

MOLEKULOVO-GENETICKÁ ANALÝZA PLEMENA ČESKÝ FÚZAČ

Rizikom v chovateľstve je výskyt dedičných chorôb a dedičných defektov. Niektoré choroby sa vyskytujú zriedka iné častejšie. Rozšírené u psov sú v poslednej dobe najmä tieto genetické patologické stavy: dysplazia bedrových kĺbov, progresívna retinálna atrofia sietnice, alopécia, u niektorých plemien šeroslepota alebo dedičná hluchota. V databáze OMIA, vytvorenej profesorom Frank Nicholasom z University of Sydney v Austrálii, je zapísaných 547 genetických chorôb vyskytujúcich sa u *Canis familiaris*. V súčasnosti poznáme viac ako 500 dedičných chorôb u psov, ktoré sa vyskytujú aj u človeka, ale len pri približne 50-tich je známa príčina mutácie DNA.

Alopécia

Alopéciou sa označuje nedostatočné zarastanie pokožky srstou po celom tele (*atríchia*), alebo len na niektorých miestach (*hypotrichia localis*). Podľa pôvodu ju delíme na vrodenú (*alopecia congenita*), zdedenú (*alopecia adnata*) a získanú (*alopecia aquisita*). Pri vrodenej alopecii sa predpokladajú genetické vplyvy, neplnohodnotná výživa plodu a matky v období brežosti. Získaná alopécia sa môže vyskytovať po prekonaní niektorých kožných ochorení (mykózy), po niektorých otravách, v priebehu nedostatočnej výživy určitých častí pokožky neurogénneho pôvodu. S celkovou alopéciou sa stretávame zriedka, väčšinou po narodení a je letálna. Častejšia lokálna alopécia je charakterizovaná rôzne veľkými ložiskami bez srsti a bez zápalových zmien na pokožke, ktorá je hladká, lesklá, bez šupín a príznakov svrbenia (*alopecia aerata*) (Konrád, 1989). Rodokmeňová analýza ukázala, že alopécia je kontrovaná recesívnou alelou „lys“ s neúplnou penetráciou, neviazaná na pohlavie. Zložitosť selekcie je daná skutočnosťou, že neúplná penetrácia vloh často spôsobí, že sa vyskytne u recesívneho homozygota až vo vysokom veku na konci reprodukčného obdobia, keď už jedinec zanechal veľa potomkov (Dostál, 1995)

Dedičné formy alopecie

Strata chlpov bledých farieb (Color Dilution Alopecia - CDA)

Je charakteristická vyblednutím farby a stratou chlpov bledých odtieňov. Pri narodení je srst normálna, vypadávať začne okolo 4 – 18 mesiacu veku. Chlpy začínajú vypadávať uprostred zadnej časti chrbta a často postupuje smerom k hlave, k chvostu a nohám. Pri každom plemene je to rozdielne. Strata chlpov môže byť celková alebo čiastočná a všetky ostávajúce chlpy sú zvyčajne riedke, drsné a nadlomené alebo zlomené. Postihnutá pokožka je často šupinatá a môže sa na nej vyskytnúť bakteriálna infekcia (Kim a i., 2005). Zriedenie farby srsti u psov je charakteristické špecifickým pigmentovým fenotypom. Tento zriedený pigmentový fenotyp vedie k tomu, že srst obsahujúca eumelanin má vzhľad strieborno – modrý a srst obsahujúca feomelanin má vzhľad svetlo piesočnatý (Philipp a i., 2005). Vyblednutie farby srsti je dedičné recesívne ochorenie čo znamená že dané ochorenie respektíve fenotyp (vonkajší prejav) sa prejaví len pri jedincoch s dvoma recesívnymi alelami (recesívna alela je podradená dominantnej alele). Dané ochorenie sa neprejaví pri zdravom jedincovi s dvoma dominantnými alelami a ani pre prenášačovi s jednou dominantnou a jednou recesívnou alelou. Zriedený fenotyp sa vyskytuje u rôznych cicavcov a je charakteristický chybnou dopravou melanozómov, čo vedie k tvorbe veľkých zhlukov pigmentu v melanocytoch (Drögemüller a i., 2007). Zriedenie farby bolo pozorované u mnohých plemien: Doberman, Yorkshire teriér, miniatúrny pinč, nemecká doga, wipet, taliansky chrt, saluki, čau – čau, hladkosrstý jazvečík, drôtosrstý jazvečík, boston teriér,

newfoundlandký pes, bernský salašnícky pes, shetlandský ovčiarsky pes, šiperka, čivava, pudel, írsky seter a kríženci (Laffort-Dassot, Beco, Carlotti, 2002). Podobné ochorenie sa vyskytuje aj u človeka – Syndróm Gricelli (čiastočný albinizmus) – je autozomálne recesívne ochorenie, charakteristické hypopigmentáciou pokožky a vlasov (strieborné vlasy). Príčinou sú mutácie v génoch myosin-VA a RAB27A (Scheinfeld, Johnson, 2010).

Folikulárna dysplazia čiernych chlpov (*Black Hair Follicular Dysplasia - BHFD*)

Je fenotypovo podobná CDA, ale stratou srsti sú postihnuté iba oblasti s čiernou farbou srsti (Philipp a i., 2005b). Pri BHFD sú klinické príznaky viditeľné už v prvom týždni po narodení (Welle a i., 2009). BHFD je väčšinou sprevádzaná, okrem straty srsti, zredukovaním počtu zubov a pazúrov (Bohnhorst, Hanssen, Moen, 2001) a niekedy aj hluchotou (Schmutz a i., 1998). Folikulárna dysplazia čiernych chlpov bola pozorovaná pri mladých dvojfarebných alebo trojfarebných psoch nasledujúcich plemien: jazvečík, papilon, saluki, cavalier king charles španiel, bígl, baset, kokeršpaniel, stavač, gordon seter, šiperka a kríženci (Laffort-Dassot, Beco, Carlotti, 2002).

Genóm psa

Uvádza sa, že genóm psa (genetická informácia uložená v podobe nukleovej kyseliny DNA) má 20 439 génov (úsek DNA, ktorý kóduje vznik určitého proteínu, enzýmu alebo stavebnej bielkoviny, je zložený z dvoch alel, pričom jednu dostáva jedinec od matky a druhú od otca). Tieto gény tvoria spolu len 5 % celej DNA. Väčšia časť DNA nič nekóduje. Počet génov však nie je pravdepodobne konečný. Genóm psa je o 18 % menší než genóm človeka a o 6 % menší ako genóm myši. Medzinárodné tímy vedcov objavili a popísali 2,5 miliónov polymorfizmov pri psoch (polymorfizmus – výskyt zmien v zložení DNA medzi jedincami rôznych alebo rovnakých plemien, ktoré môžu ale aj nemusia byť príčinou fenotypových odchýliek). Polymorfizmus DNA (mutácia DNA) je príčinou vzniku viac ako 400 rôznych plemien psov odlišných exteriérov a pováh ale tiež je zodpovedný za vznik dedičných ochorení (Dostál, 2007). Najvýznamnejším typ polymorfizmu DNA predstavuje tzv. SNP polymorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism – polymorfizmus jedného nukleotidu). V podstate ide o zámenu poradie nukleotidov (stavebné jednotky DNA – A, T, C, G) v poradí sekvencie DNA.

Najvýznamnejšie gény spojené s alopeciou srsti pri psoch

Použitím molekulárno-genetických metód boli doteraz preskúmané tri gény a to gén MLPH, gén Rab27A a gén Myo-VA, k ochoreniami CDA a BHFD. Najvýznamnejším génom zodpovedným za výskyt bledého sfarbenia psov bol jednoznačne určený gén MLPH (Welle a i., 2009). Gén MLPH (*melanophilin- melanofilín*) bol zdefinovaný ako dôležitý gén, ktorý je zodpovedný za tzv. zriedenie alebo zblednutie základného odtieňa (príklad - pri plemene doberman je klasická farba čierna ale nájdu sa jedinci s odtieňom do modra čo je spôsobené zblednutím alebo zriedením farby srsti). Základnou funkciou génu MLPH je produkcia špeciálneho prenášača s názvom melanofilín, ktorý prenáša melanín z pokožky do chlpu. Práve samotná koncentrácia melanínu v chlpe je zodpovedná za sfarbenie chlpu. Pri výskyte tzv. zriedenia farby dochádza k uloženiu menšieho množstva melanínu v chlpe. Niektoré štúdie však popísali možný toxický účinok melanínu v oblasti chlpuvého koreňku, čo má za následok jeho vypadávanie, pričom rast nového chlpu je značne spomalený. Často je krehký a láme sa. Príčinou sa môžu v týchto léziách vytvoriť vhodné podmienky pre výskyt rôznych ektoparazitov. Gén pre melanofilín bol najviac spojený s vznikom tzv. CDA (color dilution

alopecia - alopecia vyblednutých chlupov) a BHFD (black hair follicular dysplasia - dysplazia chlupov tmavých farieb). Sekvenačnou analýzou sa podarilo tímu švajčiarskych výskumníkov objaviť 48 mutácií v géne MLPH.

Na základe štúdií švajčiarskeho tímu sme vybrali dve mutácie, ktoré sú asociované s výskytom tzv. vyblednutého fenotypu (*dilute fenotyp*) pričom práve pri týchto fenotypoch dochádza k častému výskytu CDA. Jedná sa o SNP polymorfizmus (*mutácie*) s označením **A157471G** a **A186184G** (*pozícia SNP polymorfizmu v sekvencií génu MLPH*):

SNP polymorfizmus A157471G – vyskytujú sa dve alely (alela **G** a alela **A**), pričom vznikajú tri genotypy: homozygotný genotyp **GG** – normálne sfarbenie, heterozygotný genotyp **GA** – normálne sfarbenie (prenášač), homozygotný genotyp **AA** – vyblednutý genotyp.

Alela **G** je nadradená nad alelou **A**, čo znamená, že fenotypovo sa vyblednutá farba prejaví len pri homozygotnom genotype **AA**. Uvedená mutácia predstavuje kauzálnu mutáciu zodpovednú za vznik dilute fenotypu (*genotyp AA bol zistený pri všetkých testovaných psoch rôznych plemien, ktoré mali tzv. dilute fenotyp*) (Welle et al., 2009).

SNP polymorfizmus A186184G – vyskytujú sa rovnako dve alely (alela **G** a alela **A**), pričom vznikajú tri genotypy: homozygotný genotyp **GG** – normálne sfarbenie, heterozygotný genotyp **GA** – normálne sfarbenie (prenášač), homozygotný genotyp **AA** – vyblednutý genotyp (*dilute*). Táto mutácia bola tiež asociovaná s výskytom tzv. dilute fenotypu pri niektorých plemenách a zároveň bola zistená vo vrhu veľkého münsterlandského stavača (Phillip et al., 2005).



(A) Doberman so zriedeným pigmentovým fenotypom (modrý odtieň srsti) je recesívny homozygot vyblednutej alely *d*

(B) Doberman s normálnym pigmentovým genotypom (čierny s pálením) je dominantný homozygot normálnej alely *D*. Rovnaké sfarbenie má aj heterozygotný genotyp s jednou normálnou alelou *D* a jednou recesívnou alelou *d* (Phillip a i., 2005).

Vyhodnotenie molekulovo-genetickej analýzy plemena český fúzač

Zatiaľ nebol jednoznačne popísaný gén, ktorého mutácia (*polymorfizmus*) je zodpovedná za stratu srsti. Nevýhodou pri psoch je ich vysoká variabilita medzi plemenami. To znamená, že pri rovnakom ochorení s genetickým pozadím je genetická podstata ochorenia – mutácia, pri rozdielnych plemenách väčšinou na rozdielnom úseku DNA (*Príklad:*

Dedičné ochorenie PRA spôsobujúce slepotu je pri írskych setroch lokalizované v géne PDE6B a pri plemene briard je lokalizované v géne RPE65). Nakoľko nemáme veterinárne správy (výskyt ektoparazitov, hormonálna nerovnováha, biochemické testy, výživa) respektíve popis výskytu alopecie od samotných chovateľov pri jednotlivých psoch, ktorí sú najviac postihnutí alopeciou, tak môžeme len zisťovať prítomnosť jednotlivých mutácií génov, ktoré boli preštudované v zahraničných štúdiách. Na podrobné analýzy za účelom zistenia polymorfizmu DNA spojeného so stratou srsti by sme potrebovali mať skupinu chorých jedincov, skupinu zdravých jedincov a porovnať zmeny v DNA, pričom najlepšie by bolo keby sme mali ucelené vrhy aby sme mohli skúmať typ dedičnosti.

Z našich výsledkov je vidieť malý stupeň variability (*výskyt viac ako jednej alely*) pre obe mutácie génu MLPH. Bohužiaľ, keďže nevieme ktorý zo psov je zdravý a ktorý má najrozsiahljší stupeň alopecie, nevieme zistiť spojitosť fenotypu s mutáciou. Predpokladáme, že k nájdeniu mutácie respektíve kombinácie mutácií v jednotlivých génoch zodpovedných za alopeciu spôsobenú genetickým pozadím budeme musieť rozšíriť nielen počet skúmaných mutácií ale získať aj stručný popis osrstenia každého jedinca aby sme mohli zistiť asociáciu fenotypu s genotypom. Uvedené výsledky genotypovania sú len orientačné a žiadnemu z genotypov zatiaľ nepripisujeme zodpovednosť za alopeciu z vyššie uvedených dôvodov.

Použitá literatúra u autorov

Doc. Ing. Radovan Kasarda, PhD.
Ing. Michal Gábor, PhD.
Ing. Veronika Čimborová