadována na 60-85 %. Snížena může být například přítomností většího množství templátu, která zvyšuje pravděpodobnost hybridizace templátu s komplementárním řetězcem DNA, místo primeru. Dalším nežádoucím faktorem může být nespecifická hybridizace primeru s jinými sekvencemi DNA.

(KNOLL a VYKOUKALOVÁ, 2002)

4.3.2 Složení reakční směsi

- Nukleotidy-tvoří komplex s Mg^{2+} rozpoznávaný polymerázou
- Voda
- Pufr-vytváří vhodné pH pro průběh reakce
- Primery- uměle syntetizované oligonukleotidy (jeden přímý-*forward*, druhý zpětný-*reverse*)
- Polymeráza (*Taq- Thermus aquaticus*)
- DNA templát, který je substrátem reakce
- Mg^{2+} ionty, důležité pro účinnost a specifitu připojení primerů

4.3.2.1 *Taq* polymeráza

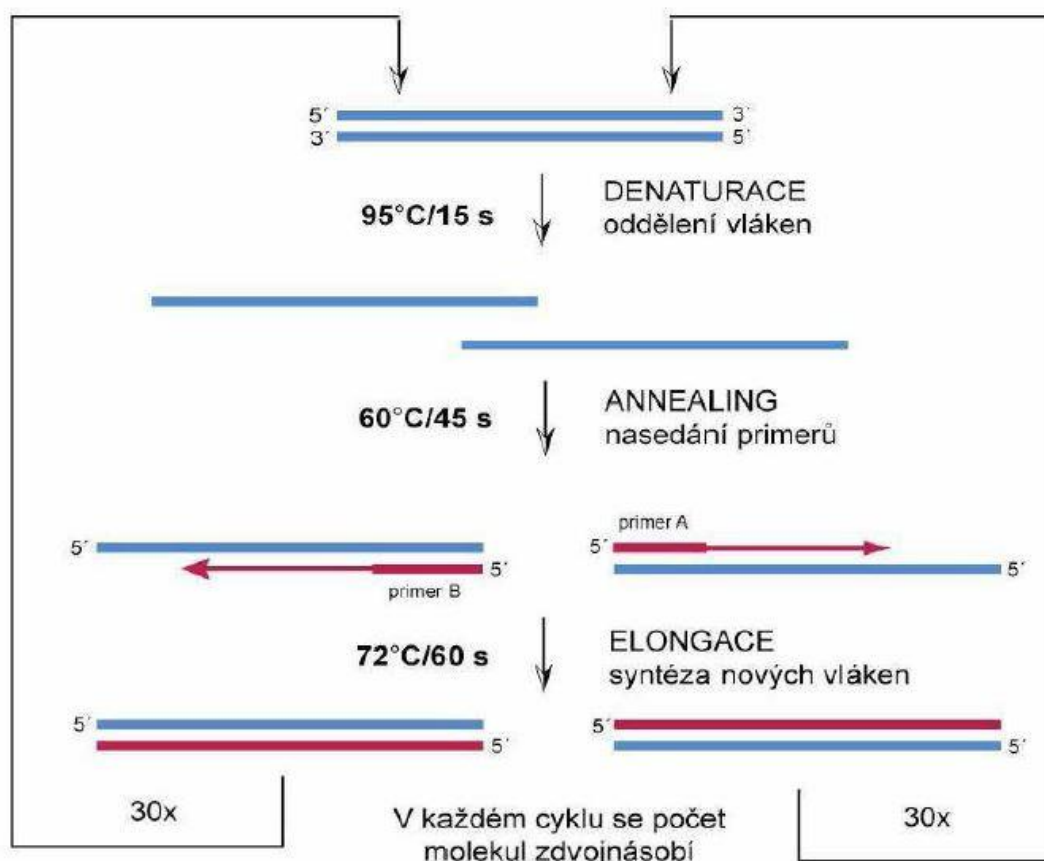
Jedná se o termostabilní polymerázu izolovanou z termofilních mikroorganismů odolných teplotám, při nichž se DNA denaturuje. Toto je podmínkou pro možné opakování syntézy DNA formou cyklů PCR reakce. (ŠMARDA et al., 2008)

Kromě *Taq* polymerázy se využívají i jiné, teplotně rezistentní polymerázy a komerčně modifikované enzymy a jejich směsi, které vykazují nižší procento tvorby chyb. (KNOLL a VYKOUKALOVÁ, 2002)

4.3.3 Průběh PCR

PCR metoda je založena na cyklickém opakování specifických teplotních profilů. Je nutné tyto kroky přesně dodržet, aby došlo k denuraci DNA, správnému nasednutí primerů a konečné syntéze DNA. Princip PCR je znázorněn na Obrázek 16.

1. Úvodní denaturace (94-96 °C; 1-15 minut) – rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a vznik ssDNA
2. Denaturace (94-96 °C; 15-60 sekund) – odvíjí se od délky amplifikovaného úseku a obsahu GC párů
3. Annealing (45-65 °C; 15-60 sekund) – nasedání primerů na specifická místa DNA, teplota je závislá na teplotě tání (T_m) primerů
4. Elongace (68-72 °C; 1-2 minuty) – syntéza DNA ve směru od 5' konce primeru komplementárně k původní molekule DNA
5. Finální extenze (68-72 °C; 5-10 minut) – konečné dosyntetizování řetězců
6. Chlazení (4 °C; ∞) – není podmínkou, možné chladit v lednici



Obrázek 16 Princip PCR (KNOLL a VYKOUKALOVÁ, 2002)

4.3.4 Výběr a návrh primerů

Primery byly navrženy ze sekvencí psích genů dostupných v elektronických databázích (Ensembl). Výběr primerů byl proveden pomocí software Oligo. Pro správný návrh primerů je nutné zohlednit délku primeru, obsah C+G bází, stabilitu a unikátnost na 3' konci, vnitřní a energetickou stabilitu a v neposlední řadě teplotu tání (T_m), vypočtenou pomocí metody termodynamických parametrů nejbližších sousedů podle (RYCHLÍK et al., 1990).

AGT **TTCGCTATTCAAATTGGCTTG** ATAGGTTGTATATGTTGGTGGGGACAATGGCT
 GCCATCATCCATGG **AGCTGCACTCCCTCTCATGAT** GCTGGTTTTTGGAAACATGAC
 AG **ATAG** CTTTGCAAATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTTTCCAGTTATAATT
 AATGAAAGTAAGTATTATT **TGTGGCACTGATCTTAGAGGTTT** GAAGAAAAATCTG
 TTAGTTAGAAGGATGTTTAGCCCTCATTAAATACATTAGTGTGTTTATTTCTGGGG
 GAAAAGGGAGGAGTCTGAGCTACAGTTAATATTGGTAATAAGTTTGAGAAGATA
 ATAATCATAAGTATTAGAATCCCACTGGAGGTCTTGGCAA

Přímý primer: a) TTC GCT ATT CAA ATT GGC TTG MDR1_del 4nt_F1
 b) AGC TGC ACT CCC TCT CAT GAT MDR1_del 4nt_F2

Zpětný primer: AAA CCT CTA AGA TCA GTG CCA CA MDR1_del 4nt_R1

Místo delece: ATAG

Obrázek 17 Sekvence PCR produktu použitého pro testování polymorfismu v genu MDR1

Pro studii byly zvoleny dva primery přímé (F1, F2) a jeden primer zpětný (R1). Sekvence navržených primeru jsou zobrazeny na Obrázek 17. Vlastnosti jednotlivých primerů jsou uvedeny v Tabulka 8. Pro testování vzorků izolovaných z krve (108 vzorků) byl zvolen přímý primer F2, který je kratší a tudíž by se měl lépe amplifikovat. Navíc se nachází v hustém zastoupení velikostních standardů. Bohužel během testování vzorků na Akademii věd zřejmě došlo ke kontaminaci tohoto primeru, což znemožnilo správné vyhodnocení výsledků. Nakonec bylo tedy všech 128 vzorků amplifikováno s primerem F1.

Tabulka 8 Vlastnosti navržených primerů

NÁZEV	POČET NT	TM (°C) OLIGO	TM (°C) ABI CALCULATOR	% GC	VELIKOST PCR	POZICE
MDR1_DEL 4NT_F1	21	52,4	58,8	38,1	206 bp	20
MDR1_DEL 4NT_F2	21	52,8	59,8	52,4	139 bp	87
MDR1_DEL 4NT_R1	23	56,7	58,8	43,5		203

4.3.5 Optimalizace PCR

Optimalizací je označován proces testování a výběru nejvhodnějších parametrů, které mohou ovlivnit reakci (tzn. složení reakční směsi, teplotní a časový průběh reakce). Optimalizaci je nutné provádět vždy, laboratorní podmínky se totiž mohou lišit. (KNOLL a VYKOUKALOVÁ, 2002)

Postup

Potřebné vybavení a reagensie

- DNA izolovaná v předchozím kroku
- PCR reagensie- PPP Master Mix
 - roztok primeru F
 - roztok primeru R
 - dH₂O
- 1 x PCR zkumavka (0,2 ml)/1 vzorek
- sada pipet + špičky
- led nebo mrazicí box
- stojan, rukavice, termální cykler

Správný teplotní režim pro annealing primerů byl vybrán testováním celkem 4 teplotních profilů v termálním cykleru PTC-200TM, MJ Research, Inc. (viz. Tabulka 9). Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulka 10. Vyhodnocení proběhlo za pomoci gelové elektroforézy na 3% agarosovém gelu (Serva) při napětí 130 V. Vizualizace byla zajištěna pomocí 2,4 µl EtBr. Reakce probíhala 20 minut. PCR produkt byl vizualizován prostřednictvím transiluminátoru a byla hodnocena jeho kvalita, výskyt nespecifických fragmentů a množství amplifikované DNA. Jako ideální teplotní profil pro nasednutí primerů byl zvolen profil číslo 4. Teplotní profil PCR je uveden v Tabulka 11.

Tabulka 9 Testované teplotní profily

Číslo teplotního profilu	Teplota
1	58 °C
2	59 °C
3	60 °C
4	61 °C

Tabulka 10 Složení reakční směsi PCR

Chemikálie	Množství (μl)
Voda	4,1
PPP mix	5
Primer F1/F2	0,2
Primer R1	0,2
DNA	0,5
Celkový objem	10

Tabulka 11 Teplotní profil PCR

KROK	TEPLOTA (°C)	ČAS
1.	94	3 min.
2.	94	30 sec.
3.	61	30 sec.
4.	72	30 sec.
5.	Go to 2	35x
6.	72	1 hod.
7.	4	∞

4.3.6 Složení reakční směsi

PCR reakční směs pro amplifikaci vzorků izolovaných z krve byla navržena a konzultována s prof. Ing. Antonínem Stratilem, DrSc. v rámci praxe na Akademii věd v Liběchově. Jako přímý primer byl zvolen F2, protože je kratší, tudíž se lépe amplifikuje a také se nachází v oblasti hustého zastoupení standardních velikostí. Celkový objem směsi byl stanoven na 15 μl (viz. Tabulka 12). Teplotní profil PCR je znázorněn v Tabulka 13.

Tabulka 12 Složení reakční směsi pro PCR

Chemikálie	Množství (μl)
Voda	4,4
PPP mix	5
Primer F2	0,3
Primer F1	0,3
DNA	5
Celkový objem	15

Tabulka 13 Teplotní profil PCR reakce

Krok	Teplota	Čas
1	94 °C	3 minuty
2	94 °C	30 sekund
3	61 °C	30 sekund
4	72 °C	30 sekund
5	Go to 2	35x
6	72 °C	1 hodina
7	4 °C	∞

PCR reakční směs pro amplifikaci vzorků izolovaných z chlupových cibulek byla navržena a konzultována s Ing. Čěnkem Horeckým. Jako přímý primer byl zvolen F1, z důvodu zřejmé kontaminace primeru F2, který byl použit na Akademii věd v Liběchově. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulka 14.

Tabulka 14 Složení reakční směsi pro PCR

Chemikálie	Množství (μl)
dH ₂ O	3,6
PPP mix	5
F1	0,2
R1	0,2
DNA	1
Celkový objem	10

4.4 Gelová elektroforéza

Elektroforéza patří k nejpoužívanějším separačním elektromigračním analytickým technikám pro izolaci a analýzu nukleových kyselin a bílkovin v molekulární biologii. Principem této metody je pohyb molekul v elektrickém poli. Nukleová kyselina v elektrickém poli putuje k opačně nabitě elektrodě díky negativně nabitě fosfátové skupině (DNA tedy putuje k anodě). Gel funguje jako trojrozměrné síto, kterým molekuly DNA migrují ke kladné anodě. (ŠMARDA et al., 2008)

Zařízení pro elektroforézu se skládá z elektroforetické vany s anodou a katodou, dále je nutný pufr, držák gelu, ve kterém dochází k separaci molekul (gel slouží jako pomyslná síť, kterou molekuly prostupují na základě své velikosti) a externího zdroj napětí. Gel se vlévá do vaničky nebo mezi skla (podle typu elektroforézy) a nechá se ztuhnout. (KNOLL a VYKOUKALOVÁ, 2002)

Rychlost pohybu molekul označujeme jako elektroforetickou pohyblivost, která je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Velikost póru v gelu závisí na jeho koncentraci, která závisí na předpokládané velikosti fragmentů DNA, které mají být děleny. Elektroforéza probíhá v příslušném pufru v elektroforetické komůrce. Pufry udržuje stálé pH i teplotu a vede elektrický proud. Vzorky se nanášejí do jamek gelu. Nanášený roztok má vyšší hustotu než voda, aby vzorky po nanesení na gel zůstaly v jamkách. Přítomné barvivo umožňuje sledovat rychlost pohybu fragmentu v gelu. Hodnocení výsledků se provádí pomocí transiluminátoru. Velikost molekuly DNA nebo jejího fragmentu lze stanovit srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul nebo fragmentů DNA o známé velikosti, které označujeme jako standardy. (ŠMARDÁ et al., 2008)

4.4.1 Vizualizace elektroforetických gelů

Vizualizace je založena na vazbě DNA na EtBr, který je přidáván přímo do gelu. Komplex EtBr-DNA při excitaci UV zářením emituje fotony, což umožňuje vizualizaci DNA. Pokud během izolace DNA dojde k jejímu poškození až rozbití, na gelu bude patrná souvislá šmouha. EtBr je silný mutagen a při práci je zapotřebí použití ochranných pomůcek. K vizualizaci se dále používá např. stříbro, autoradiografie nebo neradioaktivní značení. (KNOLL a VYKOUKALOVÁ, 2002)

4.4.2 Postup a vyhodnocení gelové elektroforézy

Potřebné vybavení a reagenty:

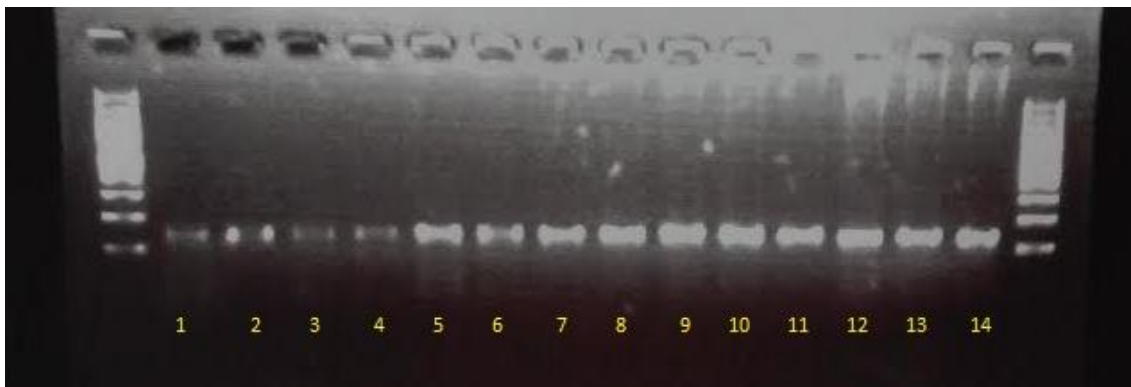
- Izolovaná DNA
- Hmotnostní standard
- Agaróza
- TBE pufr
- 100ml zkumavka
- Ethidium bromid (EtBr, 0,5mg/ml)
- Sada pipet a špičky
- Vanička na gel a hřebínek
- Nanášecí pufr
- Elektroforetická vana s anodou, katodou a pufrem
- Externí zdroj stejnosměrného napětí

Postup:

1. Připravíme 2% agarózový gel (do elektroforetického pufru přidáme agarózu, promícháme a vaříme tak dlouho, až se agaróza zcela rozpustí a roztok se stane homogenním).
2. Gel necháme ochladit na 50-60 °C, přidáme 6 µl EtBr, zamícháme a nalijeme do vaničky, umístíme hřebínek a necháme gel ztuhnout.
3. Vaničku s gelem ponoříme do elfo vany s pufrem, vytáhneme hřebínek a zkontrolujeme, zda je pufr nad povrchem gelu.
4. Do jamek postupně nanese 5 µl markeru a 3 µl vzorku.
5. K vaně připojíme zdroj stejnosměrného napětí tak, aby DNA putovala k anodě. Optimální velikost napětí je 5V/cm, doba separace 20 minut.
6. Vypneme a odpojíme zdroj od elektroforetické vany, v ochranných rukavicích vyjmeme gel a umístíme na transiluminátor.

Použita byla agaróza Agarose SERVA for DNA electrophoresis a Agarose SERVA Premium (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo). K přípravě gelu byl použit 1x TBE pufr (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, USA). Při použití PPP Master Mixu nebyl nanášecí pufr nepoužit, protože již obsahoval aditiva pro přímou vizualizaci na gelu.

Výsledky gelové elektroforéz jsou viditelné na Obrázek 18. V první jamce je viditelný hmotnostní standard (tzv. marker), v druhé až páté jamce (značeno 1-4) jsou viditelné vzorky izolované z chlupových cibulek. Nízká koncentrace DNA izolované z chlupových cibulek je pravděpodobně dána špatným skladováním biologických vzorků. Vzorky byly po vytrhnutí uloženy v řádně označených sáčcích a skladovány při pokojové teplotě, což mohlo zapříčinit degradaci DNA a tím i její malý výnos. V ostatních jamkách jsou vzorky izolované z krve (vyšší výnos). Stejným postupem bylo elektroforeticky ověřeno všech 134 vzorků. Pro ověření velikosti fragmentů byl použit marker M100 (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder).



Obrázek 18 Výsledky gelové elektroforézy

4.5 Fragmentační analýza

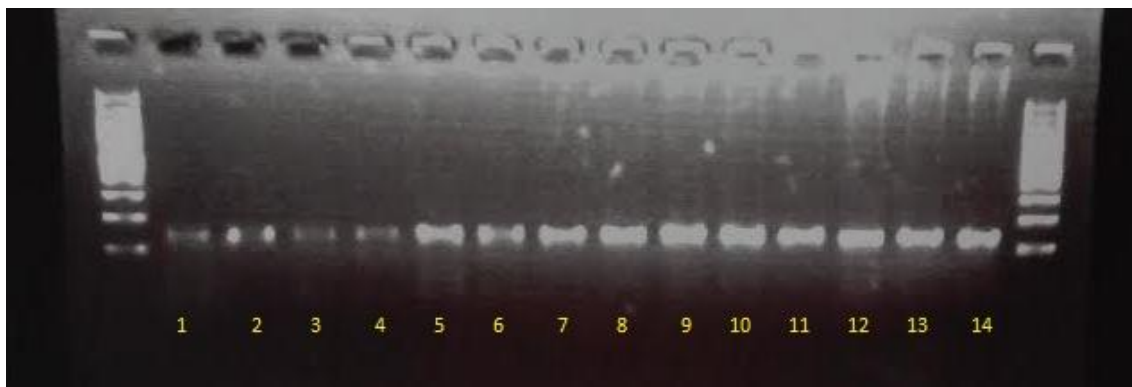
Fragmentační analýza je metoda založená na principu separace amplifikační směsi DNA podle její velikosti. Separace probíhá v lineárním hydrofilním polymeru (POP 4 polymer) v kapiláře (vnitřní průměr 25 μm , délka desítky cm) a elektroforetickém pufru podle molekulové hmotnosti. Amplifikáty daného polymorfismu nesou každý jeden typ fluoroforu (molekula fluorescenční barvy), která po ozáření světlem určité vlnové délky emituje světlo určité barvy. Na základě různých typů navázaných fluoroforů excitují amplifikáty při průchodu kapilárou po ozáření laserem světlo různé barvy a intenzity, díky čemuž vznikají tzv. peaky. Algoritmem (nejčastěji Local Southern) je následně prostřednictvím definovaného vnitřního standardu, alelického žebříčku a pozitivní kontroly přiřazována numerická hodnota jednotlivým shlukům fragmentů stejných vlastností. K zařízení je připojena přímá detekce měřením absorbance. Typická analýza trvá zhruba 20 minut. Podle polohy peaku vůči standardu pak zjistíme, o jaký typ alely daného polymorfismu se jedná.

Potřebné vybavení a reagenty:

- PCR produkt
- Vnitřní standard GS-500 LIZ (Applied Biosystems)
- Formamid
- Stojan
- 0,5 ml zkumavka/1 vzorek
- Sada pipet a špičky
- Termální blok
- Genetic Analyser

Postup:

Vzorky byly před přípravou reakční směsi ředěny dle intenzity signálu vyhodnoceného pomocí gelové elektroforézy. Ředění bylo nutné u většiny vzorků a pohybovalo se od ředění 0x až po ředění 70x u velmi silných vzorků. Vzorky byly ředěny pomocí dH₂O. Například ředění 70x odpovídá 69 μl H₂O a 1 μl PCR produktu. Ukázka ředění vzorků viz. Obrázek 19. Vzorky 1, 3 a 4 byly ředěny 10x, vzorky 5, 6 a 7 byly ředěny 30x a vzorky 8 až 14 byly ředěny 50x. Složení reakční směsi pro fragmentační analýzu je uvedeno v Tabulka 15. Vzorky byly analyzovány pomocí kapilární elektroforézy s využitím genetického analyzátoru ABI PRISM 310 (Life Technologies Copr., Carlsbad, USA).



Obrázek 19 Ukázka ředění vzorků před FA

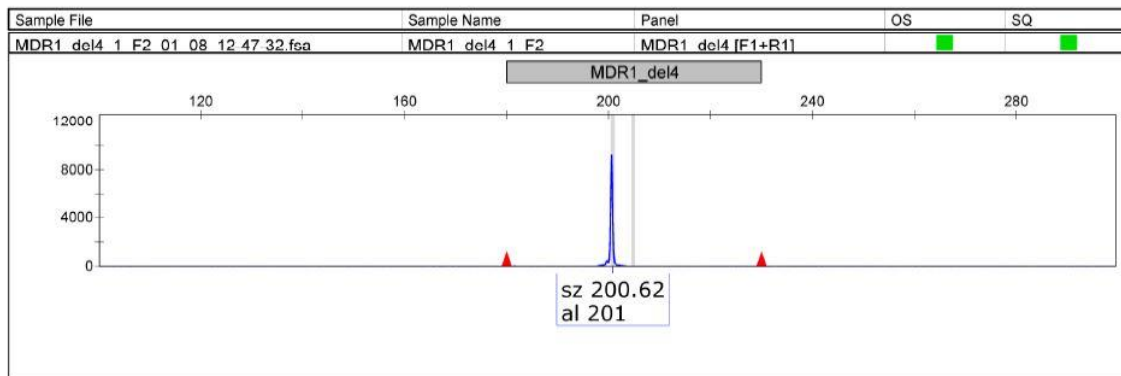
Tabulka 15 Složení reakční směsi pro FA

Chemikálie	Množství (μl)
Formamid	11,3
GS-500 LIZ	0,2
PCR produkt	1
Celkem	12,5

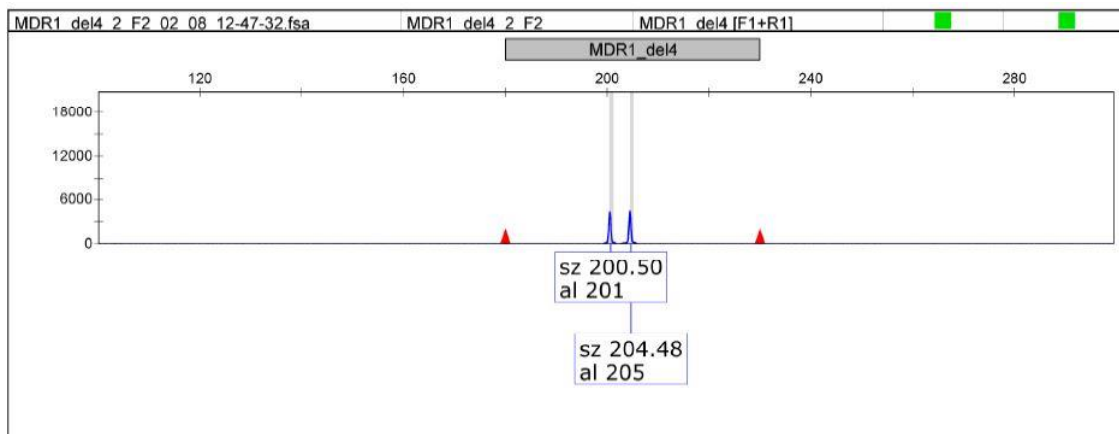
4.5.1 Analýza výstupních dat

Výstupní data byla vyhodnocena pomocí programu GeneMapper 4.1. Podle přítomnosti či absence peaku v oblasti 201 a 205 byly v populaci vyhodnoceni jedinci zdraví, přenašeči a nemocní. Na Obrázek 20 je viditelný pouze peak v oblasti 201, což ukazuje na delecí 4 bází, jedná se tedy o postiženého jedince (-/-), který by neměl být zařazen do chovu. Na Obrázek 21 jsou viditelné peaky dva, jeden v oblasti 201 a druhý v oblasti 205, což je typické pro přenašeče onemocnění (-/+). Takový pes může být zařazen do chovu, ale připarován bude pouze se zdravými jedinci. Nemoc se u něj

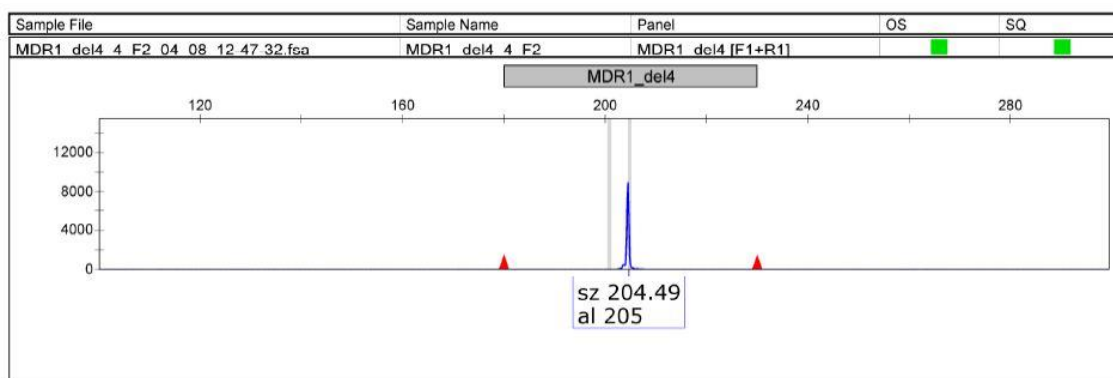
neprojeví, ale přenáší ji na své potomstvo. Na Obrázek 22 je viditelný pouze peak v oblasti 205, jedinec je tedy zdravý (+/+), bez přítomnosti delece a může být použit v chovu naprosto bez omezení.



Obrázek 20 Fragmentační analýza, postižený



Obrázek 21 Fragmentační analýza, přenašeč



Obrázek 22 Fragmentační analýza, zdravý

5 VÝSLEDKY

5.1 Výpočet frekvencí alel a genotypů

Vzorce pro výpočet frekvence alel a genotypů podle (BEDNÁŘ et al., 2006)

Genotyp	Frekvence absolutní	Frekvence relativní
AA	D	$d=D/N$
Aa	H	$h=H/N$
aa	R	$r=R/N$
Σ	$D+H+R=N$	$d+h+r=1$

Alely	Frekvence absolutní	Frekvence relativní
A	$P=2D+H$	$p=(2D+H)/2N=d+\frac{1}{2}h$
a	$Q=2R+H$	$q=(2R+H)/2N=r+\frac{1}{2}h$
Σ	$P+Q=2N$	$p+q=1$

- D,H, R jsou absolutní frekvence genotypů
- d, h, r jsou frekvence genotypů relativní
- P a Q jsou absolutní frekvence alel
- p, q jsou relativní frekvence alel
- N je součet absolutních frekvencí všech jedinců

V souboru 128 psů byl genotyp AA (+/+) zjištěn u 53 jedinců, genotyp Aa (+/-) u 58 jedinců a genotyp aa (-/-) u 17 jedinců (viz. Tabulka 16). Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů podle plemene je znázorněno v Graf 1. Výsledky vyhodnocené v programu SAS jsou znázorněny v Tabulka 18. Nejvyšší procentuální zastoupení postižených jedinců pozorujeme u plemene kolie, což odpovídá výsledkům předchozích studií. Zřejmým důvodem tohoto vysokého výskytu delece je nedostatečně velká chovná základna psů v ČR. Z tohoto důvodu dochází k připarování přenašečů (54,05 %) mezi sebou, což má za následek vysoký výskyt polymorfismu u tohoto plemene. Dalším důvodem je nedostatečná informovanost majitelů psů bez povinnosti testovat svá chovná zvířata.

Tabulka 16 Výsledné zastoupení genotypů

GENOTYP	AOV	KOLIE	SHE	CELKEM
-/-	3	11	3	17
+/-	14	20	24	58
+/+	24	6	23	53
CELKEM	41	37	50	128

Tabulka 17 Procentuální zastoupení genotypů

PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ GENOTYPŮ			
PLEMENO	AA (+/+)	Aa (+/-)	Aa (-/-)
AOV	58,54%	34,14%	7,32%
SHE	46%	48%	6%
KOLIE	16,22%	54,05%	29,73%

Tabulka 18 Vyhodnocení genotypu v programu SAS

GENOTYP	ČETNOST	PROCENTA	KUMULATIVNÍ ČETNOST	KUMULATIVNÍ PROCENTA
+/+	53	41,41	53	41,41
+/-	58	45,31	111	86,72
-/-	17	13,28	128	100

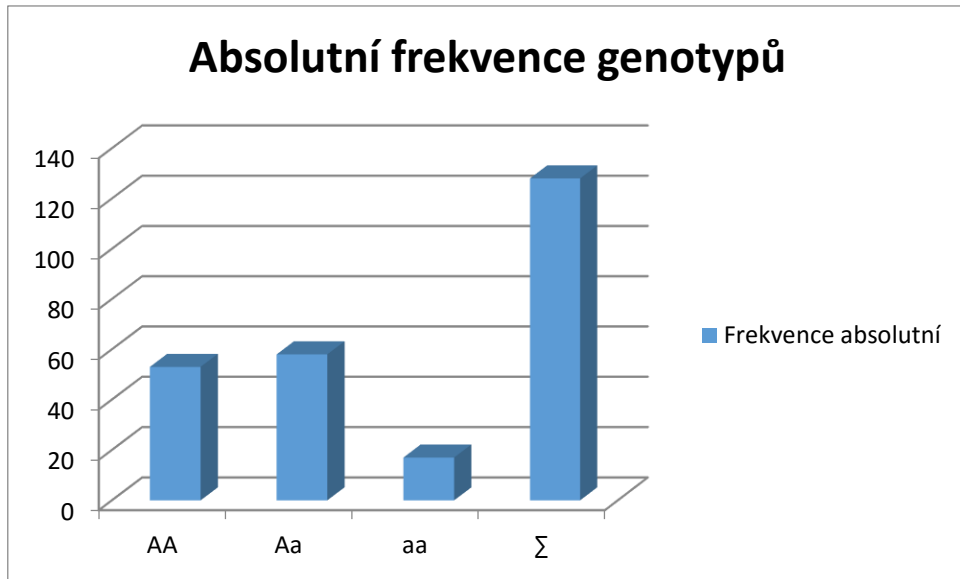
Na základě absolutních frekvencí genotypů byly vypočítány relativní frekvence genotypů (viz. Tabulka 19) a absolutní a relativní frekvence alel, které jsou uvedeny v Tabulka 20. Graf 2 a Graf 3 znázorňují absolutní frekvence genotypů a relativní frekvence alel.

Tabulka 19 Frekvence genotypů

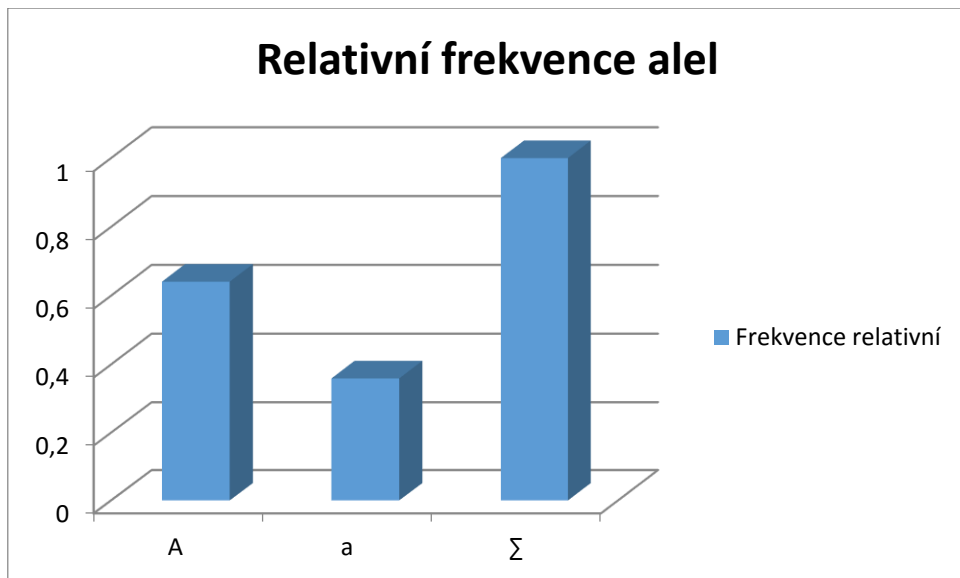
Genotyp	Frekvence absolutní	Frekvence relativní
AA	53	0,1328125
Aa	58	0,453125
aa	17	0,4140625
Σ	128	1

Tabulka 20 Frekvence alel

Alela	Frekvence absolutní	Frekvence relativní
A	164	0,640625
a	92	0,359375
Σ	256	1



Graf 2 Absolutní frekvence genotypů



Graf 3 Relativní frekvence alel

5.2 Hodnocení genetické rovnováhy dle Hardy-Weinbergova zákona

Výpočet genetické rovnováhy byl proveden podle (URBAN, 2008).

Rovnovážný genetický stav v populaci nastává, když platí konkordátní rozložení genotypů, vycházející ze základní rovnice genetické rovnováhy:

$$p^2q^2 = \left(\frac{2pq}{2}\right)^2 \approx dr = \left(\frac{h}{2}\right)^2$$

$$\frac{2pq}{\sqrt{p^2q^2}} = 2,0 \approx \frac{h}{\sqrt{dr}} = 2,0$$

Určení, zda je populace v genetické rovnováze, bylo provedeno na základě porovnání pozorované a očekávané distribuce genotypů pomocí statistického testu χ^2 , podle vzorce:

$$\chi^2 = \sum \frac{(P - O)^2}{O}$$

kde P – pozorované hodnoty; O – očekávané hodnoty pro danou kategorii.

Hodnota χ^2 je použita k odhadu, jak častá je pozorovaná odchylka, či jaká pozorovaná odchylka může být očekávána, když je způsobena náhodou.

$\chi_{\text{tab.}}^2 > \chi_{\text{vyp.}}^2 \sim$ Je shoda mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi a H_0 se nezamítá. Pak populace pro daný lokus je v genetické rovnováze.

$\chi_{\text{tab.}}^2 < \chi_{\text{vyp.}}^2 \sim$ Je průkazný rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi a H_0 se zamítá. Pak populace pro daný lokus není v genetické rovnováze.

Tabulka 21 znázorňuje výsledky chí-kvadrát testu vyhodnocené v programu SAS. Vypočítaná hodnota 21,2938 je vyšší než hodnota tabulková pro stupeň volnosti 4 (viz. Tabulka 22), a populace tedy není pro daný lokus v genetické rovnováze.

Tabulka 21 Výsledky chí-kvadrát testu vyhodnocené v programu SAS

STATISTIKA	DF	HODNOTA	PR
CHÍ-KVADRÁT	4	21,2938	0,0003
CHÍ-KVADRÁT POMĚRU VĚROHODNOSTÍ	4	21,492	0,0003
MANTEL-HAENSZELŮV CHÍ-KVADRÁT	1	0,2927	0,5885

Tabulka 22 Tabulkové hodnoty Chi-kvadrátu

HLADINA VÝZNAMNOSTI	STUPNĚ VOLNOSTI				
	1	2	3	4	5
0,05	3,84	5,99	7,81	9,48	11,07
0,01	6,35	9,21	11,34	13,27	15,08

6 DISKUZE

V souboru testovaných psů plemen kolie, šeltie a australský ovčák byly zjištěny tyto frekvence genotypů: AA 41,41 %, Aa 45,3 % a genotyp aa 13,28 %. Zjištěné relativní frekvence alel byla následující: alela A 0,640625, alela a 0,359375.

Vliv polymorfismu v genu *MDR1* na schopnost odbourání léčiv z mozku byl studován v několika pracích. Například podle (GRAMER et al., 2011) je zastoupení postižených jedinců (genotyp -/-) plemene kolie ve sledované populaci 36 % a zastoupení přenašečů (genotyp +/-) 45 %. Analyzováno bylo celkem 2227 psů. Tato analýza byla provedena v Německu a výskyt polymorfismu je srovnatelný s touto prací, kdy bylo postižených jedinců (genotyp -/-) u plemene kolie detekováno 29,73 % a přenašečů (genotyp +/-) 54,05 %. Celosvětově však frekvence kolísá. Například v Austrálii je zastoupení přenašečů podle (MAELEY et al., 2002) ještě vyšší (63,3 %) a zastoupení postižených jedinců dosahuje 24,3 %. V Japonsku je dokonce podle (KAWABATA et al., 2005) procento postižených jedinců vyšší (41,7 %), než zastoupení přenašečů ve sledované populaci (33,3 %).

Frekvence výskytu podle (GRAMER et al., 2011) u šeltií byla 51 % a u australských ovčáků 38 %. V této studii byla frekvence výskytu polymorfismu u šeltií 54 % a u australských ovčáků 41,46 %, tedy v obou případech vyšší.

Velké rozdíly ve frekvencích byly zaznamenány podle (MEALEY, 2005) v USA a Austrálii. Například frekvence alely mutované u plemene australský ovčák v USA (178 psů), byla 17 %, zatímco v Austrálii dokonce 69 %. Podobné výsledky jsou hlášeny u plemene šeltie (190 psů) v USA 8,4 % a v Austrálii 43 %. Díky těmto výsledkům byly značně pozměněny léčebné metody u ovčáckých psů v Austrálii.

Vysoký výskyt heterozygotních jedinců u plemene kolie je zřejmě zapříčiněn nedostatečnou chovnou základnou. Heterozygotní jedinci by měli být připařováni pouze se zdravými, aby se předešlo šíření polymorfismu v populaci psů. Bohužel v praxi je běžné, že se připařují přenašeči mezi sebou. Z takového spojení lze očekávat pouze 25 % zdravých jedinců, 50 % heterozygotních a 25 % jedinců postižených delecí v genu *MDR1*. K udržení zdravé populace je důležitá především informovanost v řadách chovatelů, zpřísnění požadavků pro uchovnění zvířat a zavedení povinného genetického testování. Postižení jedinci by měli být z chovu vyřazeni. Protože se nejedná o onemocnění závažnějšího typu a je možné se vyhnout léčivům, které jsou substráty

P-glykoproteinu a způsobují zdravotní komplikace, není mezi chovateli zavedená povinnost zvířata testovat. Pokud však chovatel nabízí štěňata i mimo ČR, většinou se u budoucích majitelů může setkat s požadavkem testování.

Z výsledků testování je patrné, že výskyt polymorfismu v genu *MDR1* je v ČR srovnatelný s okolními státy. Nejvyšší zastoupení postižených jedinců bylo zaznamenáno u plemene kolie, následovalo plemeno šeltie a nejnižší výskyt byl zaznamenán u plemene australský ovčák.

Pro ozdravení chovu bych doporučila testovat veškeré chovné psy. Recessivní homozygoty vyřadit z chovu, heterozygotní jedince připářovat pouze se zdravými a zařadit do chovu nové psy, kteří jsou zdraví. Pro uchovnění jedince by mělo být povinné genetické testování a vedení přesné evidence pod klubem chovatelů jednotlivých plemen psů.

7 ZÁVĚR

Na základě studia odborných článků byly sepsány informace o genu *MDR1* a popsána funkce P-glykoproteinu, který je tímto genem kódován. Hlavním cílem této diplomové práce bylo zvládnutí molekulárně-genetických metod. Dále byla popsána lokalizace genu *MDR1*, počet a sekvence kódovaných aminokyselin a byly uvedeny jednotlivé substráty P-glykoproteinu. V neposlední řadě jsou uvedena i problémová léčiva pro psy s mutací v genu *MDR1*. V současnosti se výzkum zaměřuje na analýzu lidského genu *MDR1* a farmakogenetické analýzy se ve vztahu k mutaci v genu *MDR1* studují výjimečně.

Cílem této práce bylo navrhnout metodiku pro detekci polymorfismu v genu *MDR1* u ovčáckých a honáckých plemen psů a následně otestovat minimálně 30 zvířat plemene šeltie, kolie a australský ovčák. Delece v genu *MDR1* byla zjištěna celkem u 17 psů s nejvyšším zastoupením u plemene kolie (29,7 %), což odpovídá výsledkům předešlých analýz. Pro detekci genotypu byly použity metody PCR, gelová elektroforéza a fragmentační analýza.

Pozorované frekvence genotypů byly následující: 41,4 % genotyp AA, 45,3 % genotyp Aa a 13,3 % genotyp aa. Vysoké procento heterozygotních jedinců je zřejmě ovlivněno nedostatečnou velikostí chovné základny, zejména u plemene kolie. Výsledky studie však mohou být zkresleny malým souborem psů zařazených do analýzy.

8 LITERATURA

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 specific drug binding*, Science, 323(5922), s. 1718–1722

BEDNÁŘ, J., KUCIEL, J., VYHNÁNEK, T., *Genetika*, MZLU v Brně, 1. vydání, dotisk 2006, 148 s., ISBN 80-7157-862-2.

BIOLIB: Biological library. *BioLib* [online]. 2009 [cit. 2016-04-09]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id1855/>

BUŠ A., 2005: *Otrava psů ivermektinem*. Veterinářství [online]. 2005, (55), 326-327 [cit. 2016-04-09]. Dostupné z: <http://vetweb.cz/otrava-psu-ivermektinem/>

CARSON P. E., FLANAGAN C. L., ICKES C. E., ALVING A. S., 1956: Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythocytes. *Science*, s. 484-485.

DEY S., RAMACHANDRA M., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., AMBUDKAR S. V., 1997: *Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein*. Proc. Natl. Acad. Sci., s. 10594-10599.

DOWLING P., 2006: *Pharmacogenetics: It's not just about ivermectin in collies*, Can Vet J., s. 1165-1168.

DUCHÁČEK L. a LAMKA J., 2014: *Veterinární vademecum pro farmaceuty* [online]. Druhé, nezměněné. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, [cit. 2016-04-09]. ISBN 978-80-246-2821-9.

FARMAKOGENETIKA: *Aktuální genetika - Farmakogenetika a farmakogenomika*. Aktuální genetika [online]. [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/farmakogenetika.htm>

FREEDMAN A. H., SCHWEIZER R. M., GRONAU I., HAN E., VECCHYO D. O., 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., TADIGOTLA V., SIEPE A., BUSTAMANTE C. D., HARKINS T. T., NELSON S. F., OSTRANDER E. A., WAYNE R. K., NOVEMBRE J., 2013: *Genome Sequencing Highlights Genes Under Selection and the Dynamic Early History of Dogs*, Plos Genetics.

FREEDMAN A. H., GRONAU I., SCHWEIZER R. M., ORTEGA-DEL VECCHYO D., HAN E., et al., 2014: *Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs*. PLoS Genet 10(1): e1004016. doi:10.1371/

GRAMER I., LEIDOLF R., DÖRING B., KLINTZSCH S., KRÄMER E., YALCIN E., PETZINGER E. a GEYER J., 2011: *Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs*. The Veterinary Journal. 2011, 189(1), 67-71. DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.06.012.

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. Therap., s. 545–5517.

GEYER J., DÖRING B., GODOY J. R., LEIDOLF R., MORITZ A. & PETZINGER E., 2005b: *Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1*, J. vet. Pharmacol. Therap., s. 95–99

GUSTAVSSON I., 1964: *The chromosomes of the dog*, Hereditas 51: s. 187-189

HOFFMEYER, S., BURK, O., VON RICHTER, O., 2000: *Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, s. 3473–3478.

HOOIVELD G. J., VAN MONTFOORT J. E., MEIJER D. K., MULLER M., 2001: *Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport*. Eur J Pharm Sci, s. 525-543.

CHIN J. E., SOFFIR R., NOONAN K. E., CHOI K., RONINSON I. B., 1989: *Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family*. Mol. Cell. Biol., s. 3808–3820.

KAWABATA A., MOMOI Y., INOUE-MURAYAMA M., IWASAKI T., 2005: *Canine mdr1 gene mutation in Japan*. Journal of Veterinary Medical Sciences 67, s. 1103–1107.

KIOKA, N., TSUBOTA, J., KAKEHI, Y., 1989: *P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance*. Biochem. Biophys. Res. Commun., s. 224–231.

KLINTZSCH S., MEERKAMP K., DÖRING B., GEYER J., KRÄMER E., YALCIN E. a PETZINGER E., 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. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.07.018. ISSN 10900233

KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z., *Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfizmů DNA genů)*, 1.vydání, MZLU v Brně, 2002, 168 s., ISBN 80-7157-616-6.

KUCIEL, J., BEDNÁŘ, J., URBAN, T., *Genetika zemědělských produktů (Vybrané kapitoly k přednáškám)*, 1. vydání, MZLU v Brně, 2004, 137 s., ISBN 80-7157-767-7.

LABOKLIN, 2007: *MDR1 Gene Defect*. [online] [cit. 2016-04-05]. Dostupné na: <http://www.laboklin.co.uk/laboklin/showGeneticTest.jsp?testID=8032>

LEHNE, G., 2000: *P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer*. Current drug targets, s. 85-99.

LookForDiagnosis: P-Glycoproteins (Multidrug Resistance Proteins) [online]. [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=p-glycoproteins&lang=1

MEALEY K. L., BENTJEN S.A., GAY J.M. & CANTOR G.H., 2001: *Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion station of the mdr1 gene*, Pharmacogenetics, Vol 11 No 8, s. 727-733.

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*. American Journal of Veterinary Research 63, s.479–481.

MEALEY K. L., MUNYARD K. A., BENTJEN S. A., KLINTZSCH S., KRÄMER E., YALCIN E., PETZINGER E. a GEYER J., 2005: *Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia*. Veterinary Parasitology. 131(3-4), 193-196. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.05.004. ISSN 03044017

NCBI, 2014. *Canis lupus familiaris (dog)*. [online] [cit. 2016-04-16]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=canis%20lupus%20familiaris>

NEFF M. W., ROBERTSON K. R., WONG A. K., SAFRA N., BROMAN K. W., SLATKIN M., MEALEY K. L., PEDERSEN N. C., 2004: *Breed distribution and history of canine mdr1-1D, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the Collie lineage*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, s. 11725–11730.

PAUL A. J., TRANQUILLI W. J., SEWARD R. L., TODD K. S., DIPIETRO J.A., 1987: *Clinical observations in Collies given ivermectin orally*. Am. J.Vet. Res. 48, s. 684– 685.

PECHANDOVÁ K., BUZKOVÁ H., SLANAŘ O. a PERLÍK F., 2006: *Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein*. Klin. Biochem. Metab., **35**(14), 196-201.

PRESTON J. M., 1983: Veterinary Record,112:286 doi:10.1136/vr.112.12.286

ROSENBERG M. F., CALLAGHAN R., FORD R. C., HIGGINS C. F., 1997: *Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis*. J. Biol. Chem., s. 10685-10694.

ROULET A., PUEL O., GESTA S., LEPAGE J.F., DRAG M., SOLL M., ALVINERIE R. a PINEAU T., 2003: *MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin*. European Journal of Pharmacology, s. 85-91.

RYCHLIK, W., W.J. SPENCER a R.E. RHOADS. *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. Nucleic Acids Research. Oxford University Press, 1990, 18(21).

ŘEHOUT, V. a kol.: *Základy genetiky a poradenství*, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2003, Dostupné z WWW: <http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/kko/ucebni_texty/zaklady-genetiky-aporadenstvi/10.pdf>.

SACHIADANANDAM R.,WEISSMAN D., SCHMIDT S. C., KAKOL J. M., STEIN L. D. et al., 2001: *A map of human genome sequence variation containing 1.42 milion single nucleotide polymorphisms*, Nature 409: s. 928-933

SAKAEDA T., NAKANUTA T., OKUMURA K., 2002: *MDR1 genotype related pharmacokinetics and pharmacodynamics*, Biol. Pharm. Bull., 25, 11, s. 1391–1400.

SNUSTAD D. P., SIMMONS M. L., 2009: *Genetika*. Masarykova Univerzita, Brno, 871 s.

SOCIETA' ITALIANA COLLIES [online]. Via P. Bianchi 28 27049 Stradella (Pavia): 2008 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: http://www.societaitalianacollies.com/sezione/23920_105201_Mdr1.html

ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, *Metody molekulární biologie*, Masarykova Univerzita, Tisk Coprint, Brno-Kraví Hora, 188s., 2008. ISBN 978-80-210-3841-7.

THORNTON-WELLS T. A., MOORE J. H., HAINES J. L., 2004: *Genetics, statistics and human disease: analytical retooling for complexity*. Trends Genet, s. 640-647.

ŠEDA O., ŠEDOVÁ L., 2005: *Farmakogenomika a nutrigenomika: komplexní interakce genů s prostředím*, Klin Farmakol Farm, 19, 116–120

URBAN T., *Genetika populací - organizace genetické variability - Hardy - Weinbergův princip: Hardy-Weinbergův princip*. Virtuální svět genetiky: Genetika populací a kvantitativních znaků [online]. Brno, 2008 [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/pop/popul4b.html>

Velký lékařský slovník [online]. Impressum, 2008 [cit. 2015-09-18]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/farmakogenetika>

VIERSTRAETE A., 1999. *PCR: Polymerase Chain Reaction*. [online] [cit. 2016-04-16]. Dostupné na: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

9 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

9.1 Seznam obrázků

Obrázek 1 Teoretická domestikační centra psa (FREEDMAN et al., 2013)

Obrázek 2: Dávkování farmaka dle genotypu

Obrázek 3 Ideogram psa. (REIMANN et al., 1996)

Obrázek 4 Lokalizace MDR1 (ABCB1) genu na chromozomu 14

Obrázek 5: Pořadí aminokyselin v P-glykoproteinu (NCBI, 2014)

Obrázek 6 Odbourávání léčiv u zdravých a postižených jedinců (SOCIETA' ITALIANA COLLIES, 2008)

Obrázek 7 Struktura P-glykoproteinu (LookForDiagnosis, 2016)

Obrázek 8: Substráty P-glykoproteinu (DOWLING et al., 2006)

Obrázek 9 Znázornění původní (wild type) a deletované alely (ROULET et al., 2003)

Obrázek 10 Znázornění původní a deletované alely pomocí gelové elektroforézy (ROULET et al., 2003)

Obrázek 11 Znázornění rozdílu v sekvenci původní a mutované alely (GEYER et al., 2005b)

Obrázek 12 Výsledky gelové elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (GEYER et al., 2005b)

Obrázek 13 Znázornění sekvence navrženého přímého a zpětného primeru (KLINTZSCH et al., 2010)

Obrázek 14 Výsledky gelové elektroforézy (KLINTZSCH et al., 2010)

Obrázek 15 Průběh real-time PCR (KLINTZSCH et al., 2010)

Obrázek 16 Princip PCR (KNOLL a VYKOUKALOVÁ, 2002)

Obrázek 17 Sekvence PCR produktu použitého pro testování polymorfismu v genu MDR1

Obrázek 18 Výsledky gelové elektroforézy

Obrázek 19 Ukázka ředění vzorků před FA

Obrázek 20 Fragmentační analýza, postižený

Obrázek 21 Fragmentační analýza, přenašeč

Obrázek 22 Fragmentační analýza, zdravý

9.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Výsledky studie genotypů 6544 psů (GRAMER et al., 2011)

Tabulka 2 Shrnutí výsledků studií z celého světa (GRAMER et al., 2011)

Tabulka 3: Kombinace různých genotypů genu MDR1 a výsledky křížení

Tabulka 4: Přehled nejpoužívanějších veterinárních léčiv

Tabulka 5 Frekvence výskytu alel u jednotlivých plemen psů (KLINTZSCH et al., 2010)

Tabulka 6 Zastoupení jednotlivých pohlaví

Tabulka 7 Zastoupení jednotlivých plemen

Tabulka 8 Vlastnosti navržených primerů

Tabulka 9 Testované teplotní profily

Tabulka 10 Složení reakční směsi PCR

Tabulka 11 Teplotní profil PCR

Tabulka 12 Složení reakční směsi pro PCR

Tabulka 13 Teplotní profil PCR reakce

Tabulka 14 Složení reakční směsi pro PCR

Tabulka 15 Složení reakční směsi pro FA

Tabulka 16 Výsledné zastoupení genotypů

Tabulka 17 Procentuální zastoupení genotypů

Tabulka 18 Vyhodnocení genotypu v programu SAS

Tabulka 19 Frekvence genotypů

Tabulka 20 Frekvence alel

Tabulka 21 Výsledky chí-kvadrát testu vyhodnocené v programu SAS

Tabulka 22 Tabulkové hodnoty Chí-kvadrátu

9.3 Seznam grafů

Graf 1 Zastoupení jednotlivých plemen

Graf 2 Absolutní frekvence genotypů

Graf 3 Relativní frekvence alel

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A, G, C, T - adenin, guanin, cytosin, tymin (označení jednotlivých nukleotidů)

AMK - aminokyselina

AOV - australský ovčák

bp - pár bází (base pair)

CNS - centrální nervová soustava

dH₂O - destilovaná voda

DNA - deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

dNTP - deoxyribonukleotid trifosfát

EtBr – ethidiumbromid

FA – Fragmentační analýza

Gb - 10⁹ bází

KCHKŠ – Klub chovatelů kolíí a šeltíí

MDR - Multiple Drug Resistance

n - počet zvířat

PCR - polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

SHE - šeltie (sheltie)

SNP - jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)

ssDNA - jednořetězcová DNA

TBE - trisborátový pufr

T_m - teplota tání (melting temperature)

11 PŘÍLOHY

11.1 Příloha č. 1 – Vysvětlení pojmů

ALELA - jedna ze dvou nebo více alternativních forem genu nebo genetického markeru

AMPLIFIKACE DNA - proces přípravy mnoha kopií určitého úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

BÁZE - součást nukleové kyseliny – nukleotidu; hlavní báze nalézané v DNA jsou adenin (A), guanin (G), cytosin (C), thymin (T)

DNA POLYMERÁZA - enzym, který syntetizuje DNA podle existujícího templátu

DNA REPLIKACE - enzymová syntéza nové DNA podle DNA předlohy

DEGRADACE DNA - rozpad DNA na menší fragmenty působením enzymů nebo chemických či fyzikálních vlivů

DENATURACE DNA - oddělení jednotlivých řetězců dvoušroubovice DNA od sebe působením enzymů nebo chemických či fyzikálních vlivů

HETEROZYGOT - stav, kdy párové chromozomy diploidního organismu obsahují různé alely určitého genu

HOMOZYGOT - stav, kdy párové chromozomy diploidního organismu obsahují stejné alely určitého genu

CHROMOZOM - jaderná struktura nesoucí geny, pomocí které je přenášena dědičná informace z rodičovské generace na potomstvo

LOKUS - známé místo na chromozomu odpovídající konkrétnímu genu

POLYMORFISMUS - přítomnost většího počtu alel daného genu v populaci

PRIMER - řetězec nukleové kyseliny dlouhý několik bází, který slouží jako počáteční místo replikace DNA

PURIFIKACE - metoda používaná nejčastěji k odstranění inhibitorů

Taq DNA POLYMERÁZA - termostabilní polymeráza používaná pro PCR

11.2 Příloha č. 2 – Registr testovaných psů

Z důvodu anonymity byla skryta jména psů a chovatelské stanice.

Vzorek	Plemeno	Pohlaví	Datum odběru vzorku	Genotyp
1	AOV	Fena	8.1.2009	-/-
2	AOV	Pes	9.1.2009	+/-
3	AOV	Fena	8.1.2009	+/-
4	AOV	Pes	8.1.2009	+/+
5	AOV	neznámé	8.1.2009	+/+
6	AOV	neznámé	8.1.2009	+/+
7	AOV	Pes	11.8.2008	+/-
8	AOV	Pes	12.11.2008	+/+
9	AOV	Pes	12.11.2008	+/+
10	AOV	Pes	12.11.2008	-/-
11	AOV	Pes	15.10.2008	+/+
12	AOV	Fena	15.10.2008	+/-
13	AOV	Fena	11.8.2008	+/+
14	AOV	Fena	11.8.2008	+/+
15	AOV	Pes	11.8.2008	+/-
16	SHE	Fena	19.11.2008	+/-
17	SHE	Fena	19.11.2008	X
18	SHE	Pes	19.11.2008	-/-
19	SHE	Pes	19.11.2008	+/+
20	SHE	Pes	19.11.2008	+/-
21	Kolie	Pes	19.11.2008	+/-
22	Kolie	Pes	19.11.2008	+/+
25	Kolie	Fena	19.11.2008	+/-
26	Kolie	Fena	19.11.2008	+/-
27	SHE	neznámé	19.11.2008	+/+
28	SHE	Fena	19.11.2008	+/+
29	SHE	Pes	19.11.2008	+/-
30	SHE	Fena	19.11.2008	+/-
31	SHE	Fena	19.11.2008	X
32	SHE	Pes	19.11.2008	+/+
33	SHE	Pes	19.11.2008	-/-
34	SHE	Pes	19.11.2008	+/+
35	SHE	Pes	19.11.2008	+/+
36	SHE	neznámé	19.11.2008	+/+
37	SHE	neznámé	19.11.2008	+/-
38	SHE	Pes	19.11.2008	+/-
39	SHE	neznámé	19.11.2008	+/-
40	SHE	neznámé	19.11.2008	+/-
41	SHE	Fena	19.11.2008	+/-

42	SHE	Fena	19.11.2008	+/+
43	SHE	Pes	19.11.2008	+/+
44	SHE	Fena	19.11.2008	+/-
45	SHE	neznámé	19.11.2008	+/-
46	SHE	Fena	19.11.2008	+/-
47	Kolie	Fena	19.11.2008	+/+
48	Kolie	neznámé	19.11.2008	-/-
49	Kolie	Pes	19.11.2008	+/-
50	Kolie	Fena	19.11.2008	-/-
51	Kolie	Fena	19.11.2008	-/-
52	Kolie	Fena	19.11.2008	+/-
53	Kolie	Fena	19.11.2008	-/-
54	Kolie	Fena	19.11.2008	+/-
55	Kolie	Fena	19.11.2008	+/-
56	Kolie	Pes	19.11.2008	+/+
57	Kolie	Pes	19.11.2008	X
58	Kolie	Fena	19.11.2008	+/+
59	Kolie	Pes	19.11.2008	-/-
60	AOV	Fena	11.8.2008	+/+
61	AOV	Fena	15.10.2008	-/-
62	AOV	Fena	11.8.2008	+/-
63	AOV	Fena	11.8.2008	+/-
64	AOV	Pes	11.8.2008	+/+
65	AOV	Fena	11.8.2008	+/+
66	AOV	Fena	11.8.2008	+/+
67	AOV	Pes	11.8.2008	+/-
68	AOV	Fena	8.1.2009	+/+
69	AOV	Pes	12.11.2008	+/-
70	AOV	Fena	11.8.2008	+/-
71	AOV	Fena	11.8.2008	+/+
73	AOV	Fena	11.8.2008	+/+
74	AOV	Pes	11.8.2008	+/-
75	SHE	neznámé	2.12.2008	+/+
76	SHE	Pes	2.12.2008	-/-
77	Kolie	Fena	11.8.2008	-/-
78	Kolie	Fena	11.8.2008	X
79	Kolie	Pes	11.8.2008	-/-
80	Kolie	Pes	11.8.2008	-/-
81	Kolie	Pes	2.12.2008	-/-
82	Kolie	Fena	2.12.2008	-/-
83	Kolie	neznámé	11.8.2008	+/+
84	Kolie	Pes	11.8.2008	+/-
85	Kolie	Pes	11.8.2008	+/-
86	Kolie	Pes	11.8.2008	+/-

87	Kolie	neznámé	2.12.2008 +/-
88	Kolie	neznámé	2.12.2008 +/+
89	AOV	Pes	11.8.2008 +/+
90	BK	Pes	11.8.2008 +/+
91	BK	Pes	11.8.2008 +/+
92	BK	Fena	11.8.2008 +/+
93	BK	Fena	2.12.2008 +/+
95	AOV	Fena	2.12.2008 +/-
96	AOV	neznámé	11.8.2008 +/+
97	AOV	Pes	11.8.2008 +/+
98	AOV	Pes	11.8.2008 +/+
99	AOV	Pes	11.8.2008 +/+
100	AOV	Fena	11.8.2008 +/-
101	Kolie	Fena	7.11.2015 +/-
102	SHE	Pes	7.11.2015 +/+
103	SHE	Fena	7.11.2015 +/-
104	SHE	Fena	7.11.2015 +/-
105	SHE	Fena	7.11.2015 +/-
106	Kolie	Fena	7.11.2015 +/-
107	Kolie	Fena	7.11.2015 +/-
108	Kolie	Fena	7.11.2015 +/-
109	SHE	Fena	7.11.2015 +/-
110	Kolie	Fena	7.11.2015 +/-
111	SHE	Fena	7.11.2015 +/+
112	SHE	Pes	7.11.2015 +/-
113	Kolie	Fena	7.11.2015 +/-
114	SHE	Fena	7.11.2015 +/-
115	Kolie	Pes	7.11.2015 +/-
116	SHE	Pes	7.11.2015 +/-
117	Kolie	Fena	7.11.2015 +/-
118	SHE	Pes	7.11.2015 +/-
119	Kolie	Fena	7.11.2015 -/-
120	Kolie	Pes	7.11.2015 +/-
121	SHE	Fena	7.11.2015 +/+
122	SHE	Pes	7.11.2015 +/-
123	SHE	Pes	7.11.2015 +/+
124	SHE	Pes	7.11.2015 +/+
125	SHE	Pes	7.11.2015 +/+
126	SHE	Pes	7.11.2015 +/+
127	SHE	Fena	7.11.2015 +/+
128	SHE	Fena	7.11.2015 +/-
129	SHE	Pes	7.11.2015 +/+
130	SHE	Pes	7.11.2015 +/-
AOV6	AOV	Pes	16.2.2012 +/+

AOV7	AOV	Pes	16.2.2012	+/+
AOV8	AOV	Fena	16.2.2012	X
AOV9	AOV	Fena	16.2.2012	X
AOV10	AOV	Fena	16.2.2012	+/-
AOV11	AOV	Pes	16.2.2012	+/+
AOV12	AOV	Pes	16.2.2012	+/+
S1	SHE	neznámé	25.1.2010	+/+
S2	SHE	Pes	25.1.2010	+/+
S3	SHE	Pes	25.1.2010	+/+
S4	SHE	neznámé	17.3.2010	+/-
S5	SHE	neznámé	17.3.2010	+/+

11.3 Příloha č. 3 – Vzor dotazníku a výstupní zprávy pro majitele psa

DOTAZNÍK PRO MAJITELE PSŮ

.....
JMÉNO A PŘÍJMENÍ MAJITELE

.....
E-MAIL / TELEFON

.....
ADRESA

.....
JMÉNO PSA

.....
PLEMENO

.....
POHLAVÍ

.....
DATUM NAROZENÍ

.....
ČÍSLO ČIPU / TETOVÁNÍ

.....
PLEMENNÁ KNIHA A ČÍSLO ZÁPISU

Slyšeli jste o MDR1 (gen odpovědný za citlivost k některým lékům)? Pokud ano, jak jste se o MDR1 dozvěděli?

.....
Podáváte některá z těchto léčiv - Acepromazin , Butorphanol, Emodepsid (Profender®) , Erythromycin, Ivermectin, Loperamid (ImodiumTM), Selamectin, Milbemycin, Vincristin, Vinblastin, Doxorubicin - svému psu?

.....
Projevila se někdy u Vašeho psa přecitlivělost k některým lékům (porucha pohybu a koordinace, chvění, zvracení, dezorientace atd.) ?

.....
*nehodící se škrtněte

DĚKUJI ZA VÁŠ ČAS A OCHOTU!

Souhlasím s poskytnutím anonymních informací, které budou dále zpracovány v diplomové práci studentky Mariety Staroveské na Mendelově univerzitě v Brně.

V dne

Podpis

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat
Zemědělská 1, 613 00

Brno



Zpráva o výsledku zkoušky

Detekce mutace genu *MDR1* způsobující u psů lékovou senzitivitu metodou fragmentační analýzy

Vyšetřovaný

Jméno:

Plemeno:

Číslo čipu/tetování:

Plemenná kniha a číslo zápisu:

Datum narození:

Pohlaví:

Datum přijetí vzorku:

Vyšetřovaný materiál:

Výsledek: Mutace nebyla detekována: +/-

Přenašeč pro mutaci: +/-; Homozygotní nositel mutace: -/-

Komentář k výsledku

Stanovili jsme výskyt mutace nt230(del4) v genu *MDR1* (multidrug resistant gene). Jedná se o delecii čtyř párů bází ve 4. exonu genu. Díky této delecii dochází k posunu čtecího rámce a k předčasnému vytvoření stop kodonu a ukončení syntézy transportní bílkoviny P-glykoproteinu. P-glykoprotein je nezbytný pro odbourávání léčiv z mozku do krve. Předčasné ukončení syntézy P-glykoproteinu zapříčiní jeho nefunkčnost a následně i ztrátu ochranné funkce. Hematoencefalická bariéra CNS se stává propustnou pro léčiva, což vede k otravě organismu. Otrava byla původně zjištěna po aplikaci ivermectinu, hrozí však i po podání jiných léčiv, která jsou substrátem P-glykoproteinu (např. doxorubicin, loperamid, moxidectin, vinblastin, vincristin). Přecitlivělost se vyskytuje nejčastěji u kolií, šeltií, australských ovčáků, bobtailů aj.

Delece uvnitř genu *MDR1* je děděna autosomálně recesivně. Léková přecitlivělost se projeví jen u homozygotních jedinců, tj. nositelů mutace uvnitř obou alel genu *MDR1* (jedinci s výsledkem +/-). Heterozygotní jedinci (-/+) nejsou ohroženi intolerancí ivermectinu ani podobných léčiv, ale mohou přenést genetickou vlohu (alelu) na další generaci a je doporučeno u nich aplikovat tato léčiva s opatrností. Jedinci s genotypem -/- jsou bez genetické zátěže v tomto lokusu genu *MDR1*.

Datum vystavení zprávy:

Vyhotovil:

Vedoucí laboratoře:

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat
Agronomická fakulta, MENDELU
613 00 Brno