

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ  
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**BRNO 2015**

**PETRA ŽALUDOVÁ**

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agromická fakulta**  
**Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat**



Agromická  
fakulta

Mendelova  
univerzita  
v Brně



---

**Dědičné onemocnění očí u australských ovčáků**  
Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*  
doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

*Vypracovala:*  
Petra Žaludová

---

Brno 2015

**Zadání bc. práce**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci Dědičné onemocnění očí u australských ovčáků vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

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

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

V Brně dne:.....

.....

podpis

### Poděkování

Chtěla bych poděkovat především doc. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za odbornou pomoc, vedení při zpracovávání práce, ochotu poradit a pomoci.

Dále děkuji Informačnímu centru Mendelovy Univerzity za možnost vyhledávání odborných článků, poskytnuté časopisy a knihy.

Děkuji i celé své rodině, která při mně stála v době celého studia.

## Abstrakt

Tato práce se věnuje onemocněním očí u plemene australský ovčák. Je zde popsána historie plemene, původ, jeho nejčastější onemocnění a v neposlední řadě stručná charakteristika. U vybraných očních onemocnění jsou popsány jejich projevy a dopady na jedince a geny a jejich mutace. Také se věnuje dostupným genetickým testům, které dokáží odhalit rizikové genotypy způsobující onemocnění.

Klíčová slova: dědičná onemocnění, australský ovčák, HSF4, PRA, CEA

## Abstract

This thesis focuses eye diseases of Australian Shepherds. Full history of the breed is described, its origins, the most common illnesses and brief characteristics. Selected eye diseases are described along with their symptoms and their impacts on individual subjects, along with their genes and mutations. This thesis also includes available genetic tests that are able to detect high-risk genotypes causing disease.

Keywords: hereditary diseases, Australian Shepherd, HSF4, PRA, CEA

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled</b> .....	<b>11</b>
3.1	Evoluce a domestikace psa.....	11
3.2	Australský ovčák .....	12
3.2.1	Historie chovu v české republice .....	12
3.2.2	Povaha a možnosti využití australského ovčáka.....	12
3.2.3	Barvy u australských ovčáků .....	12
3.2.4	Dědičnost barev u australských ovčáků.....	12
3.2.5	Možné zdravotní komplikace spojené s merle zbarvením.....	14
3.3	Genom psa.....	16
3.3.1	Velikost genomu .....	16
3.3.2	Obsah repeticí .....	16
3.3.3	Geny psa .....	16
3.3.4	Mapování psích nemocí informuje i o lidských onemocněních .....	17
3.3.5	Psi představují vhodné zvířecí modely pro studii lidských onemocnění..	18
3.4	Genetické onemocnění u psů .....	18
3.4.1	Dědičná onemocnění.....	18
3.4.2	Přístupy k identifikaci mutací .....	19
3.4.3	Genetické markery .....	19
3.4.4	Analýza genetické vazby .....	19
3.4.5	Asociační studie .....	20
3.4.6	Přístup s kandidátními geny.....	20
3.5	Oční choroby .....	20
3.5.1	Genetická determinace šedého zákalu .....	20
3.5.2	Progresivní retinální atrofie .....	24
3.5.3	Anomálie oka kolií – CEA.....	27
3.6	Genetické testy .....	30
3.6.1	DNA testy a psi.....	30
3.6.2	Psi, dědičná onemocnění a dna testy .....	30
3.6.3	DNA testy pro recesivní mutace .....	31

3.6.4	DNA testy pro dominantní mutace .....	31
3.6.5	Genetické testy pro vyšetření šedého zákalu .....	31
3.6.6	Genetické testy pro vyšetření PRA .....	31
3.6.7	Genetické testy pro vyšetření CEA .....	32
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Přehled použité literatury .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použitých obrázků .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých tabulek .....</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>Přehled použitých zkratk .....</b>	<b>38</b>

## **Přílohy**



## 1 ÚVOD

Dědičné onemocnění očí je velkým a aktuálním problémem u psů. Mnoho jedinců je díky těmto onemocněním vyřazováno z chovu. Chovatelské kluby mají jako podmínku pro uchovnění genetické testy, které prokáží, zda je pes prostý nemoci, přenašeč či postižený.

Je nutné si uvědomit, jak závažný mohou mít onemocnění očí dopad na samotné jedince. Mělo by být proto snahou chovatelů krýt pouze jedince prosté onemocnění.

Se vzrůstající popularitou plemene bohužel přibývá lidí, kteří množí psy bez průkazů původu. Tito lidé nemají často ani zdání o nějakých onemocněních, natož genetických testech.

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem práce je zpracovat nejnovější poznatky z oblasti dědičných očních onemocnění u australských ovčáků, genetických testů pro odhalování variability u známých genů.

Charakteristika genetického založení vybraných aktuálně popsaných onemocnění očí u psů (popis genu, jeho struktury a polymorfizmy asociované s onemocněním) se zaměřením zejména na geny: CEA, PRA, HSF4, a popsat případné DNA testy pro detekci genotypů u genů.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Evoluce a domestikace psa

Domestikace je typicky lidským úsilím. Nápad studovat lidmi přetvořená zvířata pro poznání nás samých je zde již od nepaměti a tomuto studiu už bylo věnováno značné úsilí. Prvními domestikovanými zvířaty byli psi. Genetické důkazy ukazují od Evropy přes Dálný Východ až po místa někde uprostřed. Obecně se předpokládá, že vlci byli dostatečně pohybliví, aby byli schopni se přesouvat spolu s lovci, když hledali kořist někdy na konci paleolitu. Předchůdci dnešních psů se živili zbytky po lovcích a zvykali si na jejich přítomnost, až se z nich za několik generací vyvinulo zvíře vhodné k soužití a práci. Zpráva GRAY et al. (2010) se na psí pohádku dívá trochu jinak – spojuje genetiku s archeologií a vrací do hry Střední Východ jako místo domestikace psů, přinejmenším jako místo výskytu malých psů a tvrdí, že hranice mezi vlkem a psem zmizela v době, kdy se lidé usadili. Přestože není pochyb, že psi pocházejí z jednoho euroasijského předka (*Canis lupus*) se poté se rozšířili do Afriky, Evropy, Austrálie a Ameriky, interpretace detailů o jejich molekulární historii je obtížná. V první fázi domestikace se vlk zmenšil. První ostatky nalezené na blízkém východě jsou považovány za psí právě z důvodů své velikosti. Proces zmenšení psů by byl v přírodě nežádoucí nevýhodou, takže je pravděpodobné, že k němu došlo vlivem lidí. Psi jsou jedinými preagrikulturními domestikovanými zvířaty. Nemuseli být chováni pouze pro maso a i tak byli užiteční. Jejich majitelé těžili z jejich přirozených loveckých schopností a teritoriálního chování a používali je jako účinnou hlídku v okolí obydlí. Genetická, archeologická a kulturní evidence ukazuje, že domestikace vlků nemůže být pochopena jinak než v kontextu s časným sedentismem a rozvojem civilizace. Kulturní rozvoj poskytl prostředí pro umělou selekci a biologické změny a tak i pro „vznik“ psů, jak je známe dnes (DRISCOLL, 2010).

## 3.2 Australský ovčák

### 3.2.1 Historie chovu v české republice

V České republice je většina kynologických organizací zastřešena pod FCI. Australský ovčák patří do skupiny FCI I. – plemena ovčácká, pastevecká a honácká. První fena AUO, která byla importována do ČR se narodila roku 1994 v USA. Již v roce 2006 bylo v plemenné knize ČMKU vedeno 100 psů. Za toto období se u nás narodilo 11 vrhů štěňat, importovalo se 22 zástupců plemene. Plemeno se stávalo více populárnější, o čemž svědčí i zvyšující se počet narozených vrhů, v roce 2008 jich bylo 24 a v roce 2012 dokonce 46 (HARTNAGLE-TAYLOROVÁ, 2013).

### 3.2.2 Povaha a možnosti využití australského ovčáka

Jedná se o inteligentní, učenlivé a chytré plemeno. Jeho charakteristickými rysy je silná fixace na svého pána a ochota udělat pro něj cokoli. Vůči neznámým lidem může být poněkud zdrženlivý (VERHALLEN-VERHOEF, 2010).

V původním záměru sloužil AUO k práci se stádem ovcí, byl používán jako pes farmářů. I dnes je využíván k pasení ovcí či skotu, ale spíše pro sportovní využití. Díky jeho všestrannosti jej často vidíme v různých psích sportech jako je agility, dogfrisbee, obedience či záchranářský výcvik, kde toto plemeno určitě nelze přehlédnout (KOTTOVÁ, 2012).

### 3.2.3 Barvy u australských ovčáků

Základní barvy uznané standardem jsou čtyři a to blue-merle, red-merle, černá a červená. Každá z těchto barev může být s nebo bez bílých znaků, anebo hnědým pálením. Připouští se bílé znaky na čenichové partii, horní části lebky, lících, krku, hrudníku, břichu, tlapkách a nohách (HARTNAGLE-TAYLOROVÁ, 2013).

### 3.2.4 Dědičnost barev u australských ovčáků

Standardní barvy u AUO obsahují dva typy alel,  $B$  = černá dominantní alela,  $b$  = červená recesivní alela. Černý jedinec může být  $BB$  homozygot dominantně černý, nebo  $Bb$  heterozygot. Červený jedinec je potom tedy vždy  $bb$  (HODKOVÁ, 2005).

Příklady křížení dle genů barev jsou uvedeny v tabulkách č. 1-12

Tab. 1: Křížení dominantního homozygota s recesivním homozygotem

	Rodič 1		
Rodič 2		B	B
	b	Bb	Bb
	b	Bb	Bb

→ Vznikají jedinci budou mít černou barvu a budou mít vlohů pro barvu červenou

Tab. 2: Křížení heterozygota a recesivního homozygota

	Rodič 1		
Rodič 2		B	b
	b	Bb	bb
	b	Bb	bb

→ Narození jedinci budou v poměru 50% černých jedinců s vlohů pro červenou barvu a 50% červených

Tab. 3: Křížení dvou heterozygotů

	Rodič 1		
Rodič 2		B	b
	B	BB	Bb
	b	Bb	bb

→ Narodí se 25% černých jedinců, 50% černých jedinců a vlohů pro červenou barvu a 25% červených jedinců

Tab. 4: Křížení dominantního homozygota a heterozygota

	Rodič 1		
Rodič 2		B	B
	B	BB	BB
	b	Bb	Bb

→ Narodí se 50% černých jedinců a 50% černých jedinců s vlohů pro červenou barvu

Tab. 5: Křížení dvou dominantních homozygotů

	Rodič 1		
Rodič 2		B	B
	B	BB	BB
	B	BB	BB

→ Narodí se 100% černých jedinců

Tab. 6: Křížení dvou recesivních homozygotů

	Rodič 1		
Rodič 2		b	b
	b	bb	bb
	b	bb	bb

→ Narodí se 100% červených jedinců

(HODKOVÁ, 2005)

### 3.2.5 Možné zdravotní komplikace spojené s merle zbarvením

Anomálie sluchu a zraku se mohou projevit u merle heterozygotů (Mm) i homozygotů (MM). Mezi projevy může patřit slabá až úplná hluchota, zvýšený nitrooční tlak, ametropie (špatná refrakční schopnost). Anomálie sluchu mohou být také způsobeny absencí pigment v chloupkách ve zvukovodu. Psi s genotypem MM mohou mít i anomálie kostry, problémy s reprodukcí a srdečním systémem, bývají také velmi bledí, mají zesvětlenou barvu sliznic. (GENOMIA, 2015)

To, jestli bude jedinec jednobarevný nebo merle určují alely M = dominantní alela pro merle, m = recesivní alela (KRATOCHVÍLOVÁ, HAVLOVÁ, 2013).

#### Příklady:

Tab. 7: Křížení dvou recesivních homozygotů

	Rodič 1		
Rodič 2		m	m
	m	mm	mm
	m	mm	mm

→ Narození jedinci budou 100% jednobarevní

Tab. 8: Křížení heterozygota a recesivního homozygota

	Rodič 1		
Rodič 2		M	m
	m	Mm	mm
	m	Mm	mm

→ Narodí se 50% merle jedinců heterozygotů a 50% jednobarevných

Tab. 9: Křížení dominantního homozygota a recesivního homozygota

	Rodič 1		
Rodič 2		M	M
	m	Mm	Mm
	m	Mm	Mm

→ Narodí se 100% merle jedinců heterozygotů

Tab. 10: Křížení dvou dominantních homozygotů

	Rodič 1		
Rodič 2		M	M
	M	MM	MM
	M	MM	MM

→ Narodí se 100% merle jedinců homozygotů

Tab. 11: Křížení dominantního homozygota a heterozygota

	Rodič 1		
Rodič 2		M	M
	M	MM	MM
	m	Mm	Mm

→ Narodí se 50% merle jedinců homozygotů a 50% merle jedinců heterozygotů

Tab. 12: Křížení dvou heterozygotů

	Rodič 1		
Rodič 2		M	m
	M	MM	Mm
	m	Mm	mm

→ Narodí se 25% merle jedinců homozygotů, 50% merle jedinců heterozygotů a 25% jednobarevných

(KRATOCHVÍLOVÁ, HAVLOVÁ, 2013)

### 3.3 Genom psa

*Canis familiaris* je teprve třetím savcem s plně sekvenovaným genomem, který byl osekvenován roku 2005. Psi sdílejí s člověkem prostředí i mnoho genetických a získaných onemocnění, a to z nich spolu s jejich unikátní historií šlechtění dělá ideální objekty pro genetické studie (WADE, 2006).

#### 3.3.1 Velikost genomu

Celková velikost sekvenovaného psího genomu je 2,4 gigabází. Euchromatická část psího genomu je přibližně o 500 Mb (18%) menší než v případě lidského genomu (u myši o 150 Mb tj. 6% menší). Rozdíl ve velikosti je patrný v průměrném segmentu zachované syntenie a může být přisuzován dvěma faktorům: (1) nižší míra opakovaných inzercí v psím genomu ve srovnání s člověkem a myší a menší SINEs u psa a (2) hodnoty ancestrálních delecí bází, které jsou téměř stejné u psa a člověka, ale vyšší u myši (K. Lindblad-Toh et al., in prep). Lidský genom sdílí více sekvence se psem (o 650 Mb) než s myší (WADE, 2006).

#### 3.3.2 Obsah repeticí

Inzerce repetitivní sekvence mění velikost genomu a změnou genomických funkcí hraje roli v evoluci. Více než 50 % savčích genomů se skládá z repetice tří hlavních typů: dlouhé roztroušené nukleární elementy (LINE), krátké roztroušené nukleární elementy (SINE) a dlouhé terminální repetice (LTR). Typická LINE má 3-4 kb, zatímco SINE jsou obvykle velké jen několik stovek bází. Některé LINE jsou zahrnuty v retrotranspozici, čímž remodelují obsah genu organismu (Brown, 1999). Nicméně psí genom má obecně méně starších LINE a LTR ve srovnání s myší nebo člověkem. Kirkness a spol. identifikovali aktivní, pro masožravce specifickou SINE rodinu (definovanou jako SINEC\_Cf). U psů se vyskytuje forma genetické variability spočívající v absenci nebo přítomnosti SINE na specifických lokusech častěji než u lidí (Kirkness et al., 2003). Tyto repetice mohou být použity nejen jako polymorfní markery, ale při jejich nevhodném vložení do genomu mohou způsobit onemocnění (WADE, 2006).

#### 3.3.3 Geny psa

Evoluce druhu se odráží v relativní míře mutací ortologních genů, která může odhalit druhově specifickou pozitivní selekci a genové expanze pomocí lokálních



genových duplikací od ancestrálního rozdělení. Analýza psího genomu identifikovala 19 120 genů kódujících proteiny, značně méně než 22 000 genů v současném lidském genomu ENSEMBL setu. Využitím zachovalých sytentií a ortologních vztahů mezi geny dvou druhů, stejně jako podrobným zkoumáním chybějící genové ortologie jsme byli schopni „pročistit“ geny obou druhů. Výsledný počet genů byl 20 426 u člověka a 18 846 u psa. 1 600 lidských genů bez psího ortologu dokazuje redukovanou genovou expanzi u psa, což naznačuje, že psí genom by mohl lépe odrážet společného předka současně sekvenovaných placentálů (K.A. Lindblad-Toh et al., in prep) (WADE, 2006).

### 3.3.4 Mapování psích nemocí informuje i o lidských onemocněních

Studium komplexních lidských nemocí stály v cestě malé velikosti lidských rodin, limitovaná velikost skupin pro GWAS a neschopnost dostatečně určit fenotyp nemocí. Pokusy o stratifikaci lidských nemocí založené na klinické prezentaci, odpovědi na léčbu a dlouhodobých výsledcích byly jen částečně úspěšné (PARKER et al., 2010).

Genetické studie u psů jsou cenné ze tří důvodů. Identifikace psích genů zodpovědných za onemocnění nabízí možnost testování nové léčby, protože z lékařského pohledu jsou lidské a psí nemoci stejné. Studie u psů také často odhalí geny nebo jejich skupiny, které dříve s onemocněním spojovány nebyly. Identifikace genů u psů ukázala, jak se může znepokojivě měnit genom savců při produkci cíleného fenotypu (PARKER et al., 2010).

Hodně psích nemocí je způsobenou mutacemi stejných genů jako u lidí. Například psí hemofilie A je způsobena inverzí genu faktoru VIII a tato inverze způsobuje hemofilii i u lidí (PARKER et al., 2010),

X vázaná vážná kombinovaná imunodeficience pozorovaná u lidí a basetů je u psů způsobena 4 bp delecí *IL2-R gamma* genu, který produkuje zkrácený protein. Více plemen sdílí predispozice k inzulinu dependentnímu diabetu v dospělém věku (samojed, tibetský teriér, kern teriér), alely *DRB* a *DQA* lokusů jsou prokazatelně spojené s onemocněním (PARKER et al., 2010).

Psí lokus *DLA* je zodpovědný za více onemocnění jako je lupus erythematosus (SLE) u Nova Scotia duck tolling retrieverů, zde konkrétně spojený s variací alel *DLA* class II genů. Mutace *SLC3A1* genu způsobují cystinurii typu 1 u lidí a podobné závažné onemocnění u novofundlandských psů (PARKER et al., 2010).

### 3.3.5 Psi představují vhodné zvířecí modely pro studii lidských onemocnění

Rakoviny a autoimunitní onemocnění u psů jsou tak blízké lidským, že se staly modely pro vývoj nových terapií. Rakovinná onemocnění se obecně u psů vyskytují spontánně, s klinickými projevy, histologií, vývojem onemocnění a odpovědí na léčbu stejnými jako u lidí (např. karcinom přechodného epitelu močového měchýře, non-Hodgkinův lymfom, chronická myeloidní leukemie, osteosarkom a melanom). Některé plemena vykazují genetické predispozice k určité formě rakoviny. Skotští teriéři a west highland teriéři mají často karcinom přechodného epitelu močového měchýře (48), skotští jelení psy, irští vlkodavové a rotvajleři zase osteosarkomy a angličtí špringl španělé trpí častěji rakovinou mléčné žlázy. Rakovina mléčné žlázy u anglických špringl španělů ve Švédsku vykazuje spojení s lokusy *BRCA1* a *BRCA2*. U portugalských vodních psů byly nalezeny dva lokusy pro Addisonovu chorobu, jeden v *DLA* regionu, druhý blízko imunosupresivního lokusu *CTLA-4* (PARKER et al., 2010).

V případě Duchenne X-vázané muskulární dystrofie, je psí model (muskulární dystrofie u zlatých retrívrů tak podobný, že je současně studován v mnoha laboratořích. Tuto nemoc způsobuje nedostatek proteinu dystrophinu, důležité součásti komplexu dystrophin-glycoprotein. U psů je to skrytá mutace v souhlasném spoji přijímacího místa, která vede k přeskočení exonu 7, narušení začátku čtecího rámce a předčasné terminaci translace. Na rozdíl od existujícího myšího modelu vykazují postižení psi progresivní ztrátu svalstva s degenerací a fibrózou, stejně jako lidé. Proto jsou používány k testování léčby, jako je transplantace kostní dřeně (PARKER et al., 2010).

## 3.4 Genetické onemocnění u psů

### 3.4.1 Dědičná onemocnění

Ve většině světa se psům jako jediným zvířatům dostává lékařské péče na téměř stejné úrovni jako lidem. Množství nemocí bylo u psů vymýceno pomocí speciálních diet, vakcín a antimirobiálních přípravků, ale jako výsledek lepšího welfare a zdraví se začíná zvyšovat vliv dědičných onemocnění. Dědičná onemocnění jsou způsobena chromosomálními změnami nebo mutacemi působícími změnu exprese struktury nebo funkce kódovaného proteinu. Dělí se do tří skupin: ty, které způsobují velké změny regionů chromozomů, jednogenové defekty a komplexní znaky, způsobené mutacemi více genů s nebo bez přídavného vlivu prostředí. Většina plemen psů jsou uzavřené

populace s intenzivním selekčním tlakem. Snížení genetické diverzity vede ke zvýšenému výskytu dědičných onemocnění. K pochopení dědičného onemocnění je nutné identifikovat genetické mutace zodpovědné za toto onemocnění. U psů tato znalost pomůže eliminovat výskyt onemocnění pomocí identifikace a vyřazení postižených jedinců z plemnitby (MELLERSH, 2008).

### **3.4.2 Přístupy k identifikaci mutací**

Jsou dva způsoby, jak identifikovat mutaci: celogenomový přístup a přístup s kandidátními geny. Při celogenomovém skenování je vyšetřován na přítomnost oblastí a mutacemi celý genom organismu, používá se buď vazebná analýza založená na rodokmenu, nebo asociační studie (popsáno níže). Jakmile je odhalen region obsahující mutaci, jsou testovány kandidátní geny v regionu a jejich vliv na nemoc (MELLERSH, 2008).

### **3.4.3 Genetické markery**

Genomový scan i analýza kandidátních genů využívají genetické markery. Genetické markery jsou variabilní polymorfni regiony DNA, které genetiky navigují a identifikují regiony DNA spojené s cílenými znaky. Aby byly genetické markery užitečné, musí být známá jejich pozice v rámci genomu i pozice k sobě navzájem. Mikrosatelity jsou často využívanou formou genetických markerů, obsahují jednoduchý motiv DNA opakovaný ve dvojicích ve variabilním množství. Tyto repetice se skládají z nukleotidů nebo bází cytosinu a adenosinu – tzv. CA repetice. Množství repetic v mikrosatelitu se liší mezi jednotlivci kvůli polymorfismům – existenci různých forem v rámci populace. Alternativní formy genového nebo genetického markeru na stejném lokusu na chromozomu jsou známé jako alely (MELLERSH, 2008).

### **3.4.4 Analýza genetické vazby**

Markery, geny nebo mutace lokalizované na stejném chromozomu se dědí společně. Čím blíže jsou dva markery k sobě, tím menší je pravděpodobnost, že budou odděleny při rekombinaci. Rekombinace vede k jiné kombinaci genů a markerů, než měli rodiče. Analýzou velkého počtu genetických markerů v celém genomu u psů z rodokmenů vykazujících dědičné onemocnění mohou vědci identifikovat markery, které jsou děděny spolu s onemocněním. Tento proces je znám jako vazebná analýza rodokmenu a vyžaduje analýzu DNA postižených i zdravých členů rodokmenu (MELLERSH, 2008).

### **3.4.5 Asociační studie**

Alternativním přístupem k analýze rodokmenu je využití asociační studie, ve které jsou vybráni z populace postižení a zdraví nepříbuzní jedinci a je testována frekvence, s jakou se určité alely vyskytují v každé této skupině vzhledem k výskytu onemocnění. Moderní plemena se vyvinula poměrně nedávno, obvykle z malého množství zakladatelů a jedinci stejného plemene vykazují nízké hladiny vnitroplemenné variace a obvykle sdílení dlouhé regiony chromozomů IBD (MELLERSH, 2008).

### **3.4.6 Přístup s kandidátními geny**

Každý gen zodpovědný nebo přispívající k onemocnění je nazýván gen kandidátní. Způsoby účasti genu na patologii určitého onemocnění jsou různé. Vyšetření kandidátního genu zahrnuje determinování DNA sekvence genu u postižených i zdravých zvířat a srovnání dvou sekvencí k identifikaci patogenních mutací (MELLERSH, 2008).

## **3.5 Oční choroby**

Dědičná onemocnění očí jsou pravděpodobně nejlépe popsány a charakterizovány dědičnými onemocněními u psů, jak na klinické, tak na molekulární úrovni. Oko je snadno dosažitelné a lze jej snadno neinvazivně vyšetřit a tak odhalit i abnormality ovlivňující vidění psa. Většina mutací spojených s dědičnými očními onemocněními, jsou mutace původně spojované s obdobnými postiženími u jiných druhů zvířat. U psů byly objeveny proto, že zainteresovaný gen byl dobrým funkčním kandidátem na základě výsledků celo-genomové vazebné nebo asociační studie (MELLERSH et al., 2012).

### **3.5.1 Genetická determinace šedého zákalu**

Čočka je průhledná, bikonvexní nevaskularizovaná struktura v předním segmentu oka, zodpovědná za lom světla a jeho soustředění na sítnici. Čočka se skládá z nukleu, kortexu a kapsuly a je podepřena množstvím denzních zonulárních ligament, která jsou připojena ke kapsule a spojují ciliární těleso a rovník čočky. Průhlednost čočky je dosažena nepřítomností světlo rozptylujících organel ve vláknech čočky. Nová vlákna jsou tvořena z ekvatoriálních buněk epitelu čočky, která se prodlužují, syntetizují crystallin a ztrácejí jádra. Crystalliny, tvořící 90% proteinů čočky, přispívají k

průhlednosti tvorbou rozpustných, vysokomolekulárních agragátů, které musí zůstat ve formě roztoku po celou dobu života jedince. Zákaly jsou neprůhlednosti čočky a vyvíjejí se z mnoha důvodů jako je pokročilý věk, diabetes, progresivní retinální atrofie nebo trauma. Primární neboli hereditární zákal (HC) je u psů běžný a je nejčastější příčinou jejich slepoty. HC se vyskytuje u více než 97 plemen, z toho 60 má prokazatelně větší riziko výskytu. HC se mezi plemeny liší vzhledem k anatomické pozici čočky, věku propuknutí onemocnění a progresivnosti.

Navzdory této variabilitě byl popsán pouze jeden příčinný gen, transkripční faktor *HSF4*. Patří do rodiny transkripčních faktorů teplotního šoku, které regulují expresi proteinů teplotního šoku v odpovědi na stres způsobený oxidanty, těžkými kovy, zvýšenými teplotami a bakteriálními či virovými infekcemi. Různé mutace *HSF4* působí autosomálně dominantní i recesivní onemocnění u lidí. Narušení genu vede k vývoji zákalu různými cestami, jako je nízká regulace nebo ztráta posttranslační modifikace crystallinů. Jednonukleotidová delece na stejné pozici *HSF4* je spojena s HC u australských ovčáků. Tato HC bývá dominantní nebo kodominantní, není zcela penetrující a je typicky spojena s pasteriorním subkapsulárním zákalem v různém věku. Je pravděpodobné, že jiné mutace spojené s vývojem HC se kosegregují v populaci AUO, protože ne všichni psi s bilaterálním pasteriorním subkapsulárním zákalem mají kopii *HSF4* delece (MELLERSH, 2012).

### **3.5.1.1 Frekvence výskytu a detekce mutací v genu *HSF4* u AUO**

Okolo 23 % australských ovčáků jsou nosiči genetické mutace zodpovědné za dědičný šedý zákal. U psů, kteří nesou pouze jednu mutaci (heterozygoti) může dojít k méně závažné formě šedého zákalu. U psů, kteří nesou mutaci dvojí – recesivní homozygoti – se většinou rozvine závažnější forma tohoto onemocnění. V obou případech postižení psi přenášejí toto onemocnění na jejich potomstvo. Psi používaní v plemenitbě, kteří jsou nosiči mutace (a to jak homozygoti, tak heterozygoti) šíří nemoc v rámci plemene a zvyšují frekvenci výskytu mutace a výrazně ovlivňují zvyšování počtu postižených psů (QUENEY, 2012).

### **3.5.1.2 Odběr vzorků a izolace DNA**

Veterinář provede jednoduchý stěr ze stěny dutiny ústní a následně jej pošle na laboratorní vyšetření. Výsledek, který je doručen do několika dnů indikuje, zdali je testovaný pes „čistý“, přenašeč či onemocněním trpí. Vystaví se genetický certifikát, jež

musí být předkládán při prodeji zvířat, jakožto garance, že prodávána štěňata jsou prostá dědičného šedého zákalu. Veterinář, který si všimne časných očních problémů u mladého australského ovčáka, může provést DNA test a potvrdit či vyvrátit diagnózu tohoto onemocnění. Pokud je pes postižen, měli by být vyšetřeni i jeho rodiče. Chovatel, jenž ví o tomto onemocnění ve svém chovu, provádí selekci psů (na plemenitbu používá jen zdravá zvířata, či přenašeče s čistými), aby zabránil šíření tohoto onemocnění (QUENEY, 2012).

Z tampónů bukalních stěrů (Cytotak Transwab; Medical Wire and Equipment, Wiltshire, UK, Order number MW146) je DNA extrahováno za použití QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, West Sussex, UK, Order number 51304) podle informací od výrobce. Z 5 ml vzorků EDTA krve je DNA extrahováno za použití nukleon genomic DNA extraction kit (Tepnel, Manchester, UK) podle pokynů výrobce (MELLERSH, 2009).

### **3.5.1.3 Genotypizace**

Genomová DNA je testována na delecii v exonu 9 *HSF4*. Primery (přímý primer: Vic-CGAGTGTGACTTCTGCGTGA, zpětný primer: GTTCAGGCTGTTGGGCATT) obklopující dříve popisovanou mutaci *HSF4* jsou použity k zmnožení genomové DNA. PCR proběhne ve 12  $\mu$ l reakcích složení: 1.2 U Amplitaq Gold DNA Polymeráza (Applied Biosystems), 200  $\mu$ M dNTPs (GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, Bucks, UK), 1.5 mM  $MgCl_2$  (Applied Biosystems), 1x Geneamp PCR Gold Buffer (Applied Biosystems), 40 nM kodujících (Applied Biosystems) a nekodujících oligonucleotidových primerů (Proligo) a 10–100 ng templátové genomové DNA. Reakční směsi jsou umístěny do termocycleru při 95 °C na 10 min, následuje 32 cyklů při 95 °C na 30 s, 58 °C na 30 s a 72 °C na 60 s, konečné elongační stádium při 72 °C na 10 min. Jeden mikrolitr PCR směsi s 10  $\mu$ l Hi-Di formamidu se umístí na 96-well PCR plate (ABgene, Epsom, Kent, UK), zahřeje na 95 °C na 1 min a chladí se na ledu 2 minuty, pak se umístí do ABI 3100 genetického analyzátoru (Applied Biosystems) pro elektroforézu (MELLERSH, 2009).

### **3.5.1.4 Sekvenování *HSF4***

PCR páry primerů jsou navrženy tak, aby zmnožily každý z 13-ti exonů a 80 bp okolní sekvence psiho ortologu *HSF4*. Každý exon je amplifikován z genomové DNA. PCR proběhlo ve 12  $\mu$ l reakcích složení: 1.2 U Amplitaq Gold DNA Polymeráza (Applied Biosystems), 200  $\mu$ M dNTPs (Amersham), 1.5 mM  $MgCl_2$  (Applied

Biosystems), 1x Geneamp PCR Gold Buffer (Applied Biosystems), 0.83  $\mu$ M kodujících a nekodujících primerů (Proligo) a 10–20 ng templátové genomové DNA. GC-rich templáty jsou amplifikovány v 10- $\mu$ l reakcích složených z: 1 U Hot Star Taq DNA polymeráza (Qiagen), 300  $\mu$ M dNTPs (Amersham), 1xPCR buffer (Qiagen), 1x Q-solution (Qiagen), 1  $\mu$ M kodujících a nekodujících primerů (Proligo) a 10–20 ng templátové genomové DNA. Reakční směsi se poté dají do termocycleru à 95 °C na 10 min, následuje 35 cyklů při 95 °C na 30 s, 30 s při teplotě annealingu a 72 °C na 60 sec, konečná elongace 72 °C na 10 min. PCR primery použité pro sekvenování psího *HSF4* byly popsány dříve. Produkty PCR se vyčistí za použití MultiScreen HTS PCR purification plates (Millipore, Billerica, MA, USA). Vyčištěné PCR fragmenty jsou sekvenovány v přímém i reverzním směru za použití 30 ng templátové DNA, 0.27  $\mu$ M primeru, 0.5  $\mu$ L Big Dye v3.1 terminator chemistry mix (Applied Biosystems), 2  $\mu$ L SBDD pufru (160 mL of 1 M Tris base pH 9, 3 mL of 1 M MgCl<sub>2</sub>, 50 ml tetramethlene sulphone a 290 mL ultračisté vody do objemu 503 mL) - celkový reakční objem 6  $\mu$ L. Reakce jsou provedeny na 96-ti well PCR plates (ABgene) sekvenované při podmínkách: 96 °C na 30 s, následuje 44 cyklů při 92 °C na 4 s, 55 °C na 4s a 60 °C na 90 s. Sekvenční reakce jsou uspišeny přidáním 60  $\mu$ L 80% isopropanolu, následuje centrifugace (2254  $\times$  g, 30 min) na Eppendorf 5804 benchtop centrifuge (Eppendorf International, Hamburg, Germany). Plotny se poté obrátí a promyjí 100  $\mu$ L 60% isopropanolu a centrifugují na 2254 x g 10 min. Dále jsou inkubovány při 37 °C na 30 minut, aby uschnuly, a přidá se 10  $\mu$ L Hi-Di formamidu. Poté se zahřejí na 95 °C na 1 min a přenesou na led na dvě minuty, poté jsou přemístěny na ABI 3100 genetický analyzátor pro elektroforézu. Sekvenovaná data se zpracují za použití Staden package software (<http://staden.sourceforge.net/>) (MELLERSH, 2009).

### **3.5.1.5 Výsledky testování**

Vzorky pocházely od 392 AUO, 376 z nich pocházelo z 12-ti různých zemí, u 16-ti byla země původu neznámá. U 293 psů (74,74%) nebyly objeveny žádné abnormality, 99 psů (25,26%) mělo při prohlídce zákal minimálně v jednom oku. Z nich mělo 70 oboustranný, 24 jednostranný zákal, u pěti nebyl zákal specifikován (MELLERSH, 2009).

### 3.5.1.6 Způsoby operace šedého zákalu

Intrakapsulární extrakce – jde o odstranění čočky z oka i s pouzdrém, tento postup se vzhledem k modernějším metodám uplatňuje spíše v případech, když se operuje již utržená čočka. Extrakapsulární extrakce – jedná se o otevření oka a pouzdra čočky, obsah čočky se odstraní a po vyčištění pouzdra se implantuje čočka nová z umělé hmoty. Fakoemulzifikace je zákrok, při kterém se speciální sondou napojenou na chirurgický přístroj rozmělní obsah čočky a je zároveň odsáván, k tomuto postupu je zapotřebí složité vybavení (VLACH, 2004).

### 3.5.2 Progresivní retinální atrofie

Jde o ztrátu funkce tyčinek následovanou dysfunkcí i čípků, prvním příznakem je šeroslepost. Následuje zhoršení zraku i za silného světla a nález charakteristických změn na fundu při oftalmologickém vyšetření. Dochází k zeslabování cév retiny, zvýšené reflektivitě tapetum lucidum jako výsledek zúžení retiny a atrofie optického disku. U některých psů se vyvine sekundární zákal, který se může rozvinout tak, že zastře sítnici a k diagnóze je nutné použít elektroretinografii (ERG) (MELLERSH, 2012).



Obr. 1: Ukázka ztenčených cév (ASHGI.ORG, 2013)



### **3.5.2.1 Příčiny PRA**

Jedná se o dědičnou degeneraci sítnice, což znamená, že se toto onemocnění dědí. PRA se nejčastěji vyskytuje u australských honáckých psů, australských ovčáků, cardigan welsh corgiů, kólií, mastifů, pudlů, retrívrů, kníračů, setrů, španělů a sibiřských haskyů. PRA je běžně dědičné autosomální recesivní onemocnění, což znamená, že ovlivňuje zvířata s dvěma kopiemi zmutovaného genu – jeden od každého z rodičů. Psi s jednou kopií mutovaného genu nevykazují znaky onemocnění a jsou označováni jako přenašeči. Jinou příčinou může být dědičná autosomální dominance (pouze jedna kopie mutovaného genu stačí ke vzniku onemocnění). Posledním způsobem je X-vazba, kdy se mutovaný gen nachází na X chromozomu (MACPETE, 2014).

### **3.5.2.2 Symptomy PRA**

U psů postižených tímto onemocněním se objevuje noční slepota. Můžete si všimnout, že váš pes má problémy s viděním v noci či v jakékoli tmě. Navíc, zornice psa se vždy jeví jako rozšířené. Se zvyšující se závažností zvířata přestávají vidět i za denního světla a eventuálně se mohou stát i slepými. Pokud pes naráží do věcí (zejména v neznámém prostředí) je nezbytné ihned vyhledat odbornou pomoc (MACPETE, 2014).

### **3.5.2.3 Formy PRA u mladých psů**

Vyskytují se většinou mezi 2-6 týdny, v období postnatální diferenciaci retiny, jsou charakterizovány abnormálním vývojem tyčinek a čípků. Existují tři geneticky vzdálené formy autosomálně recesivní EPRA: tyčinko-čípková dysplazie typ 1 (RCD1), typ 2 (RCD2) a časná retinální degenerace (ERD)(Acland et al., 1989) (MELLERSH, 2012).

### **3.5.2.4 Formy PRA v pozdějším věku**

Zde dochází k degeneraci fotoreceptorů, které se vyvinuly normálně. Nejde o mutace genů nutných pro vývoj fotoreceptorů, jako u EPRA, ale mutace se týkají genů nutných pro dlouhou výdrž a funkci fotoreceptorů. Progresivní tyčinko-čípková degenerace (PRCD) je jednou z forem LPRA, která postihuje mnohá plemena. PRCD lokus byl zmapován na velkém regionu na CFA9 (psí chromozom 9) v roce 1998 (Acland et al., 1998), ještě v době, kdy nebyl dostupný celý psí genom. Toto onemocnění je unikátní tím, že se dědí autosomálně dominantně a je způsobeno jednou nesynonymní C→G transverzí nukleotidu 11. genu pro rhodopsin (RHO), která mění

Thr-4 na Arg (T4R). Psi s RHO mutací mají do 3-6 měsíců normální funkci fotoreceptorů, ale od 13 měsíců jsou již výsledky ERG abnormální (MELLERSH, 2012).

### **3.5.2.5 *Studium genetiky dědičných retinopatií, PRA u lidí i psů***

Více než 100 plemen segreguje rozdílné retinopatie, jako např. PRA, nabízí se tak pro identifikaci nových retinopatie způsobujících genů a jako unikátní model pro léčbu homologních lidských retinálních onemocnění. U psů je jednodušší identifikace příčinné mutace než u lidí hlavně v důsledku silného efektu zakladatele a genetickému driftu. Mnohé geny zodpovědné za PRA již byly identifikovány. PRA je klinicky homogenní skupinou onemocnění charakterizovanou ztrátou nočního vidění v prvních letech (věk 2-5), následovanou progresivní ztrátou periferního zorného pole a finální ztrátou zraku s úvodním úbytkem tyčinek a čípků (ANDRÉ et al., 2008).

U psů se věk propuknutí onemocnění liší mezi plemeny. PRA jsou geneticky heterogenní, s různými druhy přenosu a velkým množstvím zahrnutých genů a mutací. V současnosti bylo ke zkoumání psího PRA použito 10 genů a jejich mutace u různých plemen (tabulka 1). Každý typ PRA se vyskytuje vždy hlavně u jednoho plemene, PRA-prcd je výjimkou, postihuje více než 20 plemen. Dvě formy PRA vázané na X byly identifikovány, obě zahrnují RPGR gen (retinitis pigmentosa GTPázový regulátor) s dvěma rozdílnými mutacemi exonu 15. U různých plemen: XLPR1 způsobuje předčasný stop kodon proteinu samojedů a husky, XPLRA2 změnu proteinové sekvence u kříženců. PRA psů má genotyp podobný retinitis pigmentosa u lidí. Retinitis pigmentosa (RP) je nejvíce se vyskytující skupinou dědičných retinopatií u lidí, postihuje jednoho z 3600 jedinců. Dosud bylo zmapováno 54 lokusů nesyndromové RP a v nich bylo identifikováno 39 genů. Tyto geny mohou za 50% případů RP (ANDRÉ et al., 2008).

### **3.5.2.6 *Sběr vzorků a analýza rodokmenů***

Pro extrakci DNA (k analýze genové sekvence) jsou potřeba vzorky krve a tkání (např. retina). Všechny vzorky musí být doprovizeny veterinárním potvrzením o tetování a/nebo čipu zvířete, klinickými daty (s relevantními vyšetřeními – oftalmoskopie, ERG, fluoresceinová angiografie...) a genealogickými daty. Prvním krokem molekulární analýzy onemocnění je sestavení přesného rodokmenu ze všech dostupných genealogických a klinických dat. Tento rodokmen vymezuje postižené psy,

zdravé psy a přenašeče, čímž poskytuje hypotézu o způsobu přenosu. Toto jako první ukazuje, zda je onemocnění rodové, pokud ano, možnosti přenosu jsou tyto:

- *Monogenní* – jeden gen je zahrnut ve vývoji onemocnění a segregace odpovídá mendelovským pravidlům s očekávanými proporcemi postižených psů podle hypotetického módu přenosu
- *Multigenní* – v tvorbě onemocnění je zahrnuto více genů a není očekávána daná proporce postižených psů. 77
- *X-vázané* – X-vázaný přenos je nejčastější, hlavně jsou postiženi samci a ve vzácných případech i samice, samci nemohou být přenašeči. (ANDRÉ et al., 2008)

Toto jsou nejjednodušší a nejčastější způsoby přenosu, ale byly pozorovány i jiné způsoby:

- *Maternální přenos* – jsou postiženy jen samice, gen je nesen mitochondriálním genomem
- *Neúplná penetrance* – část psů nevykazuje fenotyp, způsobeno buď vlivem prostředí, nebo dalšími neznámými geny
- *Kodomínance* – dva mutované geny se spolu-vyjadřují a tvoří společný fenotyp (ANDRÉ et al., 2008).

### **3.5.3 Anomálie oka kolí – CEA**

#### **3.5.3.1 Historie onemocnění**

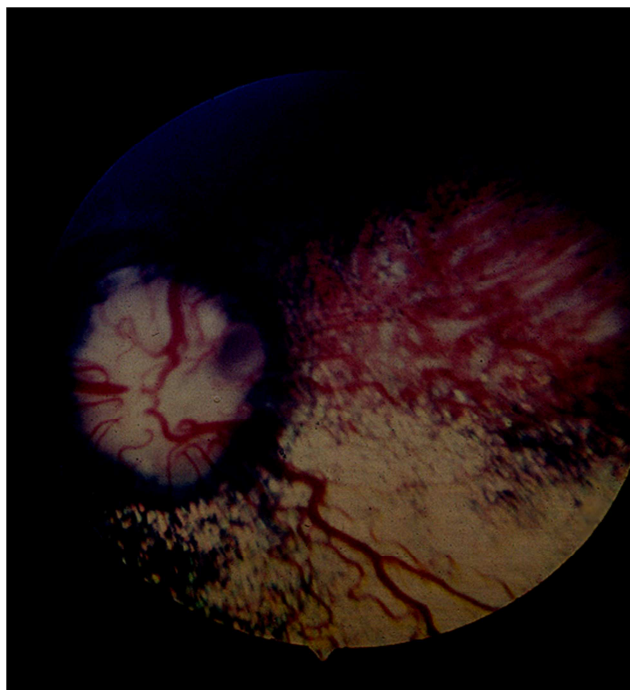
V roce 1969 byly provedeny pokusy, při nichž se testoval přenos anomálie oka kolí křížením zvolených jedinců. Při spojení zdravého psa a zdravé feny se narodilo 26 potomků z celkově 3 vrhů, 21 z nich bylo zdravých a 5 (19%) bylo postiženo onemocněním. V dalším spojení zdravého psa a CEA pozitivní feny vzešlo 78 jedinců z 12-ti vrhů, zde bylo postižených onemocněním CEA 47 (60%) jedinců a 31 zdravých. Díky těmto pokusným křížením bylo dokázáno, že se jedná o onemocnění genetického původu a je předáváno na potomstvo (DOSTÁL, 2007).

#### **3.5.3.2 Charakteristické znaky onemocnění**

Oční anomálie kolí (*cea*) je dědičné psí onemocnění charakterizované regionální hypoplazií choroidey, vysoce vaskularizované vrstvy oka, která zásobuje retinu krví a živinami. Oftalmoskopicky se CEA projevuje jako detekovatelný defekt fundu

lokalizovaný temporálně od očního nervu. Defekty skléry charakterizované kolobomatózními lézemi se mohou také objevit, prezentují se jako díry zachvacující hlavu očního nervu nebo okolní fundus. Někdy mohou být pozorovány i klikaté retinální cévy a mnohačetné sklady. Slabě až středně postižení jedinci si zachovávají normální vidění po celý život. Nicméně, vážně postižení psi, hlavně ti s kolobomy, mohou vykazovat závažné odchlípení sítnice vedoucí ke slepotě. U těchto případů se může objevit subretinální a preretinální neovaskularizace a intraokulární hemoragie. Onemocnění připomíná choroidoretinální abnormality pozorované při onemocnění Alagille nebo syndromu renálního kolobomu (MIM Nos. 118450 a 120330). U psovitých je *cea* fenotyp omezen na oko. *Cea* je široce rozšířena u psů s prevalencí 70-97% pro drsnosrsté a hladkosrsté kolie v USA a UK a přibližně 68% u drsnosrstých kolií ve Švédsku. (LOWE et al., 2003)

Prevalence u Border kolií je nižší, přibližně 2-3% v UK a USA (G. M. Acland, nepublikováno). *Cea* je také popsána u Australských ovčáků, Lancashire heelerů, Shetland sheepdogs a jiných plemen. Protože všechna plemena, u kterých se toto onemocnění vyskytuje, jsou pastevecká plemena nebo jsou odvozena od klasických pasteveckých plemen, předpokládá se existence dosud neprokázané společné alely. (LOWE et al., 2003)



Obr. 2: Zklikatělé cévy (SHARP A.C., 2013)

Onemocnění bylo intenzivně studováno u drsnou a hladkosrstých kolí v šedesátých letech minulého století, kdy byl popsán klinický fenotyp, dědičnost a histopatogeneze. Primární fenotyp *cea*, choroidální hypoplasie, je považován za autosomálně recesivní znak. Nicméně, extrémně vysoká incidence u některých plemen, spolu s variabilní expresí fenotypu a důkazy neúplné penetrance v některých populacích zastírají pravý mód dědičnosti onemocnění. Vytvoření mapy psího genomu umožnilo lokalizaci specifických psích onemocnění s dostatečnou přesností k identifikaci zodpovědného lokusu a definování korespondující lidské mapy. Současná verze psí genomové mapy integruje cytogenetickou meiotickou vazbu a radiční hybridní mapy a sestává z 1800 mikrosatelitových markerů, sequence-tagged sites (STSs) a genů. Další genomové zdroje, jako minimální testovací set pro celogenomové scany, 8.1x duplicitní psí BAC knihovna a chromozomově specifické barvení poskytují základní nástroje při snaze o pozicionální klonování (LOWE et al., 2003).

### 3.5.3.3 *Diagnóza a léčba*

U štěňat je nejběžnějším znakem postižení CEA ztenčující se cévnatka – ta však není na samotném oku patrná, takže je opravdu důležité nechat vyšetřit zrak psa časně. I přesto však není vždy snadné toto onemocnění odhalit. Jak štěňata rostou, dochází k normálním změnám na sítnici, které mohou skrývat přítomnost malých skvrn na cévnatce.

Pokud pes vykazuje známky slepoty, měl by veterinář prohledat záznamy v kartě zvířete a provést fyzické zkoušky včetně zkoušky zrakové. Veterinář by také měl doporučit návštěvu veterinárního očního lékaře, který provede důslednější vyšetření, které vyloučí jiné důvody, proč by pes mohl mít zhoršený zrak (být postižený slepotou). Tyto testy mohou zahrnovat:

- Chemické testy, které hodnotí funkčnost ledvin, jater a slinivky, stejně jako hladiny cukru v krvi.
- Kompletní rozbor krve v souvislosti s krevními onemocněními.
- Elektrolytický test, který se provádí pro jistotu, že vaše zvíře netrpí elektrolytickou disbalancí (nerovnováhou).
- Měření krevního tlaku.
- Screeningový test, který vyloučí infekční onemocnění.

- Rentgen hrudníku a břicha, který sleduje, zdali se nevyskytují některé anomálie.

Bohužel, neexistuje žádná léčba pro CEA. Avšak u psů postižených touto chorobou, kteří trpí odchlípením sítnice či mají díry v oku (coloboma), může chirurgický zákrok minimalizovat negativní dopady.

Je zde však dobrá zpráva – mnoho psů, u kterých se CEA objeví, není postižených natolik, aby došlo ke ztrátě zraku→projev CEA u psů nutně neznamená, že by pes musel oslepnout.

Protože je CEA genetická porucha, nelze provádět prevenci – nejlepší cestou, jak poruchu eliminovat je nezařazovat postižené psy do chovu (PETHEALTHNETWORK, 2012).

## **3.6 Genetické testy**

### **3.6.1 DNA testy a psi**

Pes je jedinečným modelovým organismem, u kterého se dají studovat vrozené znaky, zahrnující vrozená onemocnění, chování i morfologii. U psů se zvyšuje počet geneticky podmíněných onemocnění, ale zároveň se zlepšují metody k odhalování genetického základu těchto nemocí. K mutacím s mendelovskými znaky se přidalo množství takových, které jsou spojeny s geneticky komplexními podmínkami. V současnosti jsou dostupné DNA testy pro více než 80 různých psích mutací, pro 120 plemen je dostupný minimálně jeden test (MELLERSH, 2012).

### **3.6.2 Psi, dědičná onemocnění a dna testy**

Intenzivní selekce, vysoký podíl inbreedingu, extenzivní využití samců a genetická izolace – to všechno jsou typické vlastnosti moderních plemen psů. Je obecně známo, že čistokrevní psi mají větší riziko dědičného onemocnění, než jejich nečistokrevní bratřenci. Je stále větší tlak na zlepšení zdravotního stavu u čistokrevných psů a proto se častěji používají DNA testy jak před plemenitbou, tak při diagnóze. Populace čistokrevných psů jsou geneticky omezené a mnohé nesporně potřebují maximalizovat svou diverzitu. Chovatelé většinou využívají DNA testy ke zdokonalení plemenitby, ale je potřeba snížit výskyt škodlivých mutací a udržet genetickou diverzitu. Data ze studií

nejsou vždy použitelná a pochopitelná pro majitele, proto by poskytovatelé DNA testů měli přikládat i laická vysvětlení (MELLERSH, 2012).

### **3.6.3 DNA testy pro recesivní mutace**

Většina DNA testů je pro autosomálně recesivní mutace spojené s mendelovskými nebo monogenními znaky. Některé z těchto znaků jsou morfologické, jako např. barva srsti, ale většina souvisí s vážnými onemocněními. Doporučení pro chovatele jsou jednoznačná – fena i pes by měli být testováni a přenašeči a geneticky postižení by měli být párováni pouze s jedinci bez mutací. Mnozí majitelé i veterináři se drží spíše párování pouze zdravých homozygotů. Recesivní mutace způsobující onemocnění vyskytující se v pozdějším věku se eliminují jen těžko, pokud není dostupný DNA test (MELLERSH, 2012).

### **3.6.4 DNA testy pro dominantní mutace**

Dominantní mutace představují pro majitele dilema, protože všichni potomci, kteří zdědí tuto mutaci, budou postiženi klinickými příznaky onemocnění a je tedy těžší ospravedlnit zařazení přenašečů do plemenitby. Tyto testy vyřazují větší množství psů – působí větší poškození diverzity plemen (MELLERSH, 2012).

### **3.6.5 Genetické testy pro vyšetření šedého zákalu**

Při testech na vyšetření šedého zákalu se stanovuje u AUO přítomnost delece 1bp v exoně 9, genu kódujícím HSF4. Pokud se objeví tato delece, dochází k rozvoji binokulární katarakty v různém věku. U AUO je šedý zákal děděn autozomálně dominantně, ale s neúplnou penetrací. (SLOVGEN, 2015)

Výsledky testu mohou být N/N -> NORMAL, geny od matky i otce jsou nepoškozené, jedinec je zdravý homozygot. Další možný výsledek je N/A -> CARRIER, jedinec je přenašeč, heterozygot. Poslední typ výsledku je A/A -> AFFECTED, geny od matky i od otce jsou poškozené, jedinec je homozygot s oběma mutovanými alelami. (SLOVGEN, 2015)

### **3.6.6 Genetické testy pro vyšetření PRA**

Při testech se stanovuje kauzální mutace G1298A, lokalizovaná na 9. psím chromozomu. Onemocnění se dědí autozomálně recesivně. (SLOVGEN, 2015)

Varianty výsledků: N/N -> ZDRAVÝ JEDINEC, oba dva geny jsou nepoškozené, jedinec je zdravý homozygot.

N/P -> PŘENAŠEČ, jeden gen je postižený

P/P -> POSTIŽENÝ JEDINEC, obě dvě alely jsou zmutované

### 3.6.7 Genetické testy pro vyšetření CEA

U postižených jedinců je identifikována delece 7,8kb v intronu 4 genu *NJEH1*. Onemocnění je autozomálně recesivní. (GENOMIA, 2015).

Výsledek testu může být R/R -> ZDRAVÝ JEDINEC, oba geny jsou nepoškozené. Nebo r/R -> PŘENAŠEČ, jedinec má jeden postižený gen. Poslední variant výsledku je r/r -> POSTIŽENÝ, obě alely jsou mutované. (GENOMIA, 2015)



## 4 ZÁVĚR

Se vzrůstající popularitou plemene australský ovčák dochází i k rozvoji v oblasti zkoumání a testování dědičných onemocnění. Díky těmto testům je možné včas odhalit případné mutace a zařazovat do chovu pouze čisté jedince či přenašeče.

K častému onemocnění patří dědičný šedý zákal. Toto onemocnění způsobuje gen *HSF4*, který patří do rodiny transkripčních faktorů teplotního šoku. Narušení tohoto genu vede k rozvoji šedého zákalu. Přibližně 23% australských ovčáků má tuto genetickou mutaci.

Další neméně závažné onemocnění je progresivní retinální atofie. Jedná se o dědičné autosomální recesivní onemocnění. U psů, kteří trpí tímto onemocněním se objevuje noční slepota a zornice psa jsou vždy rozšířené. Existují různé formy PRA u mladých a starších psů. Věk propuknutí onemocnění se také liší mezi plemeny. Díky zkoumání tohoto onemocnění u psů dochází i k rozvoji léčby retinopatií u člověka.

Anomálie oka kolií je charakterizována regionální hypoplazií choroidey. Jedná se o dědičné onemocnění. Při tomto onemocnění můžeme pozorovat regionální zklíkatělé cévy. Psi, kteří jsou slabě až středně postiženi si můžou zachovat normální vidění po celý život.

Prevence u těchto onemocnění neexistuje, protože jsou to genetické poruchy. Jediná eliminace je možná, pokud do chovu nebudou zařazováni postižení jedinci.

Mnoho laboratoří nabízí testování na tyto nemoci. Některé mají dokonce i speciální programy pro určitá plemena. Chovatelské kluby zprostředkovávají výhody pro jedince, kteří mají provedené genetické testy v podobě slev na klubové akce a slev na následné uchovnění.

## 5 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- ANDRÉ C., CHAUDIEU G., THOMAS A., JONGH O., JEGOU P.J., CHAHORY S., CLERC B., PILORGE P., BRENAC O., 2008: *Hereditary retinopathies in the dog: Genetic fundamentals and genetic tests*. Databáze online [cit. 2015-03-29]. Dostupné na: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- DOSTÁL J., 2007: *Genetika a šlechtění plemen psů*. Dona, České Budějovice, 261s.
- GENOMIA, 2015: *Merle zbarvení srsti psů*. Databáze online [cit. 2015-04-17]. Dostupné na: <http://www.genomia.cz/cz/merle/>
- GENOMIA, 2015: *CEA – Anomálie očí u kolií*. Databáze online [cit. 2015-04-19]. Dostupné na: <http://www.genomia.cz/cz/test/cea-collie-eye-anomaly/>
- HARTNAGLE-TAYLOROVÁ J.J., 2013: *Australský ovčák od A do Z*. PLOT, Praha, 379s. ISBN 978-80-7428-198-3.
- HODKOVÁ M., 2005: *Jakou barvu budou mít naše štěňata australských ovčáků?* Databáze online [cit. 2015-04-18]. Dostupné na: [www.diandra.wz.cz](http://www.diandra.wz.cz)
- KOTTOVÁ A., 2012: *Možné problémy ve výchově aneb co jste možná o ausíkovi nevěděli*. Databáze online [cit. 2015-04-16]. Dostupné na: [www.aussiesworld.cz](http://www.aussiesworld.cz)
- KRATOCHVÍLOVÁ N., HAVLOVÁ A., 2013: *Merle zbarvení*. Databáze online [cit. 2015-04-18]. Dostupné na: [www.aussiesworld.cz](http://www.aussiesworld.cz)
- LOWE K.J., KUKKOVA V.A., KIRKNESS F.E., LANGLOIS C.M., AGUIRRE D.G., ACLAND M.G., OSTRANDER A.E., 2003: *Linkage mapping of the primary disease locus for collie eye anomaly*. Databáze online [cit. 2015-04-01]. Dostupné na: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- MACPETE R., 2014: *Progressive Retinal Atrophy in Dogs*. Databáze online [cit. 2015-04-10]. Dostupné na: [www.pethealthnetwork.com](http://www.pethealthnetwork.com)
- MELLERSH S.C., 2008: Give a dog a genome. *The Veterinary Journal*, 178: 46-52
- MELLERSH S.C., McLAUGHLIN B., AHONEN S., PETTITT L., LOHI H., BARNETT C.K., 2009: Mutation in *HSF4* is associated with hereditary cataract in the Australian Shepherd. *Veterinary Ophthalmology*, 12: 372-378

- MELLERSH S.C., 2011: DNA testing and domestic dogs. *Mammalian Genome* [online]., vol. 23, 1-2, s. 109-123 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1007/s00335-011-9365-z. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22071879>
- MELLERSH C.S., 2012: Genetics of Eye Disorders in the Dog, s. 218-233. In: OSTRANDER A.E., RUVINSKY A., *The Genetics of the Dog*. Wallingford, USA, 521 s. ISBN 978-1-84593-940-3
- PARKER G. H., SHEARIN L.A., OSTRANDER A.E., 2010: Man's Best Friend Becomes Biology's Best in Show: Genome Analyses in the Domestic Dog. *Annu Rev Genet*, 44: 309-336
- PETHEALTHNETWORK, 2012. *Collie Eye Anomaly*. [online] [cit. 2015-04-02]. Dostupné na: [www.pethealthnetwork.com](http://www.pethealthnetwork.com)
- QUENEY G., 2012: *Hereditary Cataract of Australian Shepherd*. Databáze online [cit. 2015-04-01]. Dostupné na: [www.antagene.com](http://www.antagene.com)
- SLOVGEN, 2015: *HC – hereditárna katarakta*. Databáze online [cit. 2015-04-20]. Dostupné na: <http://www.slovgen.sk/detekcia-ochoreni-diseases/dedicne-prenosne-genetic-diseases/hc-hereditarna-katarakta/>
- SLOVGEN, 2015: *Progresívna retinálna atrofia – PRA-prcd*. Databáze online [cit. 2015-04-21]. Dostupné na: <http://www.slovgen.sk/detekcia-ochoreni-diseases/dedicne-prenosne-genetic-diseases/prc-prcd/>
- VERHALLEN-VERHOEF E., 2010: *PSI Velký atlas plemen*. Rebo, Čestlice, 544s. ISBN 978-80-255-0433-8
- VLACH T. MVDr., 2004: *Šedý zákal u psů a možnosti jeho terapie*. Databáze online [cit. 2015-04-015]. Dostupné na: [www.veterina-info.cz](http://www.veterina-info.cz)
- WADE M.C., KARLSSON K.E., MIKKELSEN S.T., ZODY C.M., LINDBLAD-TOH K., 2006: The Dog Genome: Sequence, Evolution, and Haplotype Structure, s. 179-205. In: OSTRANDER A.E., GIGER U., LINDBLAD-TOH K., *The Dog and Its Genome*. Cold Spring Harbor, New York, 584 s. ISBN 0879697423

## **6 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Ukázka ztenčelých cév

Obr. 2 Zklikatělé cévy

Obr. 3 Možnosti barev u australského ovčáka

Obr. 4 Red merle AUO

Obr. 5 Blue merle AUO

Obr. 6 AUO černý s bílými znaky

Obr. 7 AUO červený s bílými znaky

## **7 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK**

Tab. 1 Křížení dominantního homozygota s recesivním homozygotem

Tab. 2 Křížení heterozygota a recesivního homozygota

Tab. 3 Křížení dvou heterozygotů

Tab. 4 Křížení dominantního homozygota a heterozygote

Tab. 5 Křížení dvou dominantních homozygotů

Tab. 6 Křížení dvou recesivních homozygotů

Tab. 7 Křížení dvou recesivních homozygotů

Tab. 8 Křížení heterozygota a recesivního homozygote

Tab. 9 Křížení dominantního homozygota a recesivního homozygote

Tab. 10 Křížení dvou dominantních homozygotů

Tab. 11 Křížení dominantního homozygota a heterozygota

Tab. 12 Křížení dvou heterozygotů

## 8 PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

LINE – long interspersed nuclear element  
LTR – long terminal repeat  
SINE – short interspersed nuclear element  
GWAS – genome-wide association study  
DRB – 5,6–dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole  
DQA – DQ alpha 1  
DLA – dog leukocyte antigen  
BRCA1 – breast cancer 1  
BRCA2 – breast cancer 2  
CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
IBD – identity by descent  
HC – hereditární zákal  
HSF4 – heat shock factor protein 4  
AUO – australský ovčák  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
PRA – progresivní retinální atrofie  
EPRA – early PRA  
PRA-RCD1 - rod-cone dysplasia type 1  
PRA-RCD2 – rod-cone dysplasia type 2  
PRA-ERD – early retinal degeneration  
LPRA – late PRA  
PRCD – progressive rod-cone degeneration  
CFA9 – 9. Chromozom psa  
RDO - rhodopsin  
ERG - elektroretinografie  
XLPRA1 – X-linked progressive retinal atrophy 1  
RPGR – retinis pigmentosa GTPázový regulator  
GTP – guanosine triphosphate  
RP – retinis pigmentosa  
XLPRA2 - X-linked progressive retinal atrophy 2  
FCI – Fédération Cynologique Internationale

USA – United States of America

ČMKU – Česko-moravská kynologická unie

ČR – Česká republika

CEA – Collie Eye Anomaly

UK – United Kingdom

BAC – Bacterial Artificial Chromosome

# **PŘÍLOHY**

## **Seznam příloh**

Obr. 3 Možnosti barev u australského ovčáka

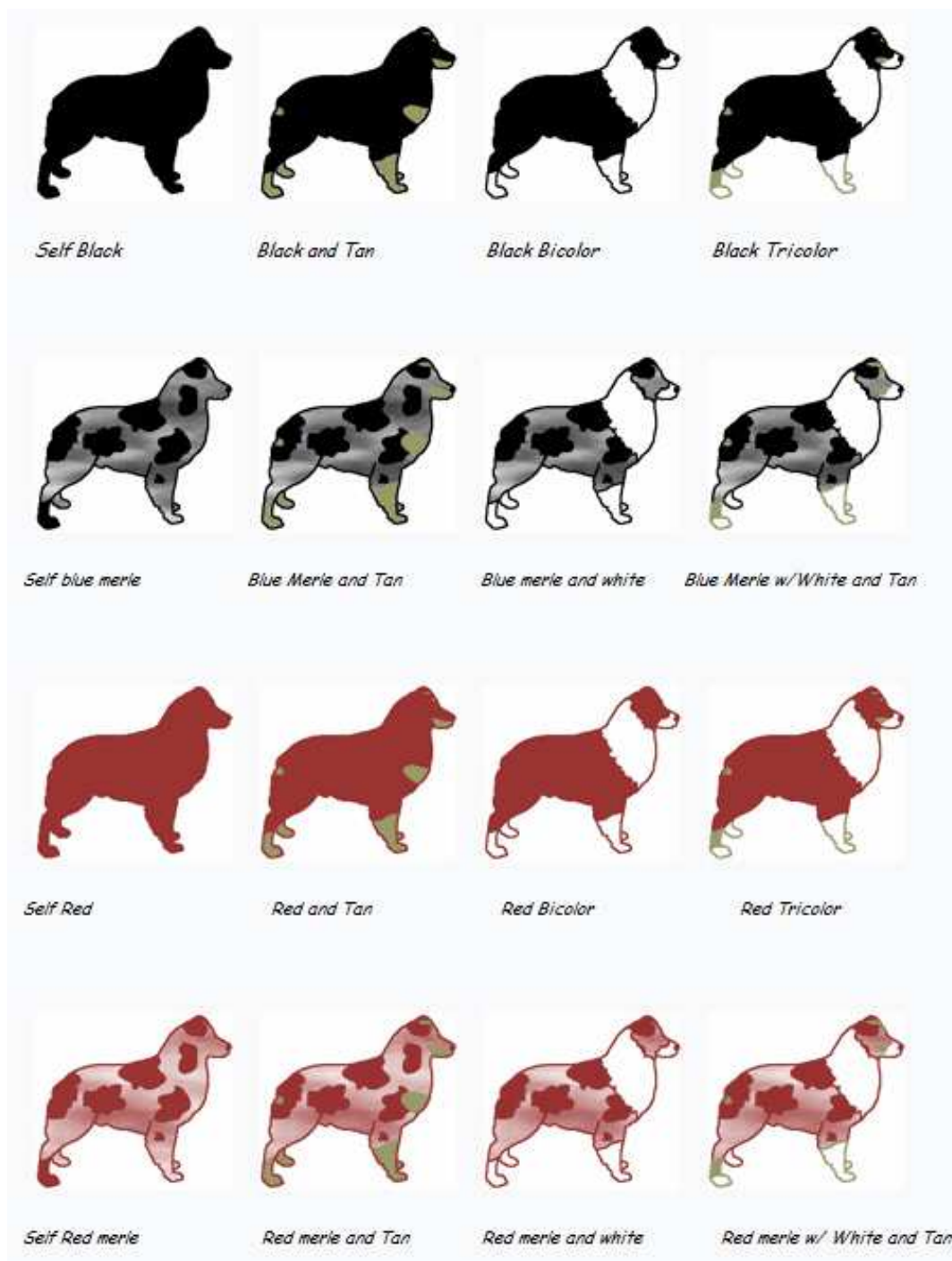
Obr. 4: Red merle AUO

Obr. 5: Blue merle AUO

Obr. 6: AUO černý s bílými znaky

Obr. 7: AUO červený s bílými znaky





Obr. 3: Možnosti barev u australského ovčáka (Gripen.weebly.com, 2012)



Obr. 4: Red merle AUO (Svezivitr.cz)



Obr. 5: Blue merle AUO (Syndynely.wbs.cz)



Obr. 6: AUO černý s bílými znaky (Diandra.wz.cz)



Obr. 7: AUO červený s bílými znaky (Genomia.cz)