

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Analýza výskytu vybrané dědičné choroby očí u psů**

The analysis of the selected inherited eye disease in dogs

**Bc. Miroslava Kubičková**

vedoucí diplomové práce

Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.

České Budějovice, 2017

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Miroslava KUBIČKOVÁ**  
Osobní číslo: **Z15429**  
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**  
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**  
Název tématu: **Analýza výskytu vybrané dědičné choroby očí u psa**  
Zadávací katedra: **Katedra zootechnických věd**

**Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :**

Dědičné choroby očí se začínají stávat jedním ze závažných problémů chovu psů. Vzhledem k vysokému stupni prošlechtěnosti řady plemen spolu s nedodržováním pravidel chovatelské praxe dochází k výraznějšímu výskytu dědičných chorob očí. U celé řady očních chorob již začíná být známo přesné genetické pozadí, což usnadňuje včasnou diagnostiku těchto chorob a následně díky včasné léčbě i snížení dopadu choroby na postiženého jedince. Molekulárně-genetické diagnostické testy rovněž umožní odhalení skrytých přenašečů očních chorob a jejich následné vyřazení z plemenitby, což v důsledku působí pozitivně na celkové genetické zdraví daného plemene.


Cílem diplomové práce je provést analýzu možného genetického založení vybrané dědičné choroby očí u psů. V teoretickém úvodu popište příznaky, diagnostiku, léčbu a předpokládané genetické založení vybrané dědičné oční choroby. Stručně vysvětlíte principy molekulárně-genetických metod, použitých v praktické části diplomové práce. Připravte metodiku pro provedení molekulárně-genetických analýz vybrané choroby. Vyizolujte DNA ze vzorků krve či vzorků biologického materiálu u vybrané populace psů. Pomocí molekulárně-genetických metod stanovte genotypy ve sledovaném lokusu s potenciálním vztahem k výskytu vybrané oční choroby. Statisticky vyhodnoťte získané výsledky analýz. V závěru práce shrňte získané výsledky a doporučte praktická chovatelská opatření u jedinců s prokázanými genetickými předpoklady pro výskyt či přenos studované dědičné choroby.

Rozsah grafických prací: 10 tabulek, 5 grafů  
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická  
Seznam odborné literatury:


Mellersh C. S. (2014): The genetics of eye disorders in the dog. *Canine Genet. Epidemiol.*, 1(2): 3-16.  
Miyadera K., Acland G.M., Aguirre G.D. (2012): Genetic and phenotypic variations of inherited retinal diseases in dogs: the power of within- and across-breed studies. *Mamm Genome*, 23: 40-61.  
Petersen-Jones S. (2005): Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases. *J Small Anim. Pract.*, 46(8): 371-380.  
Downs L.M., Wallin-Hakansson B., Bergström T., Mellersh C.S. (2014): A novel mutation in TTC8 is associated with progressive retinal atrophy in the golden retriever. *Canine Genet Epidemiol.* 1(4):4 - 15

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.  
Katedra zootechnických věd

Datum zadání diplomové práce: 29. března 2016  
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2017

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 1008, 370 06 České Budějovice

  
doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 29. března 2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pouze za použití pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne:

.....

Bc. Miroslava Kubičková

### **Poděkování**

Děkuji vedoucí diplomové práce Ing. Lence Hanusové, Ph.D. za odborné vedení při zpracování mé diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu laboratoře genetiky katedry zootechnických věd za pomoc v laboratoři, cenné rady a trpělivost.

Další poděkování patří chovatelům za poskytnutí svých psů k odběru DNA.

Poslední poděkování patří rodině a mým blízkým, kteří mě během studia podporovali.

## Anotace

Progresivní degenerace tyčinek a čípku (prcd) je pozdní forma progresivní retinální atrofie (PRA). Jedná se o autozomálně recesivně dědičnou vadu sítnice. Toto onemocnění objevující se u psů je shodné s jednou formou retinitis pigmentosa (RP), která se vyskytuje u lidí. Fenotypické projevy jsou totožné a je známo, že se jedná o identickou kauzální mutaci. Studie této vady u psů by tudíž mohla mnohé objasnit i v humánní medicíně. Gen pro prcd byl zmapován v oblasti centromer na psím chromozomu 9 (CFA9).

V rámci této diplomové práce byla provedena genotypizace u 120 psů různé plemenné příslušnosti a věku. Nejvíce bylo zastoupeno plemeno anglický kokršpaněl, jenž má predispozici k onemocnění.

Analýza PRA-prcd proběhla pomocí molekulárně-genetické metody PCR-RFLP a agarózové horizontální elektroforézy. Genotypy byly stanoveny na základě rozdílné délky fragmentů, kdy normální alela byla o délce 396 bp a mutovaná alela měla délku 116 bp.

Přítomnost mutované alely se prokázala pouze u 25 heterozygotních přenašečů, kteří byli zpravidla plemene s predispozicí. Frekvenci mutované alely odpovídalo 10,4 % a ve vybrané populaci bylo zastoupeno 20,8 % heterozygotů.

Výsledky studie ukazují, že přibližně pětina testovaných zvířat jsou heterozygotní přenašeči. Poznatky dalších studií potvrzují, že se obecně vyskytuje více heterozygotů než recesivní homozygotů, u kterých se onemocnění během života projeví. Pokud se však k této skutečnosti nebude zřetelně přihlížet, může počet nemocných psů během krátké doby rapidně vzrůst.

Do budoucna by bylo vhodné přijmout opatření, která by zaručeně eliminovala výskyt mutované alely. Mezi tato opatření by se mohly řadit genetické testy, které spolehlivě odhalují skryté přenašeče (heterozygoty) u plemen s predispozicí. Heterozygoti mohou zastoupení této alely v populaci nekontrolovaně navyšovat a tím i počty nemocných zvířat.

**Klíčová slova:** pes, dědičné onemocnění, progresivní retinální atrofie (PRA), progresivní degenerace tyčinek a čípků (prcd), PCR-RFLP

## **Annotation**

Progressive rod-cone degeneration (PRCD) is the late form of progressive retinal atrophy (PRA). It is an autosomal recessive hereditary retinal defect. This disease in dogs is consistent with one form of retinitis pigmentosa (RP) in humans. Phenotypic manifestations are identical and it is known to be an identical causal mutation. A study of this defect in dogs could also explain a lot in human medicine. The gene for PRCD was mapped in the region of centromer of the canine chromosome 9 (CFA9).

In this thesis, genotyping of 120 dogs of different breeds and age was performed. Most represented a breed of English Cocker Spaniel which is predisposed to the disease.

Analysis PRA-PRCD was performed by molecular genetic methods PCR-RFLP and the horizontal agarose electrophoresis. Genotypes were determined on the basis of different fragment lengths. The normal allele was 396 bp in length and the mutated allele had a length of 116 bp.

Presence of mutated allele was only detected in 25 heterozygotes carriers which were usually breeds with this predisposition. Frequency of the mutated allele was 10.4 %. In the selected population 20.8 % of heterozygotes were represented.

The results of the study show approximately one fifth of the tested dogs are heterozygous carriers. Findings of other studies confirm there are generally more heterozygotes than homozygotes in which the disease is manifested during life. However, if this fact is not clearly taken in consideration, the number of sick dogs can rapidly increase during short period of time.

In the future, it would be appropriate to adopt measures which would definitely eliminate the occurrence of the mutated allele. These measures could include genetic tests that reliably reveal hidden carriers (heterozygotes) in predisposing breeds. Heterozygotes may increase the representation of this allele in the population. This leads to an increase in the number of diseased animals.

**Keywords:** dog, hereditary disease, progressive retinal atrophy (PRA), progressive rod-cone degeneration (prcd), PCR-RFLP

## Obsah

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>11</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>12</b>
3.1    Struktura genu a genomu.....	12
3.1.1    Struktura savčího genomu .....	12
3.1.2    Struktura savčího genu .....	12
3.1.3    Struktura psího genomu .....	13
3.2    Dědičná onemocnění psů .....	14
3.2.1    Dědičnost nemocí.....	15
3.3    Oko psa a jeho dědičné choroby .....	17
3.3.1    Anatomie a fyziologie oka .....	17
3.3.2    Přehled nejčastěji se vyskytujících očních vad.....	19
3.3.3    Vyšetření oka a genetické testy .....	20
3.4    Progresivní retinální atrofie (PRA).....	21
3.4.1    Popis a příznaky onemocnění .....	21
3.4.2    Formy progresivní retinální atrofie .....	22
3.4.3    Diagnostika .....	23
3.4.4    Léčba .....	23
3.4.5    Předpokládané genetické založení.....	24
3.5    Progresivní degenerace tyčinek a čípků (prcd) .....	24
3.6    Techniky molekulární genetiky využití v diplomové práci .....	26
3.6.1    Izolace DNA .....	26
3.6.2    Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	28
3.6.3    Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP) .....	31
3.6.4    Gelová elektroforéza (ELFO) .....	32



<b>4. MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>34</b>
4.1 Materiál .....	34
4.1.1 Použitý materiál .....	34
4.1.2 Odběr materiálu .....	34
4.2 Izolace DNA.....	35
4.3 PCR - Polymerázová řetězová reakce .....	36
4.4 RFLP - Polymorfismus délky restrikční fragmentů .....	37
4.5 Elektroforéza na agarózovém gelu.....	38
4.6 Statistické vyhodnocení.....	39
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>41</b>
5.1 Genotypizace .....	41
5.2 Genotypové a alelové frekvence .....	42
5.3 Predispozice jednotlivých plemen.....	43
5.4 Statistické vyhodnocení výsledků.....	46
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>48</b>
<b>7. SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>49</b>
<b>8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ .....</b>	<b>50</b>
<b>9. PŘÍLOHY.....</b>	<b>56</b>

## 1. ÚVOD

Mezi první domestikovaná zvířata patří jednoznačně pes. Neodmyslitelně je spjat s člověkem už po desetitisíce let. Psi byli a nadále jsou využíváni k nejrůznějším činnostem. Například pomáhají při ochraně majetku, myslivosti, pastvě dobytka, dále jsou prospěšní ve službách policie, záchranářů a v poslední době i v nemocničních zařízeních, kde se uplatňuje canisterapie. Především ale hrají nezastupitelnou roli jako společníci.

V návaznosti na to se vyšlechtily velké množství nejrůznějších plemen, která odpovídají požadovaným vlastnostem. V současnosti je uznáváno Mezinárodní kynologickou federací (FCI) přibližně 350 plemen psů a mnoho dalších je stále neuznáno. Psi se řadí mezi zvířata s obrovskou morfologickou rozmanitostí i přes to, že pocházejí z úzkého genetického základu. Většina současných plemen spadá do tzv. moderních plemen, jež vznikala v průběhu posledních dvou století. Avšak jsou i plemena, která mají velmi dlouhou historii a tradici chovu.

Aktuálním problémem ve všech chovech psů jsou dědičná onemocnění. Mnoho z nich vzniklo právě během rozsáhlého prošlechtování. Počet kongenitálních nemocí vyskytujících se u psů neustále stoupá. V dnešní době jich je popsáno několik stovek a dochází se k závěru, že žádné plemeno není prosté dědičných vad a chorob.

Jedná-li se o kongenitální onemocnění podmíněné recesivní alelou, pak se samozřejmě vyskytuje pouze u recesivních homozygotů. Problém však nastává v případě heterozygotů, kteří se klinicky jeví jako zdraví jedinci, ale geneticky jsou postižení. Stávají se tak nositeli vloh, čímž se u nich defekt či choroba fenotypově neprojevuje, ale u potomstva by pravděpodobně mohlo. U postižených plemen by tak bylo bezpochyby účinné provádět diagnostické testy DNA a zároveň praktikovat vhodné šlechtitelské programy.

Diplomová práce se zabývá nejčastějším dědičným onemocněním očí u psů, progresivní retinální atrofií (PRA). Výzkum je zaměřen na jednu z forem PRA, degenerace tyčinek a čípků (prcd). Výsledky analýz tohoto onemocnění u psů jsou podstatné, jelikož se mohou některé poznatky úspěšně aplikovat v oblasti studie dědičné slepoty u člověka (retinitis pigmentosa).

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je vypracování analýzy možného genetického založení vybrané dědičné choroby očí u psů se zaměřením na progresivní retinální atrofii (PRA), kdy dochází k degeneraci tyčinek a čípku (prcd).

V teoretické části práce je vytvořen literární přehled, v němž jsou popsány příznaky, diagnostika, léčba a předpokládané genetické založení oční choroby. Dále jsou zde stručně vysvětleny principy molekulárně-genetických metod použitých v praktické části diplomové práce.

V praktické části práce je popsán postup metodiky pro provedení analýzy možného genetického založení PRA-prcd. Ze vzorků biologického materiálu vybrané populace psů v počtu 120 jedinců se vyizolovalo DNA. Následně se vzorky DNA zpracovávaly pomocí molekulárně-genetických metod (PCR-RFLP) a sestavily se genotypy ve sledovaném lokusu s potenciálním vztahem k výskytu progresivní retinální atrofie typu poškození tyčinek a čípků (prcd). Na to navazuje statistické vyhodnocení získaných výsledků analýzy.

V závěru diplomové práce je shrnutí získaných výsledků a doporučení praktických chovatelských opatření u jedinců s prokázanými genetickými předpoklady pro výskyt či přenos progresivní degenerace tyčinek a čípků (PRA-prcd).

## **3. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

### **3.1 Struktura genu a genomu**

Během posledních několika desetiletí se intenzivně pracuje na přesném rozluštění genetických informací, které by mohly být klíčem například k objasnění evoluce, pochopení embryonálního vývoje, vysvětlení výskytu závažných chorob a mnoho dalšího. Důležité jsou poznatky v oblasti struktur genomu a genu.

Existuje několik definic pro tyto pojmy. Obecně známá je definice, kdy gen je základní jednotka genetické informace či určitý úsek DNA (sekvence nukleotidů) na chromozomu. Vyšší jednotkou je genom, který je definován jako kompletní sestava genů organismu (Brown, 2007). Dále to také může být odborné označení pro soubor veškerého genetického materiálu buňky, jedince, druhu a vyšších taxonomických kategorií (Hruban a Mazlík, 2000).

#### **3.1.1 Struktura savčího genomu**

Studium lidského a zvířecího genomu se odvíjí od komplexní znalosti struktury genomu eukaryot. Hlavní genom savců se nachází v buněčném jádře. Dále existuje ještě genom vedlejší neboli cytoplazmatický, který je uložen v mitochondriích. Savčí genom se skládá z genů majících kódující funkce a z nekódujících DNA sekvencí. Z velké části (až kolem 95 %) je genom tvořen právě nekódujícími sekvencemi DNA. Zbývající část genomu je zastoupena strukturálními geny, jež nesou genetickou informaci pro syntézu polypeptidových řetězců. Počet strukturálních genů u savců je odhadován na přibližně 100 000 v závislosti na velikosti genomu daného druhu.

Každý gen či anonymní nekódující sekvence má na chromozomu své specifické místo, které je většinou stálé, i když jsou známy i výjimky. Toto místo se odborně nazývá lokus. Zmíněné výjimky jsou transpozibilní elementy, kterým se připisuje úloha vzniku větší genetické variability a význam v rámci evoluce (Gazdová, 2007).

#### **3.1.2 Struktura savčího genu**

Gen jakožto základní funkční jednotka dědičnosti nese genetickou informaci pro jeden polypeptidový řetězec. Tato charakteristika odpovídá hledisku molekulární genetiky. Z pohledu klasické mendelistické genetiky je gen chápán jako

jednotka genetické analýzy, jež se používá u dědičných znaků, u kterých je objasněna jejich přibližná lokace na chromozomu, ale není znám jejich polypeptidový produkt. Současně používané definice uvádějí, že strukturní gen je sekvence nukleotidů nesoucí genetickou informaci, jež po transkripci a translaci řídí jeden polypeptidový řetězec (Snustad a Simmons, 2010). Strukturní geny mají různé velikosti. Podle tohoto kritéria je lze dělit do několika skupin. Malé geny jsou velké přibližně okolo 500 bp. Velikost středních a velkých genů se pohybuje v rozmezí 1200 až 20 000 bp. Poslední skupinou jsou obří geny, kdy jejich velikost dosahuje až ke 2 miliónům bp (Hruban a Majzlík, 2000).

### 3.1.3 Struktura psího genomu

Dědičné informace jsou u psů uloženy v 78 chromozomech, tedy v 39 párech (Procházka, 2005). Pes má ve srovnání s člověkem méně genů, přesněji 20 439. Ty činí pouze 5 % celé DNA a větší část DNA nic nekóduje (Dostál, 2007).

Pes je pátým savcem, u kterého byl analyzován genom, jehož velikost je 2,4 Gbp (Kirkness a kol., 2003). Pro porovnání genom myši je o velikosti 2,5 Gbp (Waterston a kol., 2002) a velikost lidskému genomu činí 3,1 Gbp (Peter, 2005). To znamená, že psí genom je o 18 % menší než genom člověka a o 6 % menší než u myši. Ve struktuře genomu se objevují repetitivní sekvence, jejichž podíl je zhruba 31 %, to je opět méně nežli u lidského genomu (46 %) a genomu myši (38 %) (Kirkness a kol., 2003). Nejběžněji se objevujícím mikrosatelitním motivem genomu psa je  $(CA/GT)_n$ . Pro mapování mají velký význam zejména tetranukleotidové repeticity  $(GAAA)_n$ , které se vyskytují v celém genomu a vykazují vysokou hladinu polymorfizmu (Francisco a kol., 1996). Délka mitochondriálního genomu je přibližně 16,7 kbp a zahrnuje regulační oblasti 13 ORFs, 22 genů pro tRNA a 2 geny pro rRNA (Kim a kol., 1998).

V současné době jsou uveřejněny výsledky dvou projektů, jež se zabývaly sekvencemi genomu psa. První provedl americký genetik J. C. Venter na svém pudlovi, kdy jeho sekvence genomu byla použita při výzkumu očních chorob a pomohla při porozumění vzniku dalších onemocnění (Whitfield, 2003). Ve druhém projektu k získání genomových sekvencí figurovalo plemeno boxer (Lindblad, 2005).

### 3.2 Dědičná onemocnění psů

Chovatelé vyžadují v rámci chovu, aby psi splňovali jejich určité požadavky. Jedním z nejdůležitějších aspektů pro plnění chovatelských nároků u všech zvířat, psy nevyjímaje, je výborný zdravotní stav (Svoboda a kol., 2000). Chovatelský tlak na specifické vlastnosti psů dal vzniknout více než 400 plemenům (včetně neuznaných), jež se využívají k nejrůznějším činnostem (Dostál, 1995). Plemena je možné dělit podle několika kritérií. Nejběžnější způsob je zařazení plemen do deseti skupin podle nomenklatury FCI (Mezinárodní kynologické federace). Plemena psů je možné dělit i do čtyř genetických skupin na základě analýzy mikrosatelitů DNA:

- 1 - ancestrální plemena nejbližší vlkům;
- 2 - molossoidní plemena, německý ovčák;
- 3 - ovčácká plemena, barzoj, irský vlkodav, greyhound a svatobernardský pes;
- 4 - ostatní, hlavně lovecká plemena evropského původu (Císařovský, 2008).

Během šlechtění psů vznikla řada standardů plemen. Systém chovu do nedávné doby přehlížel extrémní výklad standardů, což negativně ovlivňovalo kvalitu života psů či dokonce bylo příčinou vzniku různých dědičných chorob. V dnešní době se šlechtitelské kluby snaží tuto skutečnost napravit a poupravují standardy tak, aby se odstranily nejhorší následky dlouhodobého šlechtění (Fogle, 2005).

Též na základě nevhodných metod plemenitby se rozšířilo mnoho vrozených vad. Například příbuzenská plemenitba prokazatelně zvyšuje riziko výskytu dědičných nemocí (Wachtel, 1998). V praxi by se bezpochyby uplatnilo opatření, kdy by každé chované zvíře mělo omezený počet vrhů. Snížila by se tím šance přenosu nemocí na potomky a dále by to přispělo k navýšení genetické variability populace, což je v chovech žádoucí (Leroy, 2011).

Dědičné onemocnění je definováno jako nemoc vznikající odchýlením ve složení DNA (tj. mutací) v buňkách zárodečné linie. Přenáší se tedy gametami z generace na generaci. Komplikace způsobené mutací se mohou projevit už během prenatálního vývoje a někdy mohou být i příčinou embryonální mortality. V případě, že se jedinec narodí s trvalým poškozením, se hovoří o kongenitálním čili vrozeném onemocnění (Svoboda a kol., 2000).

V současnosti je evidováno přibližně 500 dědičných chorob. Pouze kolem desetiny jich je dokonale objasněna až na molekulární úrovni, kdy je u nich popsána kauzální mutace DNA (Dostál, 2007).

V nedávné době vznikly speciální databáze dědičných chorob psů, které slouží jako informační zdroj pro majitele, chovatele a veterinární lékaře. Nejznámějšími databázemi jsou Canine Inherited Disorders Database (CIDD), Inherited Diseases in Dogs (IDID) a Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA) spolupracující s databází Listing of Inherited Disorders in Animals (LIDA). Tyto databáze poskytují stručný přehled dědičných onemocnění a defektů včetně způsobu dědičnosti a predispozice daných plemen (Nicholas a kol., 2011).

### **3.2.1 Dědičnost nemocí**

Při sledování dědičných defektů a chorob je potřeba věnovat pozornost zejména jejich genetické podstatě. Od toho jsou následně vyvozovány způsoby jejich účinné selekce v chovech (Dostál, 1995).

Dědičnost lze dělit podle několika kritérií. Z pohledu počtu zúčastněných genů se rozlišuje dědičnost monogenní, polygenní a multifaktoriální. Monogenní dědičnost je podmíněna pouze jedním genem velkého účinku, tj. majorgenem. U polygenní dědičnosti se na výsledném znaku podílí více genů malého účinku tzv. minorogeny. V případě multifaktoriální dědičnosti, kdy působí více genů, se musí brát ještě v potaz negenetické faktory.

Dalším hlediskem může být uložení genů na dvou různých typech chromozomů. Pohlavní chromozomy se odborně nazývají gonozomy a nepohlavní jsou autozomy. Jelikož má samčí a samičí pohlaví rozdílnou kombinaci pohlavních chromozomů, není dědičnost genů na nich uložených pro obě pohlaví stejná. Naopak dědičnost genů z nepohlavní chromozomů je stejná pro obě pohlaví. Na základě toho se dělí dědičnost na autozomální a gonozomální.

Je nutno zmínit, že ani vztahy mezi alelami, konkrétními formami genu, nejsou úplně rovnocenné. V tomto případě se vychází z dominance a recesivity, kdy se dělí dědičnost na dominantní a recesivní (Šípek a kol., 2008 - 2016).

U monogenních dědičných chorob je nejlépe odhalitelný autozomálně dominantní typ dědičnosti, pro který platí klasické Mendelovy principy. Je třeba

podotknout, že striktní klasifikace na dominantní a recesivní není vždy zcela jednoznačná a neměnná (Hatina a Sykes, 1999).

U autozomálně recesivních i dominantních dědičností platí stejná pravidla pro obě pohlaví, protože jsou podmíněny geny, jež jsou uloženy na nepohlavních chromozomech (Šípek a kol., 2008 - 2016).

#### **Autozomálně recesivní dědičnost**

Recesivní alela se fenotypově projevuje pouze v případech, jedná-li se o recesivního homozygota vlastního obě recesivní alely příslušného genu. Recesivní homozygot je postižen onemocněním a přenáší na další generace pouze mutovanou alelu. Potomci recesivních homozygotů jsou vždy alespoň přenašeči onemocnění, pokud druhým rodičem byl naopak dominantní homozygot tedy zcela zdravý jedinec. Skrytý heterozygotní přenašeč je v chovech velké riziko, jelikož se fenotypově jeví jako zdravý, ale přitom nese mutovanou alelu. Pokud jsou oba rodiče heterozygotní přenašeči, narodí se jim v 50 % případů potomek též přenašeč a se stejnou pravděpodobností 25 % se může narodit zdravý (dominantní homozygot) i nemocný potomek (recesivní homozygot) (Šípek a kol., 2008 - 2016).

#### **Autozomálně dominantní dědičnost**

Dominantní alela značně působí na vznik choroby. Nemocný rodič vždy předává svou dominantní alelu na potomka, u kterého se zpravidla dané onemocnění projeví. Avšak dominantní dědičnost je úplná a neúplná. V případě úplné dominance stačí pouze jedna dominantní alela k rozvoji onemocnění v plném rozsahu. Fenotypové rozlišení heterozygota od dominantního homozygota není možné. V klinické genetické praxi se častěji objevuje neúplně dominantní dědičnost, při níž je možnost rozlišit heterozygotního jedince od dominantně homozygotního. Klinický stav je totiž v případě dominantního homozygot závažnější (Šípek a kol., 2008 - 2016; Svoboda a kol., 2000).

#### **Gonozomálně dominantní a recesivní dědičnost**

Tato dědičnost je vázaná na geny uložené na pohlavních chromozomech, pohlavních chromozomech. U savců jsou samice homogametní (XX) a samci jsou heterogametní (XY). Klinicky významné jsou zpravidla geny uložené na chromozomu X. Častěji jsou gonozomálními dědičnými chorobami postiženi samci vlastníci pouze jeden chromozom X (Šípek a kol., 2008 - 2016).



### 3.3 Oko psa a jeho dědičné choroby

V posledních několika letech se zájem chovatelů a chovatelských klubů stále více zaobírá problematikou a dědičností zdraví psů. Celá řada onemocnění oka má genetické predispozice, které je nezbytné v chovech psů pečlivě sledovat a zkoumat.

#### 3.3.1 Anatomie a fyziologie oka

Oko je umístěno v očníci neboli v očním důlku. Hloubka uložení se liší nejen u jednotlivých druhů zvířat, ale i v rámci plemen jednoho druhu. Celkový vzhled očí je ovlivněn právě hloubkou uložení oka, dále stavbou očních víček a tvarem oka (Duchková, 2007).

Oko je tvořeno oční koulí (*bulbus oculi*), do které vstupuje zrakový nerv a přídatné oční orgány (*organa oculi accessoria*), jimiž jsou oční víčka, spojivky, slzný aparát a okohybné svaly.

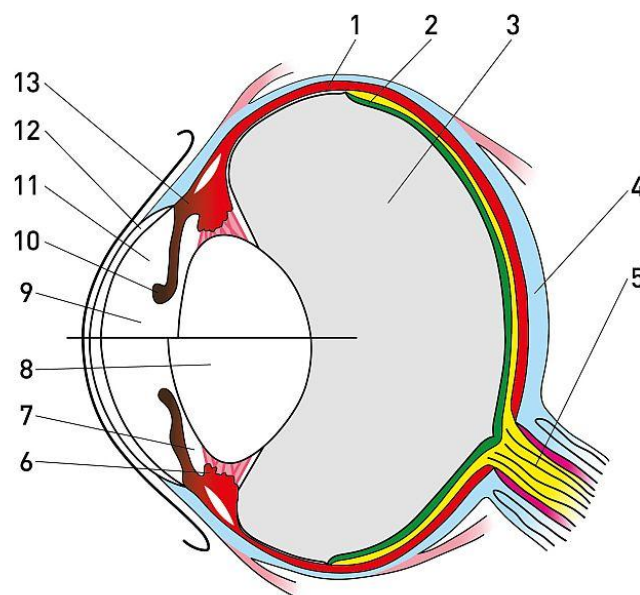
Oční koule se skládá ze tří odlišných vrstev - fibrózní, vaskulární a nervové. Fibrózní vrstvu oka utváří vazivový obal s podpůrnou funkcí, jehož součástí je průhledná rohovka přecházející v bělimu. Vaskulární vrstvu představuje cévní obal, který je složen z cévnatky, rostrálně umístěného řasného tělesa a centrálně uložené duhovky. Hlavní částí vnitřní nervové vrstvy oka je sítnice, která je citlivá na světlo.

Rohovka (*cornea*) nacházející se v přední části bulbu umožňuje vstup světla do nitra oční koule. Zvětšením poměru povrchu rohovky k bělimě se dosáhne větší propustnosti pro světlo. Zvířata s noční aktivitou ve srovnání se zvířaty denními mají poměrně větší plochu rohovky. U psa jakožto zvířete s denní aktivitou představuje rohovka přibližně 17 % povrchu oční koule (Reece, 2011). Bělima (*sclera*) tvoří ochranný obal pro hlubší vrstvy oka a v zadní ventrolaterální části je proděravěna drobnými otvory, kterými prochází vlákna zrakového nervu ze sítnice (Marvan a kol., 2011).

Cévní obal je tenká vazivová blanka, ve které je uloženo velké množství cév a pigmentů. Uveální trakt zahrnuje cévnatku, řasnaté těleso a duhovku. V zadní části cévního obalu se nachází cévnatka (*chorioidea*), jež vpředu přechází v řasnaté těleso (*corpus ciliare*). Na řasnatém tělesu je upevněna pomocí závěsného aparátu

čočka. Duhovka (*iris*) je zbarvená část oka ovlivňující množství světla, které může do oka proniknout. Duhovka je umístěna tak, že rozděluje prostor mezi rohovkou a čočkou na přední a zadní oční komoru. Otvor duhovky o různé velikosti se označuje jako zornice. Zornice (*pupila*) má u psů kulatý tvar (Lenská, 2008; Marvan a kol., 2011; Reece, 2011).

Čočka (*lens*) je bezbarvá a neobsahuje cévy ani nervy. Čočka je uložena za zornicí a při akomodaci mění svůj tvar. Sklivec (*corpus vitreum*) je čirá rosolovitá hmota tvořena z 98 % vodou. Vyplňuje prostor mezi čočkou a sítnicí oka (Marvan a kol., 2011).



- 1 - cévnatka; 2 - sítnice; 3 - sklivec; 4 - bělima; 5 - oční nerv;  
 6 - řasnaté těleso; 7 - zadní oční komora; 8 - čočka; 9 - zornice;  
 10 - duhovka; 11 - přední oční komora; 12 - rohovka;  
 13 - řasnaté těleso

**Obrázek 1:** Stavba oka psa (Dančová, 2015)

Pro tuto práci je nejdůležitější částí oka sítnice. Sítnice (*retina*) je vnitřní inervovaná vrstva oka. Skládá se z deseti vrstev. Retina má zřetelnou a slepou část. Zřetelná část je tvořena světločivnými buňkami. Jedná se o fotoreceptory, tj. tyčinky a čípky, jež jsou umístěny blízko zevního povrchu sítnice. Lze je obecně označit jako fotoreceptorové buňky, které přeměňují světlo na nervový impuls. Tyčinky slouží k černobílému vidění a čípky jsou přizpůsobené pro vidění barevné. U denních zvířat převládá počet tyčinek nad počtem čípků. Tyčinky jsou vysoké a štíhlé buňky, v jejichž výběžku je uložen rodopsin (zřetelný purpur). Jedná se o látku bílkovinnou

povahy, která má funkci specifického světelného stabilizátoru. Čípky mají podobnou stavbu jako tyčinky, ale jsou celkově kratší, robustnější a neobsahují rodopsin. Vmezežené bipolární neurony spojují tyčinky a čípky s gangliovými buňkami. Ty jsou uloženy ve vnitřní vrstvě sítnice. Neurity gangliových buněk tvoří po výstupu z oka zrakový nerv, jenž končí podkorových centrech mozku. V sítnici se vyskytují i podpůrné neurogliové buňky. Slepá skvrna sítnice je místo, kde z oka vystupuje zrakový nerv. Nedochází zde k recepci, protože tu nejsou přítomny tyčinky ani čípky. Fuscín způsobuje černé zbarvení sítnice. To napomáhá absorpci světla a zabraňuje vnikání nekontrolovaných světelných odrazů, které pronikají do ostatních částí oka (Marvan a kol., 2011; Reece, 2011).

### **3.3.2 Přehled nejčastěji se vyskytujících očních vad**

Nezisková organizace CERF (Canine Eye Registry Foundation) je jednou z nejvýznamnějších světových organizací zabývajících se genetickou vazbou dědičných očních vad u psů. Od roku 1974 shromažďuje informace o genetické predispozici všech plemen (Beránek, 2001).

Na prvním místě v řadě dědičných chorob oka stojí jednoznačně onemocnění sítnice, které je odborně označováno jako progresivní retinální atrofie (PRA) (více v kapitole 3.4 - Progresivní retinální atrofie). Obdobou je kongenitální stacionární noční slepota (CSNB) u briardů.

Dalším velmi častým onemocněním postihující více než 70 plemen je katarakta čili vrozený šedý zákal, který má mnoho forem. Šedý zákal se vždy vyvíjí oboustranně, i když na každém oku může být průběh jiný. Podle toho, zda není, či je současně pozorován i jiný defekt oka, se hovoří o primární nebo sekundární kataraktě (Dostál, 2007).

Anomálie oka kolí (CEA) je onemocnění projevující se různým stupněm poškození důležitých částí oka. Kolie v USA prý trpí genetickými poruchami oka v 70 % (Wachtel, 1998). Toto onemocnění se týká i příbuzných plemen.

Při onemocnění primární luxaci čočky dochází k uvolnění oční čočky ze své pozice vedoucí až k oslepnutí (Beránek, 1998).

Dále jsou dědičné nemoci jako je glaukom (zelený oční zákal), hemeralopia (denní slepota) nebo perzistující papilární membrána (Dostál, 2007).

### 3.3.3 Vyšetření oka a genetické testy

Každé veterinární vyšetření by mělo nejprve začínat podrobnou anamnézou. Ze získaných informací lze totiž přesněji stanovit diagnózu. Veterinární lékař se zpravidla dotazuje na dosavadní průběh a vývoj onemocnění či jakých změn si majitel všiml při nasazení terapie. Většinou jsou dodržovány postupy, které udávají předem vytvořené dotazníky nebo protokoly. Nezbytností pro vyhodnocení vyšetření je znalost plemenných predispozic.

Klinické vyšetření očních struktur je nutné provádět vždy s celkovým vyšetřením zvířete pro možnost manifestace celkových systémových onemocnění na očním bulbu. Nelze opomenout periokulární vyšetření včetně posouzení stavu nozder. Zpravidla se posuzuje charakter orbity obou očí, oční reflexy, víčka včetně jejich okrajů, třetí víčko, spojivka, rohovka, přední oční komora, iris, pupila, čočka, sklivec, fundus i nitrooční tlak. Dále se někdy zaměřuje i na pupilární, víčkový a korneální reflex.

Mezi základní vyšetřovací techniky očí u psů patří vyšetření s použitím světelného zdroje, barvicí techniky, oftalmoskopie, cytologie, Schirmerův slzný test, průchodnost nazolakrimální duktu, tonometrie a gonioskopie.

Ke specifické oftalmologické diagnostice se využívá metod jako je vyšetření štěrbinovou lampou, rentgenologie, dakryocystorinografie, orbitální venografie, počítačová tomografie a magnetická rezonance, elektroretinografie (ERG), ultrasonografie, paracentéza a fluorescenční angiografie (Svoboda a kol., 2000).

Pro posouzení dědičného onemocnění progresivní degenerace tyčinek a čípků sítnice se běžně využívá oftalmoskopie a elektroretinografie. ERG se považuje za účinnější oftalmologické vyšetření, které odhalí onemocnění podstatně dříve (Beránek, 1998).

V současnosti se přistupuje k diagnostice dědičných chorob a vad i pomocí genetických testů. Ty jsou průkazné i v případě přenašečů daného onemocnění. U některých plemen se dokonce toto vyšetření vyžaduje. V ČR je pouze genetická laboratoř Genomia s.r.o., která se touto problematikou zabývá a spolupracuje se zahraničními laboratoři jako je například OptiGen® (USA).

### **3.4 Progresivní retinální atrofie (PRA)**

Progresivní retinální atrofie je dědičné onemocnění mající za následek odumírání světločivných buněk sítnice, což v pozdějším věku končí neodvratně oslepnutím postiženého psa. Onemocnění lze rozlišit do dvou forem. První forma, označovaná jako generalizovaná, se odborně nazývá primární retinální dystrofie typu I či periferní progresivní retinální atrofie. Druhá forma se odborně pojmenovává primární retinální dystrofie typu II neboli centrální retinální atrofie. Ačkoliv se oba tyto typy PRA dědí odlišně, čímž lze říci, že se jedná o dvě samostatná onemocnění, jsou běžně shrnována pod jednotný název.

Progresivní retinální atrofie typu I se vyskytuje hromadně v některých liniích psů rozlišných plemen. Poprvé byla popsána u gordonsetrů z anglického chovu ve Švédsku na začátku 20. století. Později bylo toto onemocnění odhaleno také u irských setrů, středních a trpasličích pudlů, kokršpanělů, špringršpanělů, norských losích psů, dlouhosrstých trpasličích jezevčíků, foxteriérů, jorkširských teriérů, kernteriérů, tibetských teriérů, sealyham teriérů, drenských dlouhosrstých ohařů, velškorgi cardigan a mnoho dalších. PRA typu II byla poprvé popsána až o 50 let později, v roce 1954. Objevuje se spíše sporadicky či plošně v některých liniích zvláště u labradorských a zlatých retrívrů, plemen odvozených od kolií, pudlů, vzácněji u německých ovčáků a boxerů. Poznatky z praxe nasvědčují tomu, že se obě výše zmíněné formy nevyskytují současně. Nicméně obě formy nejsou zdaleka tak podrobně popsány, aby bylo zcela objasněno vše podstatné (Suchý, 2006).

#### **3.4.1 Popis a příznaky onemocnění**

Obecně lze říci, že progresivní retinální atrofie je defekt oka, kdy dochází k postupné degeneraci vrstvy buněk sítnice. Je známo více forem atrofie sítnice. Formy uvedené výše (periferní a centrální) vycházejí z oblastí prvotního výskytu degenerace a jakým směrem se poškození posunuje. Periferní atrofie se projevuje nejprve na obvodu sítnice a postupně se rozšiřuje směrem do centrálních částí. Centrální forma okamžitě zasahuje středovou část retiny.

U všech plemen psů jeví formy PRA určité společné charakteristické příznaky. Nejdříve postižení psi vykazují stejný symptom, kterým je nedostatečné noční vidění

(nyctalopia, noční slepota). Postupem času se jejich stav zhoršuje, problémy se začnou objevovat i při denním vidění, až dojde k úplnému oslepnutí. Proces obvykle postupuje pomalu a může trvat měsíce i roky. Vždy jsou postiženy obě oči. Často je toto onemocnění spojováno s výskytem katarakty čili šedým zákalem oční čočky (Dostál, 2007).

### 3.4.2 Formy progresivní retinální atrofie

Zpravidla mají formy PRA podobné příznaky, ale mají rozdílný průběh a jsou způsobeny mutací různých genů. Tyto poruchy sítnice je možné rozdělit podle věku projevu na časnou a pozdní formu (Mellersh, 2014).

Časná forma (early-onset), někdy také označována jako vývojová forma PRA, vyplývá z abnormálního vývinu tyčinek a čípků v postnatálním období. Jedná se tak o dysplazii fotoreceptorů, kdy dochází ke strukturálním změnám světločivných buněk oka (Parshall a kol., 1991). Podle rychlosti těchto změn a odlišných průběhů ztráty zraku se časná forma ještě dělí na rychlé a pomalé (Dostál, 2007).

Formy postupující rychleji jsou:

- **erd** (early retinal degeneration) - raná degenerace sítnice;
  - **rcd1** (rod-cone dysplasia 1) - dysplazie tyčinek a čípků 1, kdy je příčinou inzerce 44 bází do struktury DNA genu RPGRIP1 (Mellersh a kol., 2006);
  - **rcd2** (rod-cone dysplasia 2) - dysplazie tyčinek a čípků 2;
  - **rcd3** (rod-cone dysplasia 3) - dysplazie tyčinek a čípků 3;
- a mezi pomalejší formy, jež postihují jedince středního stáří se řadí:
- **pd** (photoreceptor degeneration) - dysplazie fotoreceptorů;
  - **rd** (rod dysplasia) - dysplazie tyčinek.

Pozdní forma (late-onset) je následkem degenerace fotoreceptorů, jež byly normálně vyvinuty. Choroba má pozvolný průběh a její vývoj je specifický dle zasažené oblasti sítnice. Mezi degenerativní formy PRA patří:

- **prcd** (progressive rod-cone degeneration) - progresivní degenerace tyčinek a čípku, podrobněji popsána v kapitole 3.5;
- **XLPPRA** (X-linked progressive retinal atrophy) - PRA dědičně vázaná na samičí pohlaví. Výskyt XLPPRA byl doposud odhalen jen u dvou plemen (sibiřský husky,

samojed). Mutace způsobující toto onemocnění byla popsána v kandidátním genu na lokusu X chromozomu (Aguirre, 2001; Mellersh 2014).

### 3.4.3 Diagnostika

Nemoc je často odhalena až ve vyšším věku, kdy už nemocný pes po sobě zanechal potomstvo, které může být taktéž postiženo. První příznaky výskytu se objevují v různém věku v závislosti na plemeni. Například u dlouhosrstých jezevčíků se obvykle projeví už ve stáří 12 měsíců, u anglických ohařů ve stáří 2 let a u miniaturních pudlů až ve věku 6 - 9 let. Avšak uvedená staří jsou pouze orientační a mohou se lišit případ od případu (Dostál, 2007).

Obvykle bývá diagnostika prováděna klinickým vyšetřením oka, ale to nemusí vždy onemocnění okamžitě prokázat. V současnosti je známo, že změny na sítnici se odhalí elektroretinograficky podstatně dříve, než se vůbec dostaví první klinické problémy se zrakem a také mnohem dříve než při oftalmoskopickém vyšetření (Beránek, 1998; Clements a kol., 1996). Některé formy je už v dnešní době možné odhalit pomocí genetických testů. Testy spolehlivě rozliší, zda se jedná o pozitivní a negativní jedince, ale především odhalí heterozygoty, jež jsou nosiči sledované alely. Bezsporu jsou testy nejvhodnějším diagnostickým prostředkem, který přináší jasné výsledky a provádí se pouze jednou za život jedince (Genomia, 2008 - 2016).

### 3.4.4 Léčba

Ve většině případů nelze toto onemocnění léčit, proto je nutné sledovat jeho výskyt v chovech a snažit se je eliminovat.

Bylo však zjištěno, že u irských setrů je možné defekt léčit. Postižení jedinci trpí nedostatkem enzymu, jež se nazývá cGMP fosfodiesteráza. Enzym je potřebný pro zajištění normálního metabolismu v buňkách sítnice. Jeho působení prokazatelně zpomaluje degeneraci sítnice. Enzym je složen z několika katalytických subjednotek ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), kdy při jakékoliv genetické změně, jejíž výsledkem je strukturální změna v jakékoliv subjednotce, znamená změnu v aktivitě enzymu a následné problémy se zrakem. Studie této choroby je velice významná, jelikož princip onemocnění je u lidí a psů totožný (Dostál, 2007).

### **3.4.5 Předpokládané genetické založení**

Formy progresivní retinální atrofie jsou z hlediska genetické kontroly vývoje onemocnění známy jako autozomálně recesivní, autozomálně dominantní a vázané na pohlaví (X chromozom) (Kijas a kol., 2002).

### **3.5 Progresivní degenerace tyčinek a čípků (prcd)**

Pozdní forma PRA, označovaná jako progresivní degenerace tyčinek a čípků (PRA-prcd; progressive rod-cone degeneration), je jednou z mnoha forem defektů retiny. Jednotlivé vady sítnice byly už zmíněny v kapitole výše (3.4.2).

Při tomto onemocnění nejprve odumírají tyčinky, čímž dochází ke zhoršení zraku za šera, proto se mezi první symptomy považuje šeroslepost. Dalším příznakem je rozšíření zornic nemocných psů i při přímém dopadu světla do oka (při fotografování psovi výrazně svítí oči). Dále dochází i ke zhoršení periferního vidění. Později začnou degenerovat na sítnici také čípky. Poslední fází onemocnění je úplná ztráta zraku, které ještě může předcházet šedý zákal čočky (katarakta). Degenerace neprobíhá rovnoměrně po celé sítnici. Spodní část sítnice je postižena dříve a mnohem intenzivněji, ačkoli to při vyšetření oftalmoskopem nebývá zřejmé (Beránek a Vít, 1995).

PRA-prcd je autozomálně recesivní dědičná vada, kdy lokus objasňující prcd byl zmapován na psím chromozomu 9 (CFA9) (Dostál a kol., 2011).

Mezi plemena s predispozicí se řadí anglický a americký kokršpaněl, miniaturní a toy pudl, labradorský retrív, portugalský vodní pes, australský honácký pes, chesapeake bay retrív, Nova Scotia duck tolling retrív a u mnoha další plemen se předpokládají (Petersen-Jones, 2005; Gough a Thomas, 2004).

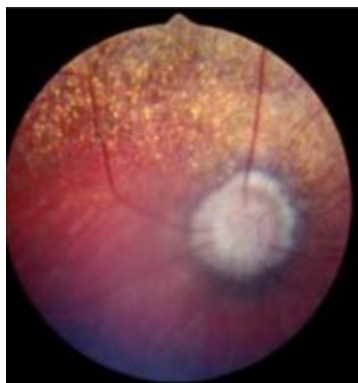
Onemocnění se dá klinicky rozpoznat při dospívání psa. Klinická diagnóza PRA-prcd se provádí pomocí elektroretinogramu (ERG) či oftalmoskopií. Elektroretinogram odhalí postižené jedince mnohem dříve než oftalmoskopie. Například u pudlů ERG ukazuje postižení mezi 9. až 12. měsícem věku, ale oftalmoskopie až ve 3 až 5 letech. Použití ERG testu bývá při stanovení prcd přesné. Klinické vyšetření je nutné provádět několikrát v průběhu života, aby mohlo být onemocnění podchyceno (Beránek a Vít, 1995). Spolehlivou metodou diagnózy



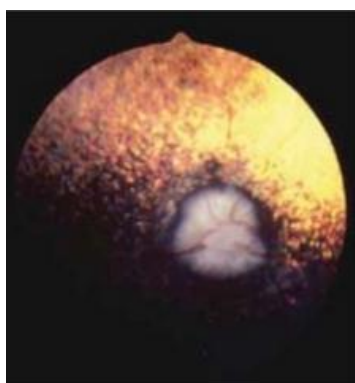
je genetický test, který stačí provést pouze jednou za život jedince a přináší jasný a neměnný výsledek (Genomia, 2008-2016).

Na závěr je třeba zdůraznit, že příznaky, které ukazují na PRA-prcd mohou provázet i jinou oční vadu. Podobně se projevují i další dědičné vady očí jako je noční slepota briardů (CSNB) a anomálie oka kolií (CEA) (Beránek a Vít, 1995).

Obrázky 2, 3 a 4 prezentují abnormality pravděpodobně způsobené PRA-prcd (CHS Siluet Regreway, 2014 - 2016).



**Obrázek 2:** útlum sítnicových cév a bledost zrakového nervu (kokršpaněl)



**Obrázek 3:** zrakový nerv bledý a sotva viditelné sítnicové cévy - zvíře téměř slepé (miniaturní pudl)



**Obrázek 4:** abnormality v dolní části od zrakového nervu a nepatrné zúžení sítnicových cév (kokršpaněl)

### **3.6 Techniky molekulární genetiky využití v diplomové práci**

Molekulárně-genetické techniky využití v diplomové práci se běžně používají i v praxi. Nejprve se izoluje DNA z biologických vzorků. V případě této práce byla izolace provedena pomocí komerčně dostupných kitů v automatickém izolátoru nukleových kyselin. Dále navazuje technika polymerázové řetězové reakce (PCR), která je velmi významná v oblasti studia genů. Princip této techniky spočívá v tom, že se krátký úsek molekuly DNA mnohonásobně namnoží pomocí enzymu DNA polymeráza. PCR nachází řadu uplatnění v genetickém výzkumu a obecně v biologii vůbec. Následuje agarózová gelová elektroforéza PCR produktů, jež se užívá k potvrzení správného průběhu experimentu. Pokračuje se aplikací restriční endonukleázy na produkty PCR, čímž se zjistí přítomnost restričních míst na amplifikovaném úseku templátové DNA. Jedná se o tzv. analýzu polymorfizmu délky restričních fragmentů (RFLP). RFLP je významný nejenom při konstrukci genomových map, ale také při studiu genetických chorob. Zmíněné techniky jsou podrobně popsány níže.

#### **3.6.1 Izolace DNA**

Prvním krokem pro získání informací z DNA je její izolace z biologického materiálu. Molekuly DNA, jež se v buňce vážou na různé proteiny a soli, jsou uzavřeny v buněčných kompartmentech. Důležité je zvolení efektivní metody, která dokáže zmíněné vazby narušit a oddělovat z nich cílovou DNA. Avšak je nutné zachovat příznivé podmínky podobné těm fyziologickým pro nenarušení nukleové kyseliny. Zejména se jedná o udržení příznivého pH a použití chemikálií, které nevyvolají fragmentaci ani denaturaci DNA. K izolaci DNA se používá řada postupů, které mají víceméně základní principy totožné. Nejdříve dojde k homogenizaci, tj. rozrušení živočišné tkáně, následuje rozklad fosfolipidových dvojvrstev a precipitace nukleových kyselin, zakončeno purifikací. Finálním krokem při izolaci je kontrola celistvosti a koncentrace vyizolované DNA (Beránek, 2016; LabGuide, 2014).

V dnešní době je známo několik izolačních postupů. Vždy je nutné zvolit ten nejhodnější s ohledem na to, pro jaké účely bude DNA použito.

Například izolace DNA pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon) je metoda využívaná zejména pro izolaci nukleových kyselin z rostlinných pletiv (Borges a kol., 2009).

Klasickým způsobem izolace genomové DNA je fenol-chloroformová izolace. Jedná se o poměrně náročnou a zdlouhavou metodu, jejímž výsledkem je velké množství velmi čisté DNA. Nejprve dojde k mechanickému narušení tkání či pletiv, následuje rozrušení celistvosti buněk a natrávení proteinů působením lyzačního roztoku. Poté probíhá opakované pročišťování roztoku od proteinů pomocí fenol-chloroformu v kombinaci s centrifugací. Dále pokračuje proces izolace precipitací DNA pomocí přidavku ethanolu a octanu sodného. Na to navazuje extrakce DNA z roztoku. Výsledného roztoku DNA je dosaženo rozpuštěním DNA ve vodě či pufru (Köchl a kol., 2005; LabGuide, 2014).

Další způsob je izolace DNA chelexem. Jedná se o často používanou metodu ve forenzní genetice, kde je třeba izolovat DNA z velmi malého množství vzorků. Extrakce DNA pomocí chelexu 100 je velmi rychlá a poměrně levná záležitost. Tato metoda poskytuje dostatečné množství DNA pro její vyhodnocení PCR reakcí. Avšak DNA získaná touto metodou není dostatečně čistá, aby mohla být použita v dalších postupech. Chelex je pryskyřice skládající se ze styren divinylbenzen kopolyméru, jež obsahuje párové iminodiacetátové ionty. Tyto ionty hrají při izolaci důležitou roli při vyvazování  $Mg^{2+}$  iontů, které by mohly vést k poškození izolované DNA. Izolace probíhá ve třech základních krocích. Nejprve je proces zahájen homogenizací vzorku, dále navazuje destrukce buněčných komponent vlivem alkalického prostředí a vysoké teploty. Na závěr probíhá separace roztoku obsahujícího DNA od zbytků buněčných komponent a chelexu (LabGuide, 2014; Walsh a kol., 1991)

Vedle různých izolačních postupů existují i komerčně dostupné izolační soupravy, tzv. kity obsahující připravené reagentie k přímému použití v automatických izolátorech nukleových kyselin. Kity se využívají především v praxi, kde zajišťují rychlou izolaci nukleových kyselin s dostatečnou kvalitou a čistotou. Tyto kity jsou specializovány na určitý typ vzorku, z něhož se má izolace DNA provádět (Lab Mark, 2015 - 2017).

### 3.6.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je poměrně jednoduchá metoda, při které dochází k selektivní amplifikaci vybraných specifických úseků DNA *in vitro*. Metodu PCR vyvinul americký chemik Kary Banks Mullis v roce 1983. Za tuto práci obdržel společně s Michele Smithem v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii (Snustad a Simmons, 2009).

Nejprve je nutné vytvořit reakční směs PCR. Reakční směs neboli master mix obsahuje několika složek a reakční objem pro jeden vzorek se obvykle pohybuje mezi 20 a 100  $\mu$ l. Poměry a množství reagensů se obvykle různě liší v závislosti na vybrané metodice (Průša, 1997).

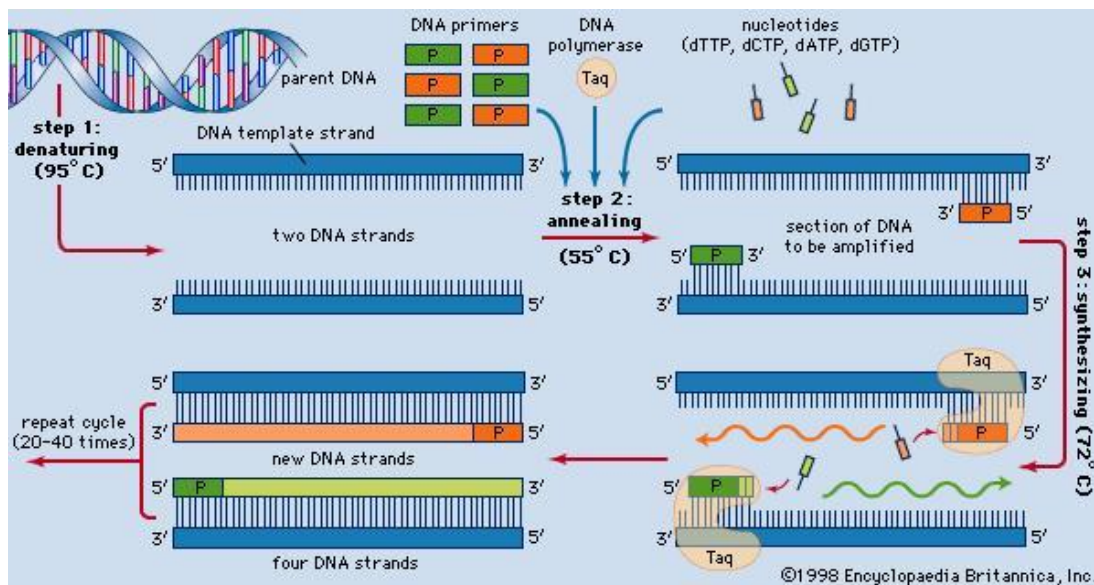
Základní složení reakční směsi PCR:

- **templátová DNA**, jež byla izolována ze vzorků tkáňového původu a je potřeba amplifikovat její specifickou část, která má být předmětem výzkumu;
- **Taq-polymeráza** jedná se o termostabilní enzym pocházející z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, jež je přizpůsobena k životu v horkých pramenech. Existuje více druhů termostabilních DNA polymeráz (uvedeno na konci kapitoly v tabulce 1), ovšem nejčastěji používanou je právě Taq-polymeráza, která bude nadále zmiňována;
- **reakční pufr** dodávající reakci potřebnou koncentraci solí a optimální pH. To ovlivňuje specifitu nasedání primerů;
- **MgCl<sub>2</sub>**, kdy Mg<sup>2+</sup> ionty fungují jako kofaktor Taq-polymerázy;
- **směs nukleotidů dNTPs (deoxynukleotidtrifosfáty)** je složena z dATP, dCTP, dGTP, dTTP ve stejném poměru. Jedná se o prekurzory DNA sloužící k syntéze polynukleotidového řetězce;
- **primery** jsou synteticky připravené oligonukleotidy, zpravidla o délce 10 - 25 bází. Každý z nich je komplementární k jednomu řetězci DNA (Forward, Reverse). Jejich syntéza je katalyzována Taq-polymerázou od 5' konce ke 3' konci, jež začíná působit směrem od primerů;
- **H<sub>2</sub>O**, která musí být sterilní a purifikovaná (Bártová, 2011a; Průša, 1997; LabGuide, 2014).

V některých případech se k dosažení optimalizace průběhu PCR přidávají ještě aditiva. Jedná se o látky jako je například DMSO, formamid, bataine, glycerol,

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, které mohou zvyšovat stabilitu DNA polymeráz či zajistit specifičnost vazby primerů (Laboratoř molekulární biologie rostlin PŘF JU, 2010).

Princip PCR je založen na cyklickém opakování tří kroků lišících se teplotními podmínkami, během nichž dochází k namnožení vybraného úseku DNA. K dosažení specifických teplotních podmínek se využívá uzpůsobený přístroj termocykler, jež automaticky v naprogramovaných časových intervalech mění teplotu. Celý princip PCR po jednotlivých krocích je schematicky znázorněn na obrázku 5.



**Obrázek 5:** Základní kroky polymerázové řetězové reakce (Britannica, 1998)

Základní kroky PCR jsou následující:

(1) Na úplný začátek celého cyklu PCR se zařazuje tzv. **počáteční denaturace**, během níž dojde zahřátím na 95 °C po dobu 2 až 5 minut k inaktivaci proteinázy K. Poté se do směsi přidá *Taq*-polymeráza, která uskutečňuje syntézu při třetím kroku.

První z kroků, jež se několikrát opakují při PCR, se nazývá **denaturace**. Směs je zahřívána na teplotu 92 - 95 °C přibližně po dobu 20 - 45 s, při které se poruší vodíkové můstky, jež k sobě pojí dvě vlákna dvouvláknové molekuly DNA. Dochází tedy k separaci řetězců DNA vlivem vysoké teploty.

(2) Následně se směs zchladí na dobu 30 - 90 s na 50 - 60 °C. Obě vlákna molekuly se mohou opět spojit, obvykle ale k tomu nedochází, jelikož směs obsahuje nadměrné množství krátkých molekul DNA zvaných primery. Ty velmi rychle nasedají na specifická místa molekuly podle principu komplementarity

dusíkatých bází. Vazba oligonukleotidových primerů během cyklu je označována jako **annealing**.

(3) Znovu dojde k navýšení teploty většinou na 72 °C po dobu 45 - 90 s. Tato teplota je optimální pro aktivitu enzymu *Taq*-polymerázy, který se do směsi přidal po počáteční denaturaci. *Taq*-polymeráza se připojuje k jednomu konci každého primeru. Syntetizuje tak nová vlákna DNA, komplementární k templátovým molekulám DNA. Jedná se tedy o syntézu čili **elongaci**, při které vzniknou ze dvou původních vláken čtyři vlákna molekuly DNA.

Celý proces PCR zahrnující denaturaci, annealing a elongaci se znovu několikrát opakuje. Počet těchto cyklů u běžné PCR se obvykle pohybuje mezi 25 a 40. Finálním krokem je **konečná elongace** při 72 °C, při které proběhne během 5 minut dokončení syntézy částečných produktů. Nakonec dojde ke zchlazení PCR reakce na teplotu 4 - 15 °C vhodné k uchování amplifikovaných fragmentů DNA. Výsledným produktem jsou tzv. amplikony, úseky DNA s definovanou délkou, jež jsou obvykle o velikosti desítek až tisícovek párů bází (bp) (Brown, 2007; Hummel, 2003; Bártová 2011a).

Správný průběh reakce a zároveň i funkčnost všech složek reakce je vždy nutné ověřit. K analýze PCR produktů mohou být použity různé metody jako je např. hybridizace, ELISA nebo sekvenční analýza. Zřejmě však nejužívanější metodou separace amplikonů je agarózová gelová elektroforéza (ELFO), která je poměrně snadná a levná (podrobněji popsáno v kapitole 3.6.4 - Gelová elektroforéza) (Bursová a kol., 2014).

Polymerázová řetězová reakce slouží k namnožení vybraného materiálu pro další biotechnologické metody. Nalézá tak využití v biologických a lékařských oborech, zvláště při diagnostice dědičných a infekčních onemocnění, určování paternity, klonování genů, také patří k základním metodám forenzní (soudní) genetiky či archeologii aj. (Bártová, 2011a; Kočárek, 2008).

Tato metoda má několik předností. Jedná se o relativně jednoduchou, rychlou a levnou metodu. Analýza je velmi citlivá a je možné ji provádět i s malým množstvím DNA (Bursová a kol., 2014).

V genovém inženýrství se běžně využívá několik druhů DNA polymerázy. V rámci PCR se používají DNA polymerázy odolávající vysokým teplotám (Brown, 2007). Přehled některých užívaných DNA polymeráz je uveden v tabulce 1.

**Tabulka 1:** Přehled termostabilních DNA polymeráz a jejich charakteristika dle exonukleázové aktivity (podle Průša, 1997)

<b>Polymeráza</b>	<b>5' → 3' exonukleáza</b>	<b>3' → 5' exonukleáza</b>
<i>Taq</i>	ano	ne
<i>Tfi</i>	ano	ne
<i>Tbr</i>	ano	ne
<i>Tth</i>	ano	ne
Stoffelův fragment	ne	ne
<i>Tli</i>	ne	ano
<i>Pfu</i>	ne	ano
<i>Pwo</i>	ne	ano
U1 <i>Tma</i>	ne	ano

### 3.6.3 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) čili polymorfismus délky štěpných fragmentů je metoda, při které dochází k enzymatickému štěpení molekul DNA ve specifickém štěpném (restrikčním) místě enzymem nazývaným se restrikční endonukleáza (Bártová, 2011b). Jednoduše lze říci, že analýza restrikčních fragmentů detekuje odlišnosti DNA, jež ovlivňují štěpná místa. Při této metodě se využívá gelová elektroforéza, aby došlo k rozdělení DNA fragmentů, jež vznikly štěpení dlouhé molekuly DNA restrikčními enzymy, podle jejich velikosti (Campbell a Reece, 2006).

Nejdříve je nutné připravit reakční směs obsahující produkt PCR, specifickou restrikční endonukleázu a pufr. Podstatné je dodržení vhodného poměru daných reagensů. V současnosti je známo přibližně 3000 restriktáz, z nichž je jich cca 600 komerčně dostupných. Restriktázy lze rozlišit podle aktivity na tři hlavní typy (I, II, III). Přičemž v této práci byla použita restriktáza typu I. Dále existuje i několik druhů pufrů. Ty se obvykle dělí podle koncentrace či typu obsažených solí. Standardně se reakce provádí v objemu 25 µl (Sambrook a Russell, 2001).

Vzniklá reakční směs se následně inkubuje při specifické teplotě. Ta se může lišit v závislosti na použitém enzymu. U většiny enzymů je optimální teplota reakce 37°C. Štěpení je zpravidla prováděno po dobu 1 - 2 hodin, přičemž lze štěpit i přes noc,

ale je nutné brát zřetel, že s prodlužující se inkubací lze očekávat zvyšující se riziko star aktivity (nespecifické náhodné štěpení) (LabGuide, 2014).

Výsledek reakce je vyhodnocen pomocí elektroforetické separace. Na základě počtu a velikosti získaných fragmentů lze sledovat rozdíly ve studovaných sekvencích, tzv. polymorfismy. Polymorfismy v délkách restrikčních fragmentů se vytvářejí v souvislosti s přestavbami ve studované sekvenci, čímž se způsobuje změna počtu restrikčních míst (Bártová, 2011b).

### **3.6.4 Gelová elektroforéza (ELFO)**

Gelová elektroforéza se řadí mezi nejpoužívanější separační techniky sloužící k analýze nukleových kyselin a proteinů (Bártová, 2011c). Při gelové elektroforéze dochází ke třídění fragmentů DNA založeném na rozdílné molekulové hmotnosti, respektive délce. Samotný princip je triviální. K oddělení velkého množství fragmentů DNA slouží jakési molekulární síto, jež umožňuje pohyb DNA ve vodném roztoku. Zmíněnou funkci zastávají různé typy gelů, které jsou tvořené dlouhými vlákny polymerů zesíťovanými ve vodném roztoku do podoby trojrozměrné sítě. Délka fragmentů je udávána v jednotkách bp, tj. párů bází. Volba použitého gelu je do značné míry závislá na velikosti a vzdálenosti analyzovaných fragmentů DNA (Raclavský, 1999). Převážně se používají dva druhy gelu, agarózový a polyakrylamidový, kdy se gel z agarózy jeví jako vhodnější síto pro velké molekuly (v řádech několika set nukleotidů), zatímco polyakrylamidový gel se hodí spíše pro rozdělování malých molekul DNA (Snustad a Simmons, 2009).

Agaróza, hlavní složka gelu, je polysacharid odvozený z mořských řas a jedná se o nejčastěji používané elektroforetické medium (Průša, 1997). Ve vodném roztoku má při nižších teplotách podobu kompaktního gelu a při vyšších teplotách taje, čímž vytváří viskózní roztok. Teplota tání se liší v závislosti na typu speciálně upravené agarózy a její koncentraci.

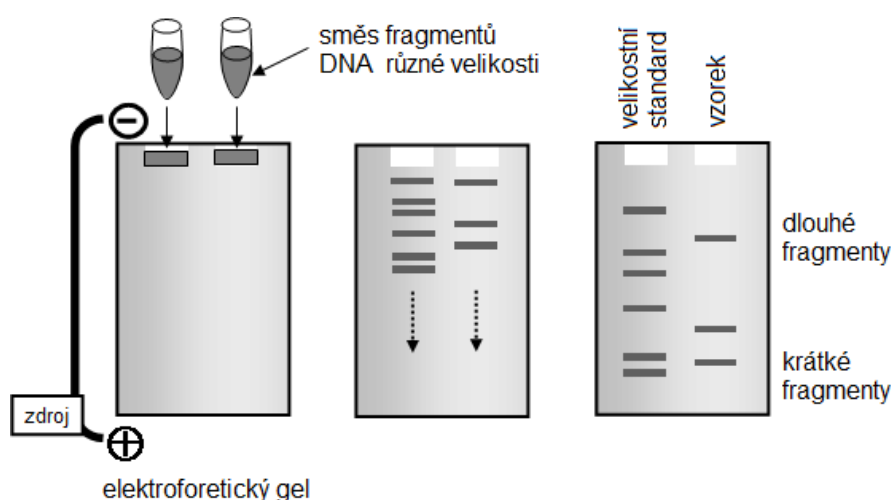
Běžný postup výroby samotného gelu spočívá v několika jednoduchých krocích. Nejprve se smíchá komerčně dostupný prášek agarózy s odpovídajícím množstvím pufru a vzniklá směs se zahřeje, aby se agaróza zcela rozpustila. Po mírném vychladnutí se přidá fluorescenční barvivo (např. ethidium bromid nebo barvivo typu SYBR Green), které se váže na nukleové kyseliny a zviditelňuje je při prosvícení



gelu UV zářením. Je třeba zmínit, že ethidium bromid je silně mutagenní interkalující barvivo a je nutné dodržovat předepsané postupy s jeho zacházením. Někdy se ethidium bromid přidává na gel až po proběhlé elektroforéze před UV vizualizací. Na závěr se vzniklý viskózní roztok vlije do připravené speciální formy s tzv. hřebínky, jež v ztuhnutém gelu zanechají jamky pro nanášení vzorků (Raclavský, 1999; Bártová, 2011c).

Vzniklá gelová deska se umístí do speciální aparatury (tzn. elektroforetické vany), která je připojena ke zdroji stejnosměrného proudu (Kočárek, 2008). Do jamek v gelu se postupně nanáší směsi fragmentů DNA jednotlivých vzorků spolu s přidáním tzv. nanášecím neboli vkládacím pufrům, jenž má tmavé zbarvení. Nanášecí pufr zajišťuje během elektroforézy migraci DNA v gelu. Do první jamky se zpravidla nanáší tzv. velikostní marker (hmotnostní standard, DNA ladder) o definované velikosti jednotlivých fragmentů, sloužící jako kalibrační škála molekulové hmotnosti čili velikosti pozorovaných fragmentů. Během elektroforézy dochází k tomu, že záporně nabitě fragmenty DNA jsou přitahovány ke kladné elektrodě (viz obrázek X). Doba průběhu a nastavení velikosti konstantního napětí při horizontální elektroforéze se odvíjí dle toho, o jakou metodu detekce se jedná (ověření kvality DNA, PCR, RFLP) (Bártová, 2011c; Průša, 1997; Kočárek, 2008).

Výsledky elektroforézy jsou vizualizovány na transiluminátoru v UV světle s následnou fotodokumentací a vyhodnocením (Průša, 1997).



**Obrázek 6:** Schéma vizualizace výsledků agarózové elektroforézy (Bártová, 2011c)

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Použitý materiál

Testovaný soubor zvířat obsahoval 120 jedinců různého stáří a pohlaví. K analýze bylo použito několik plemen psů. Nejvíce bylo zastoupené plemeno anglický kokršpaněl s počtem 85 jedinců. Další plemena zastupovali portugalský vodní pes, americký pitbulteriér, bílý švýcarský ovčák, Jack Russell teriér, jezevčík drsnosrstý a dlouhosrstý, sheltie, jorkšírský teriér, čivava, anglický setr, labradorský a zlatý retrívr, bígl, trpasličí pudl. Tito psi byli vždy v zastoupení jednoho až pěti jedinců v rámci daného plemene. Dále bylo analyzováno i pět kříženců. V příloze č. 1 je uvedena tabulka s podrobným popisem analyzovaných psů (číslo vzorku, pohlaví, plemeno), včetně způsobu odběru genetického materiálu a výsledků detekce genotypů. Biologické vzorky k izolaci DNA byly odebrány za souhlasu majitelů testovaných psů. Žádný z vyšetřovaných psů nejevil známky onemocnění očí. Odběry vzorků probíhaly na území Jihočeského kraje v období mezi roky 2016 a 2017.

#### 4.1.2 Odběr materiálu

Pro odběr biologického materiálu k izolaci DNA byly použity tyto metody:

- vytržení několika živých chlupů i s chlupovými cibulkami,
- odběr krve,
- stěr bukalní sliznice vatovou tyčinkou.

První způsob odběru, vytržení chlupů včetně chlupových cibulek, se využil u většiny psů (98 jedinců), zejména pak v případě plemene anglický kokršpaněl. Jednotlivé chlupy byly vytrhávány pomocí pinzety, která byla před každým použitím vydezinfikována lihem. Pro vytrhávání chlupů byly zvoleny partie, kde rostou tužší chlupy mající velké chlupové cibulky a je k nim snadný přístup, například u kořene ocasu. Chlupy byly vytrhávány po jednom a bylo u nich vždy zkontrolováno, zda je dobře znatelná chlupová cibulka.

Dalším způsobem získání materiálu na izolaci DNA bylo odebírání krve. Odběr krve probíhal u veterinárního lékaře z přední levé končetiny. Krev byla odebrána

do popsaných zkumavek s roztokem EDTA. Tento způsob odběru byl proveden z důvodu větší náročnosti pouze u 3 fen plemene anglický kokršpaněl.

Poslední způsob odběru byl stěr bukální sliznice vatovou tyčinkou. Minimálně 30 minut před odběrem bylo nutné zajistit, aby zvířata neměla přístup k pití a potravě. Poté se sterilní vatovou tyčinkou důkladně stírala vnitřní strana tváře zvířete po dobu 10 sekund, kdy se různě měnila poloha vatové tyčinky v tlamě. Tyčinku bylo nutné použít oboustranně. Po dokončení stěru, kdy bylo zachyceno viditelné množství sliv z bukální sliznice na vatové tyčince, se nechala tyčinka několik sekund sterilně oschnout na vzduchu. Následně se vložila do popsané obálky s identifikačními údaji a obálka se zalepila. Tento způsob odběru byl proveden u 19 psů. Stěr bukální sliznice se jevil jako jednoduchý, rychlý a efektivní způsob odběru genetického materiálu, ze kterého se následně snadno izolovala DNA.

## **4.2 Izolace DNA**

Vzorky před izolací byly uloženy v lednici nebo byly uskladněny při teplotě - 20 °C. Biologický materiál před vložením do automatického izolátoru bylo nutné nejprve upravit. Ustříhl se přibližně 1 cm ze čtyř až šesti chlupů zakončených chlupovou cibulkou a vložily se do popsané zkumavky. U vatové tyčinky, kterou byl proveden bukální stěr, se ustříhl kousek vaty obsahující zvířecí sliny a byl též vložen do zkumavky. Následně se ke každému vzorku přidalo 500 µl GT a 20 µl proteinázy K. Pak se zkumavky stočily na mikrocentrifuze a umístily na 60 minut při teplotě 60 °C do vodní lázně. U krve se tato příprava před samotnou izolací neprováděla. Po vyjmutí z lázně se zkumavky se vzorky znovu stočily a napipetovalo se 400 µl každého roztoku obsahující vzorek do předem připravené zkumavky. Vzorky krve se pipetovaly rovnou do příslušných zkumavek. Zkumavky se vzorky k izolaci byly bez uzávěry a vkládaly se do speciálních stojanů z automatického izolátoru, kam se dále vložily předplněné cartridge a popsané zkumavky s uzávěry na vyizolovanou DNA. Genomová DNA byla izolována na automatickém izolátoru nukleových kyselin MagCore® HF 16 Plus za pomoci komerčních tkáňových kitů od firmy RBC Bioscience® vhodných pro identifikaci genotypů.

Kvalita získané DNA byla ověřena elektroforeticky na 1% agarózovém gelu.

### 4.3 PCR - Polymerázová řetězová reakce

Analýza vzorků pro výskyt mutace způsobující progresivní degeneraci tyčinek a čípků u psů byla provedena metodou PCR-RFLP. Metodika byla převzata z práce Dostál a kol. (2011) a Zangerl a kol. (2006), s mírnými úpravami pro laboratorní podmínky daného pracoviště.

V analýze byly použity primery následujících sekvencí:

▪ **PRCD-F: 5' - CCA GTG GCA GCA GGA ACC - 3'**

▪ **PRCD-R: 5' - CCG ACC TGC TGC CCA CGA CTG - 3'**

Během polymerázové řetězové reakce došlo k amplifikaci vybraného úseku DNA *in vitro*. Prvním krokem byla příprava reakční směsi čili master mixu, jehož složení pro jeden vzorek je uvedeno v tabulce 2.

**Tabulka 2:** Složení reakční směsi PCR pro jeden vzorek

Komponenta	Objem [μl]
pufr	3
MgCl <sub>2</sub>	2
dNTP's	3
primer PRCD-1F	1,5
primer PRCD-1R	1,5
DNA	2
<i>Taq</i> -polymeráza*	3
H <sub>2</sub> O	9
Σ	25

\* *Taq*-polymeráza byla ředěna na koncentraci 1 U / μl

Postupně se smíchaly složky v tomto pořadí: H<sub>2</sub>O, pufr, MgCl<sub>2</sub>, dNTP's, primer PRCD-1F a primer PRCD-1R. Poté se namíchaný master mix rozpipetoval do předem přichystaných eppendorfových zkumavek určených pro PCR a nadepsaných čísly vzorků. Následně se do každé eppendorfky přidalo příslušné DNA daného vzorku. Dalším krokem bylo vložení vzorků do termocykleru a spuštění předem nainstalovaného programu pro PRCD. Po uplynutí přibližně dvou minut, během kterých probíhala denaturace při 95 °C, se přidala naředěná *Taq*-polymeráza a pokračovalo se v předvoleném programu. *Taq*-polymeráza se přidává záměrně až po denuraci, při níž dojde zahřátím k inaktivaci proteinázy K.

Amplifikace byla započata během denaturace při 95 °C po dobu 2 minut s následujícím přidáním *Taq*-polymerázy, jak je uvedeno výše. Poté následovalo 29 cyklů, ve kterých se opakovaly jednotlivé kroky v tomto pořadí:

- denaturace 95 °C (30 s),
- annealing 58 °C (30 s),
- extenze 68 °C (1 min).

Závěrečným krokem amplifikace byla finální extenze při 72 °C po dobu 7 minut. Po dokončení celého procesu se termocykler automaticky uvedl do režimu, ve kterém uchovával vzorky při teplotě 15 °C do doby, než byly vzorky odebrány. Pro PCR byly využívány přístroje thermocycler T-Personal 48 a thermocycler T-Gradient od firmy Biometra®.

Výsledky amplifikace byly ověřeny elektroforeticky na 2,5% agarózovém gelu. Délka PCR fragmentů při úspěšném provedení PCR byla 512 bp.

#### 4.4 RFLP - Polymorfismus délky restrikční fragmentů

Po amplifikaci DNA polymerázovou řetězovou reakcí následovala metoda RFLP. Ke každému vzorku PCR produktu o množství 15 µl se přidalo 1,7 µl pufru Buffer Tango a 1 µl restrikční endonukleázy *RsaI* (tabulka 3). Po smíchání všech těchto složek byly vzorky umístěny do termostatu Binder® a inkubovány přes noc při teplotě 37°C.

**Tabulka 3:** Složení reakční směsi RFLP pro jeden vzorek

Komponenta	Objem [µl]
pufr (Buffer Tango)	1,7
<i>RsaI</i>	1
PCR produkt	15
Σ	17,5

Následně se druhý den provedla separace fragmentů pomocí horizontální elektroforézy na 3,5% agarózovém gelu. Na základě výsledků vizualizace délky fragmentů byla určena genotypizace. Délky jednotlivých fragmentů, podle nichž lze určit genotyp daného jedince jsou uvedeny níže.

- 396 bp - dominantní homozygot (*PRCD/PRCD*) = zdravý jedinec
- 396 bp, 116 bp - heterozygot (*PRCD/prcd*) = přenašeč
- 116 bp - recesivní homozygot (*prcd/prcd*) = postižený jedinec

## 4.5 Elektroforéza na agarózovém gelu

Ověření kvality izolované DNA a produkty PCR-RFLP byly vyhodnocovány elektroforeticky na agarózovém gelu. Koncentrace gelu se lišila podle toho, o jakou se jednalo metodu zpracování vzorků (tabulka 4).

**Tabulka 4:** Složení agarózového gelu dle použité metody hodnocení

METODA	agarózový gel [%]	agaróza [g]	TBE pufr [ml]	ethidium bromid [μl]
PCR	2,5	2,5	100	5
RFLP	3,5	3,5	100	5

Agarózový gel se připravil dle běžné metodiky v závislosti na koncentraci. Nejdříve se smíchalo 100 ml 1x TBE pufru s odpovídajícím množstvím agarózy (1; 2,5; 3,5 g). Vzniklá směs se zahřála, aby se agaróza beze zbytku v pufru rozpustila. Po mírném vychladnutí se do směsi přidalo 5 μl ethidium bromidu, směs se důkladně promíchala a vtila do připravené formy s hřebínky. Po 30 minutách gel ztuhl, následně se s ním mohlo rovnou pracovat či se uskladnil v lednici při 4 °C.

1x TBE pufr se využíval nejen při výrobě agarózového gelu, ale sloužil také jako elektrolyt v elektroforetické vaně. 10x TBE pufr byl připraven ze 108 g Trisu, 55 g kyseliny borité, 800 ml destilované H<sub>2</sub>O, 40 ml EDTA a po důsledném smíchání těchto složek byl roztok ještě doplněn do 1 l destilovanou H<sub>2</sub>O. Pufr 1x TBE byl vytvořen naředěním 100 ml 10x TBE 900 ml destilované H<sub>2</sub>O.

Izolace genomové DNA proběhla bez problémů, což bylo potvrzeno ověřením kvality izolované DNA elektroforeticky na 1% agarózovém gelu.

K ověření správného průběhu amplifikace posloužilo 5 μl produktu PCR, které byly smíchány s 5 μl komerčního barviva Lander®. Poté se nanas obarvený vzorek v množství 5 μl do určené jamky 2,5% gelu. První jamka v gelu vždy náležela 1 μl velikostního markeru GeneRuler 100 bp. Elektroforéza produktů PCR probíhala při 120 V po dobu 45 minut.

Obdobně probíhala elektroforéza štěpných fragmentů DNA (RFLP) na 3,5% agarózovém gelu při nastavení na 80 V a 90 minut.

Výsledky byly vyhodnoceny na základě vizualizace délky fragmentů pod UV transiluminátorem Spectroline® TS-312A.

## 4.6 Statistické vyhodnocení

Podle zjištěných výsledků genotypizace testovaného souboru zvířat složeného ze 120 psů se vypočítala frekvence výskytu mutované alely a heterozygotních přenašečů onemocnění PRA-prcd. Nakonec byla stanovena testem dobré shody odchylka populace od rovnovážného stavu, který vycházel z Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Výpočty byly provedeny v závislosti na základní vztahy, jež tvoří podstatu populační genetiky. Zpracování vycházelo z prací Urbana (2008), Lepše (1996) a Snustada & Simmonse (2009).

Hardy-Weinbergův model objasňuje matematický vztah mezi frekvencemi alel a frekvencemi genotypů:

- **AA:  $p^2$**
- **Aa:  $2pq$**
- **aa:  $q^2$**

kde **p** a **q** značí frekvence alel **A** a **a**. Kombinací těchto dvou alel mohou vzniknout tři genotypy - dominantní homozygot (**d**), heterozygot (**h**) a recesivní homozygot (**r**). Platí zde vztah:

$$p + q = 1$$
$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$
$$f(AA) \quad f(Aa) \quad f(aa)$$

z něhož lze vyjádřit relativní zastoupení jednotlivých genotypů:

$$d + h + r = 1$$

a relativní alelové frekvence:

$$p = d + \frac{1}{2} h$$

$$q = r + \frac{1}{2} h$$

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

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

Populace se nachází v genetické rovnováze v případě, že frekvence genotypů pozorovaných **P** (skutečných) se statisticky neliší od frekvencí genotypů za genetické rovnováhy **O** (očekávané).

Ke statistickému vyhodnocení se používá test dobré shody neboli  $\chi^2$  (chí kvadrát) test:

$$\chi^2_{n-p-1} = \sum \frac{(P - O)^2}{O}$$

kde  $P$  značí pozorované počty v každé genotypové třídě,  $O$  očekávané počty v týchž genotypových třídách a následně se výsledné hodnoty všech genotypových tříd sečtou. Dále  $n$  udává počet pozorovaných třít dat a  $p$  počet odhadovaných parametrů. Vypočítaná hodnota  $\chi^2$  se porovnává s tabulkovou hodnotou pro příslušnou hladinu významnosti (0,05 a 0,01) a stupeň volnosti ( $df$ ).

$$df = n - p - 1$$

Stupeň volnosti pro gen se dvěma alelami a vznikajícími třemi genotypy je  $df = 1$ .

**Tabulka 5:** Kritické hodnoty  $\chi^2$  distribuce (podle Lepše, 1996)

Hladina významnosti	Stupně volnosti (df)				
	1	2	3	4	5
0,05	3.841	5.991	7.815	9.488	11.070
0,01	6.635	9.210	11.345	13.277	15.086

Na závěr se porovná vypočítaná hodnota s tabulkovou hodnotou chí kvadrátu pro daný stupeň volnosti a na vybrané hladině významnosti. Pokud platí  $\chi^2_{\text{tab.}} > \chi^2_{\text{vyp.}}$ , jedná se o shodu mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi a  $H_0$  nelze zamítnout. Populace je tedy v genetické rovnováze. Jestliže je tomu naopak  $\chi^2_{\text{tab.}} < \chi^2_{\text{vyp.}}$ , existuje průkazný rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi a  $H_0$  se zamítá, čímž se vyhodnotí, že populace není v genetické rovnováze.



## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Genotypizace

V diplomové práci byly provedeny genetické analýzy *prcd* lokusu (CFA9) u 120 psů různých plemen, kde bylo nejvíce zastoupeno plemeno anglický kokršpaněl. Psi pocházeli ze soukromých chovů v Jihočeském kraji. Ze vzorků chlupů, bukálních stěrů a krve těchto psů byla následně pomocí komerčních kitů a automatického izolátoru nukleových kyselin vyizolována DNA. Při izolaci DNA se nevyskytly žádné podstatné problémy a izolace všech vzorků proběhla úspěšně, což bylo potvrzeno elektroforeticky.

Metodou PCR-RFLP byla provedena genotypizace všech vzorků. Po amplifikaci PCR produktů následovalo ověření správného průběhu pomocí gelové elektroforézy, kdy získané fragmenty byly o délce 512 bp (viz obrázek 7).

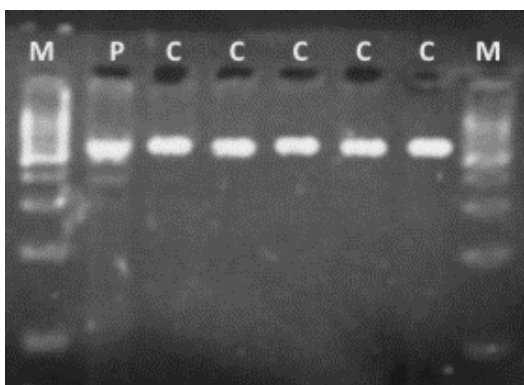


**Obrázek 7:** Vizualizace PCR produktů

Závěrem celé této metody bylo určení genotypů pomocí metody RFLP na základě stanovení délek jednotlivých fragmentů, přítomných u daného vzorku. Dominantní homozygoti (*PRCD/PRCD*) byli detekováni v případě, že byl přítomen jeden fragment o délce 396 bp. Ačkoliv nebyl při detekci odhalen žádný recesivní homozygot (*prcd/prcd*), jeho přítomnost by byla prokázána při výskytu jednoho fragmentu o délce 116 bp. Heterozygotní genotyp (*PRCD/prcd*) byl vyhodnocen na základě dvou fragmentů o délkách 396 a 116 bp.

Ve studii Zangerl a kol. (2006) se zabývali souvislostmi mezi onemocněním psů, lidí a myší. Dostál a kol. (2011) ve své práci pouze zmiňovali spojitost mezi psy a lidmi. Průběh amplifikace genomové DNA byl shodný u obou prací včetně této.

Zangerl a kol. (2006) v metodě RFLP testovali dva druhy restričních endonukleáz, kdy použitá *RsaI* byla stejná jako v této analýze a výsledkem byly fragmenty o délkách 396 a 116 bp. Ta samá restriktáza byla použita i v práci Dostál a kol. (2011), kde je popisováno, že se jedná o endonukleázu specifickou pro sekvenci GT/AC. Druhým druhem, jenž byl použit u Zangerl a kol. (2006), byla *ApaI* s výslednými fragmenty o délkách 397 a 115 bp. Genotypy byly odhaleny vizualizací na 6% polyakrylamidovém gelu. V této práci byla prováděna horizontální elektroforéza na agarózovém gelu, taktéž i u Dostál a kol. (2011).



**Obrázek 8:** Vizualizace PCR-RFLP v rámci genotypizace (*P* = heterozygot, *C* = dominantní homozygot)

Zajímavostí je, že ve studii Zangerl a kol. (2006) určili fenu amerického eskymáckého psa jako recesivního homozygota, který by podle očekávání měl trpět onemocněním, ale fena nejevila žádné klinické příznaky ani ve věku 13 let.

## 5.2 Genotypové a alelové frekvence

Ve studovaném souboru 120 psů bylo nalezeno 95 dominantních homozygotů (*PCRD/PCRD*), 25 heterozygotů (*PCRD/prcd*) a nevyskytoval se zde žádný recesivní homozygot (*prcd/prcd*). Z toho vyplývá, že v rámci sledované populace psů nebyl žádný jedinec postižen daným onemocněním. Nejvíce byl zastoupen genotyp *PCRD/PCRD*, který se v panelu testovaných zvířat vyskytoval s četností 0,792. Ve sledované populaci zvířat převažovali dominantní homozygoti nad heterozygoty. Výskyt recesivních homozygotů byl nulový, což s sebou nese i poměrně nízkou frekvenci recesivní alely, jak vyplývá z následujícího výpočtu alelických frekvencí. Z hlediska zastoupení jednotlivých alel je výrazná převaha alely *PCRD*, jež se vyskytovala v populaci s frekvencí 0,896. Frekvence výskytu alely *prcd* byla pouze 0,104. Genotypové a alelické frekvence jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tabulka 6:** Genotypové a alelové frekvence

Frekvence	Genotyp			Alela	
	<i>PRCD/PRCD</i>	<i>PRCD/prcd</i>	<i>prcd/prcd</i>	<i>PRCD</i>	<i>prcd</i>
<b>absolutní (P)</b>	95	25	0	215	25
<b>relativní</b>	0,792	0,208	0,000	0,896	0,104
<b>očekávaná absolutní (O)</b>	96,30	22,40	1,30		
$\chi^2$ <b>(Chí kvadrát)</b>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <b>1,622</b>  <i>p &lt; 0,05</i> </div>				

Statistické vyhodnocení v tabulce 6 je pouze zmíněno a podrobněji je popisováno v kapitole 5.4 - Statistické vyhodnocení výsledků.

Dostál a kol. (2011) hodnotili genotypové a alelové frekvence pouze v rámci jednotlivých plemen.

### 5.3 Predispozice jednotlivých plemen

Ve studii bylo celkem analyzováno 120 jedinců. Jednalo se převážně o čistokrevné psy pocházející ze 14 plemen a pět psů bylo bez plemenné příslušnosti, kdy to byli kříženci malých a středních plemen. Psi byli různého stáří (od 6 měsíců po 12 let). Žádný ze psů nejevil známky očního onemocnění.

V analýze byla zkoumána čtyři plemena s predispozicí k onemocnění (anglický kokršpaněl, portugalský vodní pes, labradorský retrív a trpasličí pudl). Dále byla zahrnuta i plemena, jež by neměla trpět tímto onemocněním včetně kříženců. Výsledky identifikace genotypů a alelových frekvencí u jednotlivých plemen jsou uvedeny v tabulce 7.

V práci Downs a kol. (2013) se zabývali výskytem různých forem progresivní retinální atrofie u 36 plemen. Objevily se zde výsledky u *prcd*, kdy značně u všech plemen (7), kde se objevilo toto onemocnění, převažovali recesivní homozygoti a heterozygoti nad dominantními homozygoty. Testovanými plemeny byli americký a anglický kokršpaněl, chesapeake bay retrív, finský laponský pes, labradorský retrív, trpasličí pudl a Nova Scotia duck tolling retrív. Například u plemene anglický

kokršpaněl byla alelová frekvence mutantní alely až 0,917 a zdravé pouze 0,083. U plemene trpasličí pudl bylo dokonce postiženo 100 % jedinců.

Dostál a kol. (2011) použili k analýze 17 plemen, která měla predispozici k prcd. Výsledky u totožných plemen studie a analýzy diplomové práce byly při porovnání přibližně shodné. Toho si je možné všimnout konkrétně při srovnání výsledku trpasličího pudla studie Dostál a kol. (2011), kde vycházela alelová frekvence pro mutovanou alelu 0,80 a výsledku této práce, kde je frekvence 0,75.

Je nutno zmínit, že u plemen s málo početným zastoupením se obtížně vyvozují konkrétní závěry. Mnoho chovatelů není ochotno testovat svá zvířata k odhalení určitých predispozic, pokud to není v rámci chovu povinné.

**Tabulka 7:** Genotypy a alelové frekvence jednotlivých plemen

Plemeno	n	Genotypová frekvence			Alelová frekvence	
		<i>zdravý</i> PRCD/PRCD	<i>přenašeč</i> PRCD/prcd	<i>nemocný</i> prcd/prcd	PRCD	prcd
anglický kokršpaněl	85	65	20	0	0.88	0.12
anglický setr	3	1	2	0	0.66	0.33
americký pitbulteriér	1	1	0	0	1.00	0.00
bígl	1	1	0	0	1.00	0.00
bílý švýcarský ovčák	1	1	0	0	1.00	0.00
čivava	3	3	0	0	1.00	0.00
Jack Russell teriér	1	1	0	0	1.00	0.00
jezevčík	3	3	0	0	1.00	0.00
jorkšírský teriér	3	3	0	0	1.00	0.00
kříženec	5	4	1	0	0.90	0.10
portugalský vodní pes	5	5	0	0	1.00	0.00
labradorský retrívr	2	1	1	0	0.75	0.25
zlatý retrívr	1	1	0	0	1.00	0.00
sheltie	1	1	0	0	1.00	0.00
trpasličí pudl	2	1	1	0	0.75	0.25
celkem	120	95	25	0		

Z uvedené tabulky 7 lze vyčíst, že převažují zdraví jedinci. Sporadicky byli odhaleni přenašeči mutované alely prcd a nevyskytl se zde žádný postižený jedinec.

Očekávaný vyšší výskyt mutované alely u plemen s predispozicí byl potvrzen. Přesto u plemene vodní portugalský pes byli všichni jedinci zdraví. Naopak u anglického setra se vyskytl jeden přenašeč a taktéž u kříženců.

Aguirre & Acland (2006) poukazují na to, že fenotypické projevy nemoci jsou velice variabilní nejen mezi plemeny, ale dokonce i mezi jedinci.

Ve Francii se mezi roky 1990 a 1993 prováděla vyšetření elektroretinografem u 207 miniaturních pudlů s nedostatečným viděním. Byl tak prokázán vztah mezi barvou srsti a prcd, kdy tmavě zbarvení jedinci byli více zatíženi tímto onemocněním (Gaiddon a kol., 1997).

V práci Zangerl a kol. (2006) bylo navíc testováno 30 vlků, kteří byli ve výsledku prosti prcd. Z toho lze usuzovat, že se onemocnění začalo vyskytovat v důsledku evoluce. PRA-prcd se totiž začala objevovat až u vybraných plemen psů, kdy došlo k velkému stupni prošlechtěnosti.

V dnešní době existuje jen několik převážně zahraničních studií, které se zabíraly touto problematikou.

## 5.4 Statistické vyhodnocení výsledků

V testovaném souboru 120 psů různé plemenné příslušnosti byla zjištěna přítomnost mutované alely pro vznik onemocnění PRA-prcd u 25 heterozygotních přenašečů. Nebyl detekován žádný nemocný jedinec, tedy recesivní homozygot.

V souvislosti s těmito výsledky bylo dále stanoveno:

### I) odhad míry heterozygotnosti populace

$n = 120$  ... celkový počet jedinců v populaci

$n_h = 25$  ... počet heterozygotů Aa

$h = ?$  ... odhad frekvence heterozygotů

$$h = \frac{n_h}{n}$$

---

$$h = \frac{25}{120}$$

$$h = 0,20833 \approx \underline{20,8 \%}$$

Ve vybrané populaci je zastoupeno 20,8 % heterozygotů přenášejících mutovanou alelu.

### II) odhad frekvence mutované alely

Vychází se ze vztahu:

$$q = r + \frac{1}{2} h$$

$r = 0$  ... relativní frekvence recesivních homozygotů v populaci

$h = 0,20833$  ... relativní frekvence heterozygotů v populaci

$q = ?$  ... odhad frekvence mutované alely

---

$$q = 0 + \frac{0,20833}{2}$$

$$q = 0,10417 \approx \underline{10,4 \%}$$

Frekvence mutované alely v populaci je 10,4 %.

### III) testování odchylky od Hardy-Weinbergova modelu (Chí-kvadrát test)

K výpočtu byl použit vzorec níže a stanovila se nulová hypotéza.

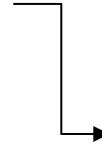
$$\chi^2_{n-p-1} = \sum \frac{(P - O)^2}{O}$$

$$df = (n - p - 1) = 3 - 1 - 1$$

**H<sub>0</sub>**: mezi pozorovanými a očekávanými frekvencemi genotypů není významný rozdíl

df = 1

zvolená hladina významnosti  $p < 0,05$  (95 %)



$$\chi^2_{\text{tab.}} = 3,841$$

Pozorované počty genotypů (P)

- AA: 95
- Aa: 25
- aa: 0

Odhad frekvence alel

$$\begin{aligned} p + q &= 1 \\ q &= 0,10417 \\ p &= 1 - q \\ p &= 1 - 0,10417 \\ p &= 0,89583 \end{aligned}$$

Očekávané počty genotypů (O)

- AA:  $n \cdot p^2 = 120 \cdot 0,89583^2 = 96,301$
- Aa:  $n \cdot 2pq = 120 \cdot 2 \cdot 0,89583 \cdot 0,10417 = 22,396$
- aa:  $n \cdot q^2 = 120 \cdot 0,10417^2 = 1,302$

$$\chi^2_{3-1-1} = \frac{(95 - 96,301)^2}{96,301} + \frac{(25 - 22,396)^2}{22,396} + \frac{(0 - 1,302)^2}{1,302}$$

$$\chi^2_{\text{vyp.}} = 1,622$$

$$\chi^2_{\text{tab.}} > \chi^2_{\text{vyp.}}$$

Mezi pozorovanými a očekávanými frekvencemi genotypů při jednom stupni volnosti a hladině významnosti 0,05 není statisticky významný rozdíl. Nelze tedy zamítnout  $H_0$  a testovaná populace pro daný lokus se nachází v genetické rovnováze dle Hardy-Weinbergova modelu.

## 6. ZÁVĚR

Dědičná onemocnění se objevují u všech psích plemen, a to bez výjimky. Přítomnost kongenitálních vad s sebou přináší řadu zdravotních rizik. Příčina vzniku spočívá ve změně genetické informace čili mutaci. V současné době je u psů popsáno okolo 500 dědičných chorob a jen desetina z nich je objasněna na molekulární úrovni, kdy je přesně známa kauzální mutace DNA. Mnoho těchto dědičných nemocí a vad je obdobných u člověka. Jejich výzkum je velmi důležitý, jelikož by se určité poznatky ohledně například diagnostiky a léčby mohly aplikovat i u lidí.

V rámci diplomové práce byla provedena genotypizace k autozomálně recesivnímu onemocnění sítnice oka, progresivní degeneraci tyčinek a čípků (PRA-prcd). Studie byla prováděna na 120 psech několika plemen včetně kříženců, kteří byli různého stáří. U čtyř zkoumaných plemen (anglický kokršpaněl, labradorský retrívr, trpasličí pudl a portugalský vodní pes), jež byla nejvíce zastoupena, byla známa predispozice k tomuto onemocnění. Analýza prokázala přítomnost mutované alely ve studované populaci psů.

Celkem bylo odhaleno 25 heterozygotních přenašečů PRA-prcd a nebyl zaznamenán žádný postižený jedinec. Tomuto zjištění odpovídalo, že frekvence výskytu mutované alely v dané populaci byla 10,4 %. V porovnání s výsledky jiných autorů byla četnost této nežádoucí alely u studovaných psů predispozičních plemen přibližně shodná či nižší. Pouze u plemene portugalský vodní pes byli všichni jedinci dominantní homozygoti (zdraví jedinci), i když byl očekáván výskyt mutované alely prcd. Ostatní plemena byla podle předpokladů zdravá a sporadicky se mezi nimi objevili heterozygotní přenašeči, což je pochopitelné zvláště u kříženců více plemen. Statistické vyhodnocení četností genotypů se zaměřením na prcd analyzovaných psů potvrzuje, že se daná populace nachází v Hardy-Weinbergově rovnováze na hladině významnosti 0,05.

Velice vhodným opatřením pro eliminaci tohoto onemocnění se zdají být genetické testy, které odhalují heterozygotní přenašeče. Zároveň je nutné nadále dodržovat zásady správné plemenitby v chovech psů.



## 7. SEZNAM ZKRATEK

bp - páry bází

CEA - anomálie oka u kolíí

CERF - Canine Eye Registry Foundation

CIDD - Canine Inherited Disorders Database

CSNB - kongenitální stacionární slepota u briardů

DNA - deoxyribonukleová kyselina

dNTPs - směs nukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

DMSO - primární metabolit dimethylsulfoxidu

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová a její soli

ELFO - elektroforéza

erd - raná degenerace sítnice (Early Retinal Degeneration)

ERG - elektroretinografie

FCI - Mezinárodní kynologická federace (Federation Cynologique Internationale)

IDID - Inherited Diseases in Dogs

LIDA - Listing of Inherited Disorders in Animals

OMIA - Online Mendelian Inheritance in Animals

PCR - polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

pd - dysplazie fotoreceptorů (Photoreceptor dysplasia)

PRA - progresivní retinální atrofie (Progressive Retinal Atrophy)

prcd - progresivní degenerace tyčinek a čípků (Progressive Rod-Cone Degeneration)

rcd 1, 2, 3 - dysplazie tyčinek a čípků typu 1, 2, 3 (Rod-Cone Dysplasia 1, 2, 3)

rd - dysplazie tyčinek (Rod Dysplasia)

RFLP - polymorfismus délky restrikčních fragmentů

(Restriction Fragment Length Polymorphism)

RP - retinitis pigmentosa (dědičná slepota)

XLPR - PRA vázaná na samičí pohlaví (X-linked Progressive Retinal Atrophy)

## 8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

1. **Aguirre G.** (2001). *Genes and diseases in man and models*. Proc. Brain Res., 131: s. 663-678
2. **Bártová E.** (2011a). *PCR (polymerázová řetězová reakce)*. [online]. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz) [cit. 2017-02-10]
3. **Bártová E.** (2011b). *RFLP (restrikční reakce)*. [online] Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-rflp&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-rflp&lang=cz) [cit. 2017-02-14]
4. **Bártová E.** (2011c). *Gelová elektroforéza*. [online] Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-gelova\\_elektroforeza&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz) [cit. 2017-02-20]
5. **Beránek J., Vít P. J.** (1995). *Praktická oftalmologie psa*. Medicus Veterinarius, 11, s. 57-58, 69-84
6. **Beránek J.** (1998). *Praktická oftalmologie psa – dědičné choroby*. [online]. Dostupné z: <http://www.veterina-info.cz/odborne-clanky/prakticka-oftalmologie-psa--dedicne-choroby-73.html> [cit. 2016-12-29]
7. **Beránek J.** (2001). *Dědičné oční vady*. Pes přítel člověka, 4, s. 6-7
8. **Beránek M.** (2016). *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 191 s. ISBN 978-80-246-3224-7
9. **Borges A., Rosa M. S., Recchia G. H., Queiroz-Silva J. R., Bressan E. A., Veasey E. A.** (2009). *CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis*. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), v. 66, n. 44, s. 529-534
10. **Britannica** (Biochemistry). (1998). *Polymerase chain reaction*. [online]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction> [cit. 2017-02-13]
11. **Brown T. A.** (2007). *Klonování a analýza DNA: úvod*. Olomouc: Univerzita Palackého, 408 s. ISBN 978-80-244-1719-6
12. **Bursová Š., Dušková M., Necidová L., Karpíšková R., Myšková P.** (2014). *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 80 s. ISBN 978-80-7305-676-6
13. **Císařovský M.** (2008). *Pes: nekonečný příběh od pravěku do třetího tisíciletí*. Praha: Canis, 902 s. ISBN 978-80-900820-1-4

14. **Campbell N. A., Reece J. B.** (2006). *Biologie*. Brno: Computer Press, 1332 s. ISBN 80-251-1178-4
15. **Clements P. J. M., Sargan D. R., Gould D. J., Petersen-Jones S. M.** (1996). *Recent advances in understanding the spectrum of canine generalised progressive retinal atrophy*. *Journal of Small Animal Practice*, 37, s. 155-162
16. **Dančová B.** (2015). *Stavba oka psa*. Kynologická encyklopedie [online]. Dostupné z: <http://www.kynologicka-encyklopedie.cz/ukazky.html> [cit. 2016-12-28]
17. **Dostál J.** (1995). *Chov psů: genetika v kynologické praxi*. České Budějovice: Dona, 206 s. ISBN 80-854-6358-X
18. **Dostál J.** (2007). *Genetika a šlechtění plemen psů*. České Budějovice: Dona, 261 s. ISBN 978-80-7322-104-1
19. **Dostál J., Hrdlicová A., Horák P.** (2011). *Progressive rod-cone degeneration (PRCD) in selected dog breeds and variability in its phenotypic expression*. *Veterinární Medicína*, 56, vol. 5, s. 243-247
20. **Downs L. M., Hitti R., Pregolato S., Mellersh C. S.** (2014). *Genetic screening for PRA-associated mutations in multiple dog breeds shows that PRA is heterogeneous within and between breeds*. *Veterinary Ophthalmology*. 17, 2, s. 126-130
21. **Duchková D.** (2007). *Anatomie oka*. Veterinární nemocnice Stodůlky. [online]. Dostupné z: <http://www.vetcentrum.cz/stodulky/lekar/845/anatomie-oka> [cit. 2016-12-27]
22. **Fogle B.** (2005). *Encyklopedie psů*. Praha: Fortuna Print, 312 s. ISBN 80-7321-161-0
23. **Francisco L. V., Langston A. A., Mellersh C. S., Neal C. L., Ostrander E. A.** (1996). *A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping*. *Mammalian Genome*. 7: s. 359-362
24. **Gazdová V.** (2007). *Identifikace SNPs asociovaných s produkcí masa u skotu*. Disertační práce. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
25. **Genomia s.r.o.** (2008-2016). *Psi: genetická vyšetření dědičných nemocí*. [online]. Dostupné z: <http://www.genomia.cz/cz/veterinari/psi/#section0> [cit. 2016-12-30]

26. **Gough A., Thomas A.** (2004). *Breed Predispositions to Disease in Dogs and Cats*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 235 s. ISBN 1-4051-0748-0
27. **Hatina J., Sykes B.** (1999). *Lékařská genetika – problémy a přístupy*. Praha: Academia, 296 s. ISBN 80-200-0700-8
28. **Hruban V., Majzlík I.** (2000). *Obecná genetika*. Praha: ČZU, s. 316 ISBN 80-213-0600-9
29. **Hummel S.** (2003). *Ancient DNA typing: methods, strategies and applications*. Berlin: Springer, 298 s. ISBN 3-540-43037-7
30. **CHS Siluet Regreway** (2014 - 2016). *Obecně - ústrojí zraku - oční koule*. [online]. Dostupné z: [http://siluetregreway.cz/c\\_oci.html](http://siluetregreway.cz/c_oci.html) [cit. 2017-01-17]
31. **Kijas J. W., Cideciyan A. V., Aleman T. S., Pianta M. J., Pearce-Kelling S. E., Miller B. J., Jacobson S. G., Aguirre G. D., Acland G. D.** (2002). *Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and dedgeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:6328-6333
32. **Kim K. S., Lee S. E., Jeong H. K., Ha J. H.** (1998). *The complete nukleotidy sequence of domestic dog (Canis familiaris) mitochondrial genome*. Mol. Phylogenet. Evol. 10 (2): 210-20
33. **Kirkness E. F., Bafna V., Halpern A. L., Levy S., Remington K., Rusch D. B., Delcher A. L., Pop M., Wang W., Fraser C. M., Venter J. C.** (2003). *The dog genome: Survey sequencing and komparative analysis*. Science 301: s. 1898-1903
34. **Kočárek E.** (2008). *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. Praha: Scientia, 211 s. ISBN 978-80-86960-36-4
35. **Köchl S., Niedestätter H., Parson W.** (2005). *DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR*. Methods in molecular biology. 29: s. 13-30
36. **LabGuide** (2014). *Izolace nukleových kyselin*. LabGuide - průvodce laboratoří. [online] Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin> [cit. 2017-01-28]

37. **Lab Mark** (2015-2017). *Laboratorní reagentie - kity*. [online]. Dostupné z: <http://www.labmark.cz/reagentie> [cit. 2017-01-29]
38. **Laboratoř molekulární biologie PŘF JU** (2010). *Metody - polymerázová řetězová reakce (PCR)*. [online] Dostupné z: <http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html> [cit. 2017-02-10]
39. **Lenská B.** (2008). *Onemocnění duhovky, cévnatky a řasnatého tělesa (uveálního traktu)*. Veterinární nemocnice Stodůlky. [online]. Dostupné z: <http://www.vetcentrum.cz/stodulky/lekar/850/onemocneni-duhovky-cevnatky-a-rasnateho-telesa-uvealniho-traktu-> [cit. 2016-12-27]
40. **Lepš J.** (1996). *Biostatistika*. České Budějovice: JU, 166 s. ISBN 80-70-40-154-0
41. **Leroy G.** (2011). *Genetic diversity, inbreeding and breeding practices in dogs: Results from pedigree analyses*. The Veterinary Journal, 189 (2), s. 177-182
42. **Lindblad T. K., Wade C. M., Mikkelsen T. S.** (2005) Genome sequence, komparative analysis and holotype structure of the domestic dog. Nature. 438: s. 803-819
43. **Marvan F.** a kol. (2011). *Morfologie hospodářských zvířat*. Praha: Česká zemědělská univerzita, s. 238-242 ISBN 978-80-213-2188-5
44. **Mellersh C. S., Bourns M. E., Pettitt L., Ryder E. J., Holmes N. G., Gramfham D., Forman O. P., Sampson J., Barnett K. C., Blanton S., Binns M. M., Vaudin M** (2006). *Canine RPGRIP1 mutation establishes cone-rod dystrophy in miniature longhaired dachshounds as a homologue of human Leber congenital amaurosis*. Genomic, 88: s. 293-301
45. **Mellersh C. S.** (2014). *The genetics of eye Disorders in the dog*. Mellersh Canine Genetics and Epidemiology. 1:3 14 s.
46. **Nicholas F. W., Crook A., Sargan D. R.** (2011). *Internet resources cataloguing inherited disorders in dogs*. The Veterinary Journal, 189 (2), s. 132-135
47. **Parshall C., Wyman M., Nitroy S., Acland G. M., Aguirre G. D.** (1991). *Photoreceptor dysplasia: An inherited progressive retinal atrophy of miniature schnauzer dogs*. Proc. Vet. Comp. Ophth., 1: s. 187-203
48. **Peter F. R.** (2005). *Structure and function of human genome*. Genome Research. 15: s. 1759-1766 ISBN 1088-9051/05

49. **Petersen-Jones S.** (2005). *Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases*. Journal of Small Animal Practice, 46, s. 371-380
50. **Procházka Z.** (2005) *Z. Chov psů*. Praha: Paseka, 314 s. ISBN 80-7185-768-8
51. **Průša R.** (1997). *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. Praha: 2. lékařská fakulta UK, 45 s. ISBN 80-238-0940-7
52. **Raclavský V.** (1999). *Úvod do základních metod molekulární genetiky*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, lékařská fakulta, 44 s. ISBN 80-7067-892-5
53. **Reece W. O.** (2011). *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Praha: Grada, s. 129-141 ISBN 978-80-247-3282-4
54. **Sambrook J., Russell D. W.** (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344 s. ISBN 9780879695774
55. **Snustad D. P., Simmons M. J.** (2009). *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 726 s. ISBN 978-80-210-4852-2
56. **Snustad D. P., Simmons M. J.** (2010). *Principles of genetics*. Hoboken, NJ: John Wiley, 840 s. ISBN 978-0470388259
57. **Suchý I.** (2006). *Progresivní retinální atrofie*. [online]. Dostupné z: <http://www.veterina-info.cz/odborne-clanky/progresivni-retinalni-atrofie-205.html> [cit. 2016-12-29]
58. **Svoboda M., Senior D. F., Doubek J., Klimeš J. a kol.** (2000). *Nemoci psa a kočky I. díl*. Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat, Brno: Noviko, 1016 s. ISBN 80-902595-2-9
59. **Šípek A., Šípek A. ml., Horáček J., Gregor V.** (2008-2016). *Vrozené vývojové vady*; Informační portál o vrozených vadách a jejich výskytu v ČR. [online]. Dostupné z: <http://www.vrozene-vady.cz> [cit. 2016-12-05]
60. **Urban T.** (2008). Genetika populací, organizace genetické variability, Hardy-Weinbergův princip [online]. Dostupné z: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/pop/popul4b.html> [cit. 2017-03-21]
61. **Wachtel H.** (1998). *Chov psů v roce 2000*. Dona: České Budějovice, 277 s. ISBN 80-86136-29-9

62. **Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R.** (1991). *Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material.* BioTechniques, 10 (4): s. 506-513
63. **Waterston R. H., Lindblad-Toh K., Birney E., Rogers J., Abril J. F. a kol.** (2002). *Initial sequencing and komparative analysis of the mouse genome.* Nature. 420: s. 520-562
64. **Whitfield J.** (2003). *Dog genome unveiled.* Nature - International weekly journal of science. [online]. [cit. 2016-11-25]. Dostupné z: <http://www.nature.com/news/2003/030926/full/news030922-17.html>
65. **Zangerl B., Goldstein O., Philp A. R., Lindauer S. J. P., Pearce-Kelling S. E., Mullins R. M., Graphodatsky A. S., Ripoll D., Felix J. S., Stone E. M., Acland G. M., Aquirre D. G.** (2006). *Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans.* Genomic. 88. s. 551-563

## 9. PŘÍLOHY

Příloha 1: Podrobný přehled vzorků včetně výsledků analýzy

vzorek	pohlaví	plemeno	metoda odběru	detekce
1	F	AK	chlupy	CA
2	F	AK	chlupy	CA
3	F	AK	chlupy	CA
4	M	AK	chlupy	CL
5	M	AK	chlupy	CL
6	M	AK	chlupy	CA
7	F	AK	chlupy	CA
8	F	AK	chlupy	CL
9	F	AK	chlupy	CA
10	F	AK	chlupy	CL
11	F	AK	chlupy	CL
12	M	AK	chlupy	CL
13	F	AK	chlupy	CA
14	M	AK	chlupy	CA
15	F	AK	chlupy	CL
16	M	AK	chlupy	CL
17	M	AK	chlupy	CA
18	M	AK	chlupy	CA
19	F	AK	chlupy	CL
20	M	AK	chlupy	CL
21	F	AK	chlupy	CL
22	F	AK	chlupy	CL
23	F	AK	chlupy	CL
24	F	AK	chlupy	CL
25	F	AK	chlupy	CL
26	M	AK	chlupy	CL
27	M	AK	chlupy	CL
28	M	AK	chlupy	CA
29	F	AK	chlupy	CA
30	F	AK	chlupy	CL
31	M	AK	chlupy	CL
32	F	AK	chlupy	CL
33	F	AK	chlupy	CL
34	F	AK	chlupy	CL
35	F	AK	chlupy	CL
36	F	AK	chlupy	CL
37	F	AK	chlupy	CL
38	F	AK	chlupy	CA
39	M	AK	chlupy	CL
40	F	AK	chlupy	CL
41	F	AK	chlupy	CL



42	F	AK	chlupy	CL
43	M	AK	chlupy	CL
44	M	AK	chlupy	CL
45	M	AK	chlupy	CL
46	F	AK	chlupy	CL
47	F	AK	chlupy	CA
48	F	AK	chlupy	CA
49	F	AK	chlupy	CA
50	F	AK	chlupy	CA
51	M	AK	chlupy	CL
52	M	AK	chlupy	CL
53	M	AK	chlupy	CL
54	M	AK	chlupy	CL
55	M	AK	chlupy	CL
56	F	AK	chlupy	CL
57	F	AK	chlupy	CL
58	F	AK	chlupy	CL
59	M	AK	chlupy	CL
60	M	AK	chlupy	CL
61	M	AK	chlupy	CL
62	M	AK	chlupy	CL
63	M	AK	chlupy	CL
64	F	AK	chlupy	CL
65	F	AK	chlupy	CL
66	F	AK	chlupy	CL
67	F	AK	chlupy	CL
68	F	AK	chlupy	CL
69	F	AK	chlupy	CL
70	F	AK	chlupy	CL
71	F	AK	chlupy	CL
72	F	AK	chlupy	CL
73	F	AK	chlupy	CL
74	F	AK	chlupy	CA
75	F	AK	chlupy	CL
76	M	AK	chlupy	CL
77	F	AK	chlupy	CL
78	F	AK	chlupy	CL
79	F	AK	chlupy	CL
80	F	AK	chlupy	CL
81	F	AK	chlupy	CL
82	F	AK	chlupy	CL
83	F	AK	chlupy	CL
84	F	AK	chlupy	CL
85	F	AK	chlupy	CL
86	F	AK	krev	CA
87	F	AK	krev	CA

88	F	AK	krev	CL
89	M	PWD	chlupy	CL
90	M	PWD	chlupy	CL
91	M	PWD	chlupy	CL
92	M	PWD	chlupy	CL
93	M	PWD	chlupy	CL
94	F	MIX	chlupy	CL
95	F	MIX	chlupy	CL
96	F	MIX	chlupy	CL
97	M	APS	chlupy	CL
98	F	SS	chlupy	CL
99	M	JRT	chlupy	CL
100	M	DNR	chlupy	CL
101	F	SHE	chlupy	CL
102	M	AS	bukální stěr	CL
103	M	AS	bukální stěr	CA
104	M	AS	bukální stěr	CA
105	F	CHI	bukální stěr	CL
106	F	CHI	bukální stěr	CL
107	M	CHI	bukální stěr	CL
108	M	YT	bukální stěr	CL
109	F	YT	bukální stěr	CL
110	F	YT	bukální stěr	CL
111	F	DNR	bukální stěr	CL
112	M	DNL	bukální stěr	CL
113	F	LR	bukální stěr	CA
114	F	LR	bukální stěr	CL
115	F	ZR	bukální stěr	CL
116	F	PO	bukální stěr	CA
117	F	PO	bukální stěr	CL
118	M	MIX	bukální stěr	CA
119	M	MIX	bukální stěr	CL
120	F	BE	bukální stěr	CL

**CL** = clear (*PRCD/PRCD*) - zdravý jedinec

**CA** = carrier (*PRCD/prcd*) - přenašeč onemocnění

**AK** = anglický kokršpaněl

**PWD** = vodní portugalský pes

**MIX** = kříženec

**APT** = americký pitbulteriér

**WSS** = bílý švýcarský ovčák

**JRT** = Jack Russell teriér

**DNR/L** = jezevčík standard

drsnosrstý / dlouhosrstý

**SHE** = sheltie

**YT** = jorkšírský teriér

**CHI** = čivava

**AS** = anglický setr

**LR** = labradorský retrívr

**GR** = zlatý retrívr

**PO** = trpasličí pudl

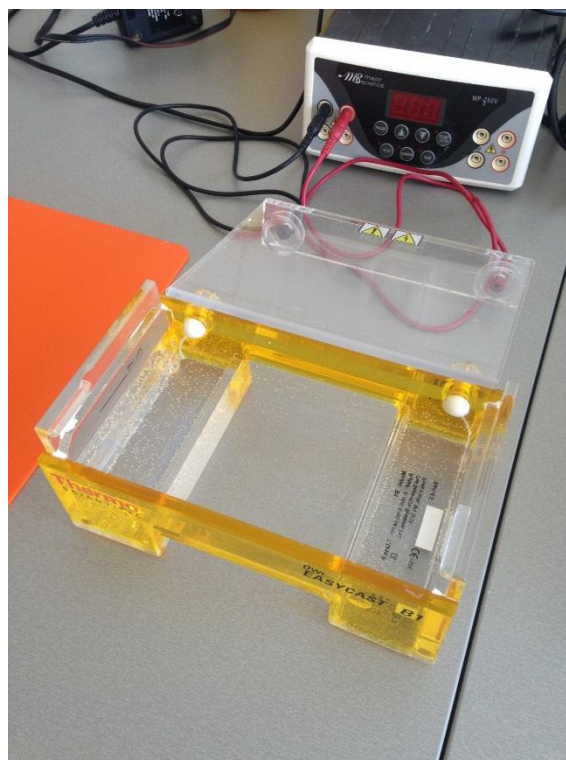
**BE** = bígl



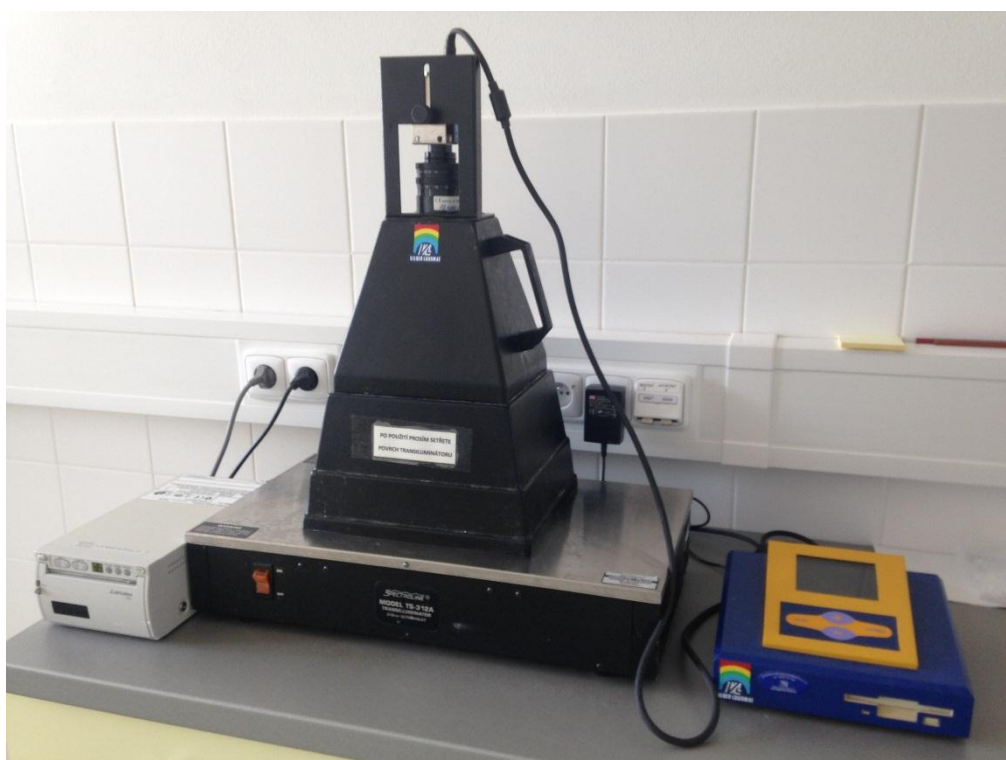
**Přílohy 2, 3:** Vodní lázeň (vlevo) a stojany na reagenie z automatického izolátoru (vpravo)



**Příloha 4:** Automatický izolátor nukleových kyselin (MagCore® HF 16 Plus)



**Přílohy 5, 6:** Termocykler (vlevo) a elektroforetická vana včetně zdroje (vpravo)



**Příloha 7:** UV transiluminátor sloužící k vyhodnocení gelové elektroforézy