Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění

Studie Y chromozomu psovitých šelem

Bakalářská práce

Autor práce: Michaela Slámová

Vedoucí práce: Ing. Jakub Vašek, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Studie Y chromozomu psovitých šelem“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne: 15. 4. 2015

…….

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jakubu Vaškovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce a množství odborných a cenných rad.

Studie Y chromozomu psovitých šelem

Souhrn

Analýzou genomu psa domácího (*Canis lupus familiaris*) lze nabýt velkého množství informací týkajících se nejenom přímo tohoto druhu, ale získané výsledky lze aplikovat i u dalších živočichů včetně člověka. Za účelem zkoumání genomu bylo sestaveno mnoho genetických map a významným mezníkem bylo jeho kompletní osekvenování. Osekvenovaný genom byl využit při sestavování fylogenetického stromu psovitých šelem, poskytuje důležité vodítko při výzkumu domestikace psa, umožňuje studovat dědičná onemocnění společná psům i lidem či lze zjistit genetickou podstatu fenotypových projevů u psů. V této práci se zabývám strukturou a organizací psího genomu se zvláštním zaměřením na Y chromozom.

Nejmenší psí chromozom, chromozom Y, je jedinečný svou strukturou a organizací, které jsou výsledkem mnohaleté evoluce pohlavních chromozomů. S chromozomem X rekombinuje pouze v malém úseku nazývaném pseudoautozomální oblast; jeho zbylou část tvoří tzv. oblast specifická pro samce. Ta sestává jednak ze sekvencí heterochromatických, tvořených různými typy repetic, a dále ze sekvencí euchromatických, které se dělí do tří typů podle způsobu vzniku. Počet genů, které se na chromozomu Y vyskytují, není příliš vysoký a jsou to geny uplatňující se při vývoji varlat a spermatogenezi.

Výzkum chromozomu Y pomocí molekulárně genetických metod a následná aplikace získaných poznatků získává stále větší uplatnění v celé řadě studií. K výzkumu lze využít mimo jiné sekvenování, které je však komplikováno značným množstvím repetitivních sekvencí, PCR, dále AFLP a RFLP metody. S pomocí těchto metod lze vytvořit Y specifické markery hrající nezastupitelnou roli při výzkumu.

Jako Y specifické markery označujeme známé sekvence nacházející se na Y chromozomu. Jelikož představují zcela srovnatelnou alternativu k mtDNA, roste jejich využití v populačních a evolučních studiích psovitých šelem, včetně otázek týkajících se domestikace psa. Nabízí nový úhel pohledu z hlediska paternální linie, které se tak dostává stále více pozornosti.

Klíčová slova: Y chromozom, Canidae, struktura a organizace psího genomu, haplotyp

Genetic study of Y chromosome of Canidae family

Summary

The analysis of the genome of the domestic dog (*Canis lupus familiaris*) provide a large amount of information regarding this species but the results can be applied also to other animals, including humans. There is a number of genetics maps assembled for the purpose of researching the genome and complete genome sequence represents a significant milestone. The whole-genome sequence can be used for construction of the phylogenetic tree of the Canids, it provides important guidance in the domestication research, it enables studying hereditary diseases common to dogs and humans or it there is a possibility for detection the genetic bases of phenotypic manifestation in dogs. In this study, I have dealt with the structure and organization of the canine genome, with a particular focus on the Y chromosome.

The smallest dog chromosome, chromosome Y, is unique to its structure and organization which is the result of years of evolution of the sex chromosomes. There is a small region, called pseudoautosomal, in which is possibility of recombination with the chromosome X; the remaining part consists of the male specific-region. This region comprises heterochromatic sequences, consisting of different types of repetitions, and further euchromatic sequences which are divided into three types according to their origins. The number of genes on the Y chromosome is not large and the genes are applicable in the progress of testes and spermatogenesis.

The research of the Y chromosome using molecular genetic methods and the subsequent application of acquires knowledge is gaining increasingly application in a wide range of studies. There are many methods which can be used for research such as sequencing, PCR, AFLP and RFLP methods. By using these methods, there can be created Y-specific markers playing an irreplaceable role in research.

There are well known sequences on the Y chromosome which are also called Y-specific markers. They represent quite comparable alternative to mtDNA so their use in population and evolutionary studies of canids, including issues relating to the domestication, is rising. Their using offers a new point of view from the paternal line which resulted in attracting attention to it.

Keywords: Y chromosome, Canidae, structure and organization of the dog genome, haplotype

Obsah

1 Úvod ……8

2 Cíl práce ……9

3 Literární rešerše ……10

3.1 Taxonomické zařazení psa, jeho domestikace a obecná charakteristika ……10

3.1.1 Taxonomické zařazení psa ……10

3.1.2 Původ a domestikace psa ……11

3.1.3 Obecná charakteristika psovitých ……13

3.2 Struktura a organizace psího genomu ……13

3.2.1 Historie mapování psího genomu ……14

3.2.2 Organizace psího genomu ……15

3.2.2.1 Chromozomální organizace ……15

3.2.2.2 Subchromozomální struktura ……16

3.2.3 Komparativní analýza s genomy jiných savců ……18

3.3 Struktura a organizace Y chromozomu ……19

3.3.1 Původ a evoluce pohlavních chromozomů ……19

3.3.2 Obecný popis Y chromozomu psa ……21

3.3.2.1 Pseudoautozomální oblast ……22

3.3.2.2 MSY ……23

3.3.2.2.1 Heterochromatické sekvence ……23

3.3.2.2.2 Euchromatické sekvence ……23

3.3.3 Geny na Y chromozomu psa ……24

3.3.3.1 Gen *SRY* ……25

3.3.3.2 Gen *ZFY* ……27

3.3.3.3 Gen *UTY* ……27

3.3.3.4 Gen *KDM5D* ……27

3.4 Molekulárně genetické metody využívané pro studium Y chromozomu ……28

3.4.1 Sekvenování DNA ……28

3.4.1.1 Tradiční sekvenační metody ……28

3.4.1.1.1 Sangerova metoda ……28

3.4.1.1.2 Maxam-Gilbertova metoda ……29

3.4.1.2 Sekvenační metody nové generace ……30

3.4.1.2.1 Pyrosekvenace (metoda 454/Roche) ……30

3.4.1.2.2 Illumina/Solexa ……31
3.4.2 Polymerázová řetězová reakce ……...32
3.4.3 Délkový polymorfismus restrikčních fragmentů ……...32
3.4.4 Délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů ……...33
3.4.5 DNA microarray……33
3.5 Využití Y specifických markerů pro genetické studie ……..34
3.5.1 Původ a domestikace psa ……...34
3.5.2 Forenzní analýzy ……35
3.5.3 Populační studie ……35
4 Závěr ……37
5 Seznam literatury ……38

1 Úvod

Pes s námi od dob domestikace ušel už velký kus cesty a dnes je na celém světě chováno přes 300 různorodých plemen. Právě díky této fenotypové rozmanitosti, a v neposlední řadě i kvůli vysokému výskytu dědičných onemocnění, se pes stal velice vyhledávaným modelem genetických studií a analýz. Genom psa je proto v současné době intenzivně studován a to zejména od doby jeho osekvenování. V této práci je hlavní důraz kladen konkrétně na Y chromozom, který byl a do dnešní doby je, co se týče výzkumu, poněkud opomíjen.

Chromozom Y je oproti svému protějšku, X chromozomu, mnohem menší a nese pouze malý počet genů, které se uplatňují především při vývoji varlat a ve spermatogenezi. Tato rozdílnost je způsobena potlačením rekombinace mezi oběma chromozomy následované samotnou degenerací Y chromozomu, zatímco chromozom X je svou stavbou a počtem genů nadále podobný autozomům.

K samotnému studiu Y chromozomu lze použít širokou škálu molekulárně genetických metod, z nichž je v této práci zmíněno sekvenování, PCR, AFLP a RFLP metody, s jejichž pomocí je možno vytvoření Y specifických markerů.

Y specifické markery, jimž je věnována závěrečná část této práce, představují známé sekvence DNA na Y chromozomu, které lze snadno identifikovat. Dají se uplatnit při výzkumu evoluce, fylogeneze a studia jednotlivých populací psovitých šelem. Poskytují informace o paternální linii, kterou doposud nebylo možné sledovat, protože většina těchto studií využívala především mitochondriální DNA dědící se po matce. Aplikace Y specifických markerů tak v sobě skrývá dosud nevyužitý potenciál.

2 Cíl práce

Cílem této práce je vytvoření literární rešerše aktuálních poznatků o genomu psa, zabývající se především Y chromozomem. Práce je zaměřena na strukturu a organizaci Y chromozomu, molekulárně genetické metody používané při výzkumu Y chromozomu a využití Y specifických markerů k evolučním, populačním a forenzním studiím psovitých šelem.

3 Literární rešerše

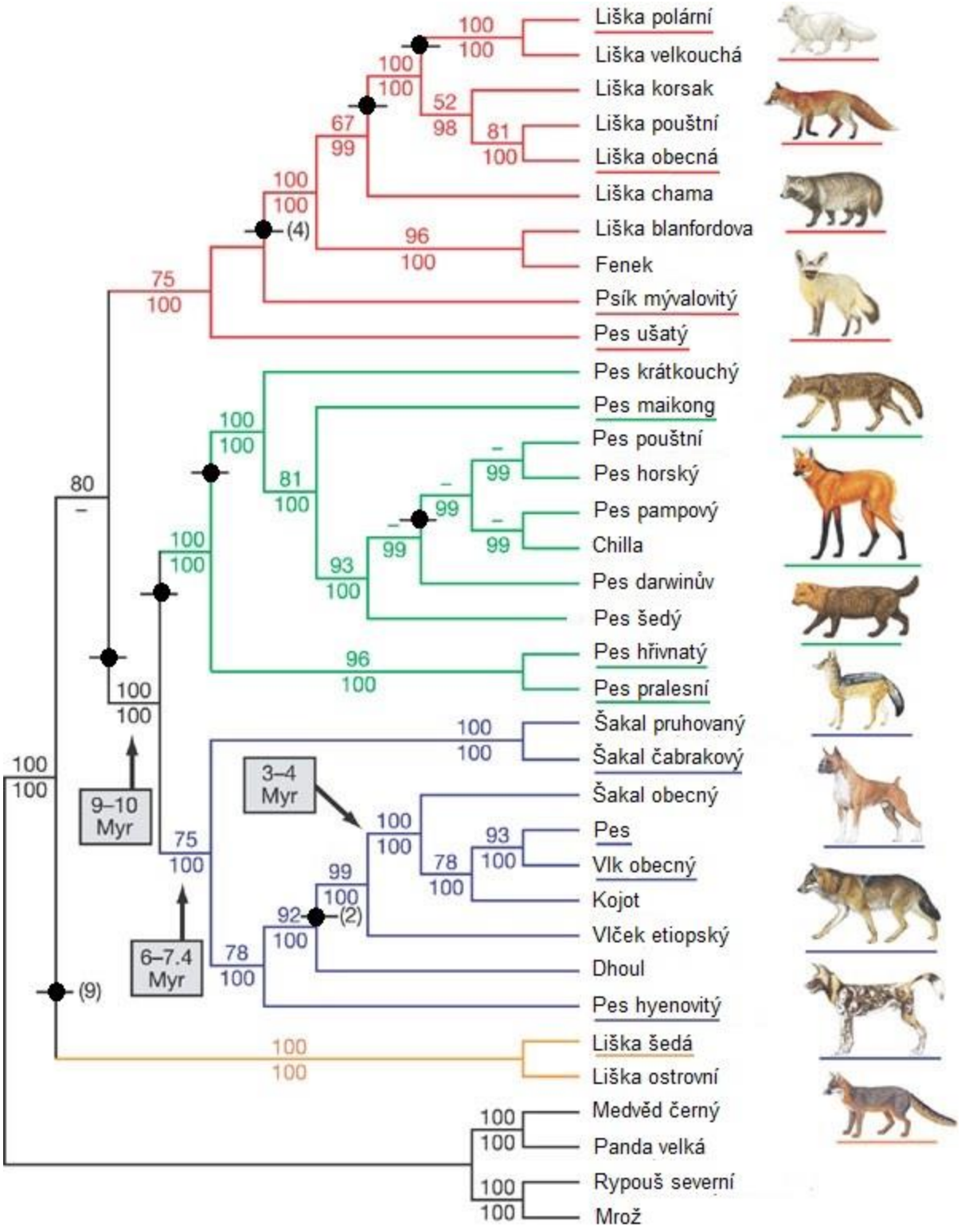
3.1 Taxonomické zařazení psa, jeho domestikace a obecná charakteristika

3.1.1 Taxonomické zařazení psa

Pes domácí (*Canis lupus familiaris*) se řadí do podřádu psotvárných šelem (Caniformia) a čeledi psovitých (Canidae), jejíž vznik lze datovat do doby před přibližně 50 miliony lety (Ostrander a Wayne, 2005). Tato skupina se před 7 - 10 miliony lety rozdělila na 34 současných druhů psovitých, a proto jsou si všechny tyto druhy geneticky velmi podobné (Wayne et al., 1997). Wilson a Reeder (2005) uvádějí, že do rodu *Canis* náleží celkem šest druhů: vlk (*C. lupus*), vlček etiopský (*C. simensis*), kojot (*C. latrans*) a šakal (*C. aureus, C. mesomelus, C. adustus*). Všichni příslušníci tohoto rodu se mezi sebou mohou křížit za vzniku plodných potomků, což potvrzují studie genomů některých volně žijících populací (Gottelli et al., 1994; Roy et al., 1996; Wilson et al., 2000; Adams et al., 2003).

Wayne et al. (1997) ve svém výzkumu zjistili, že v rámci čeledi psovitých jsou tři odlišná fylogenetická uskupení: liškovité formy, vlkovité formy a jihoamerické formy. Kromě toho uvádějí také několik psovitých, kteří nemají žijící blízké příbuzné, např. některé lišky (rod *Urocyon*), pes ušatý (*Otocyon megalotis*) a psík mývalovitý (*Nyctereutes procyonoides*). Při sekvenování psího genomu byl vytvořen fylogenetický strom psovitých, ve kterém je však pes ušatý a psík mývalovitý zařazen mezi liškovité formy (Lindblad-Toh et al., 2005). Výzkumy také ukazují, že vlkovité formy si jsou fylogeneticky daleko bližší s jihoamerickými než s liškovitými formami, z čehož vyplývá, že lišky se od psů oddělily pravděpodobně již na počátku moderního větvení fylogenetického stromu (Lindblad-Toh et al., 2005; Ostrander a Wayne, 2005).

Obr. 1: Fylogeneze psovitých (Canidae) dle Lindblad-Toh et al. (2005). Fylogenetický strom byl vytvořen na základě sekvenace 15 kb exonů a intronů. Jednotlivé barevné větve ukazují rozdělení psovitých na čtyři základní linie (clades): liškovité formy (červeně), jihoamerické formy (zeleně), vlkovité formy (modře) a ostrovní lišky zastoupeny dvěma příslušníky rodu *Urocyon* (oranžově). Horní indexy vyjadřují bootstrapové hodnoty a dolní indexy bayesovské hodnoty posteriorní pravděpodobnosti; pomlčky označují bootstrapové hodnoty menší než 50 % a bayesovské hodnoty posteriorní pravděpodobnosti menší než 95 %. Černé body naznačují přítomnost tzv. indels (souhrnné označení pro inzerce či delece), číslo v závorce značí jejich počet, je-li větší než jedna. Ilustrace se vztahují k podtrhaným názvům druhů.



3.1.2 Původ a domestikace psa

Dnes je jasné, že vlk (*Canis lupus*) je jediným předkem psa domácího (Wayne, 1993). Dříve se ovšem vědci, mezi nimi i Charles Darwin či Konrad Lorenz, domnívali, že mezi předky psa mohl patřit např. šakal obecný (*Canis aureus*), kojot (*Canis latrans*) nebo dokonce dingo

(*Canis lupus dingo*). Byla vyřčena i domněnka, že různá plemena mohou mít různé předky (Morey, 2010).

Otázky ohledně toho, kde a kdy přesně byl pes domestikován, nejsou stále uspokojivě zodpovězeny. Před aplikováním genetických metod se podle archeologických nálezů předpokládalo, že domestikace psa probíhala přibližně před 12 – 14 000 lety. Z této doby pochází kostra, objevená v německé lokalitě Bonn-Oberkassel, která nese prokazatelné znaky psa (Nobis, 1979). Kosterní pozůstatky psů, jejichž stáří bylo odhadnuto na 11 500 - 12 000 let, byly nalezeny v Izraeli (Davis a Valla, 1978). Další fosilie byly nalezeny znovu v Izraeli (Tchernov, 1997), v Rusku (Sablin a Khlopachev, 2002) a ve Španělsku (Vigne, 2005). Byla nalezena ještě řada starších koster psovitých šelem, jelikož však nemají všechny typické znaky psa, není jisté, zda se jedná již skutečně o psa, či jen ochočeného vlka (Benecke, 1987). Boyko (2011) rovněž udává, že nejsou žádné známé kosterní nálezy či malby psa, jejichž stáří by bylo větší než 16 000 let.

V určitém rozporu s archeologickými nálezy je však naprostá většina genetických studií. Podle prvních analýz kontrolních sekvencí mtDNA (mitochondriální DNA) se předpokládalo, že k domestikaci došlo před více než 100 000 lety (Vilà et al., 1997). Savolainen et al. (2002) ve své studii mtDNA tento odhad upřesnili na cca 15 000 let. Uvedli také, že největší genová rozmanitost se nachází u psů ve východní Asii, z čehož se domnívají, že domestikace psa začala právě v této lokalitě. Podobná genová diverzita však byla podle analýz polymorfismů mtDNA prokázána i v Africe; hypotéza o domestikaci psa ve východní Asii je tak zpochybněna (Boyko et al., 2009).

Další teorie situuje domestikační centrum psa do jihovýchodní Asie, konkrétně do lokality nacházející se jižně od řeky Yangtze (ASY - Asia south of Yangtze River) (Pang et al., 2009). Výsledky analýz mitochondriálních genomů psů po celém světě ukazují, že psi všeobecně sdílejí společný homogenní genofond, který obsahuje deset rozdílných haplotypů. Přítomnost všech těchto haplotypů byla prokázána právě v regionu ASY; dále se jejich četnost snižuje přes sedm haplotypů ve střední a pět v jižní Číně a jihozápadní Asii až po pouze čtyři haplotypy v Evropě. Tyto výsledky tedy naznačují, že pes vznikl v regionu ASY před přibližně 5 400 – 16 300 lety (Pang et al., 2009). Teorii, že pes byl domestikován právě v jihovýchodní Asii, také podporují analýzy chromozomu Y (Ding et al., 2012; Sacks et al., 2013).

Opět jiné výsledky však přinesla studie jednonukleotidových polymorfismů („single nucleotide polymorphism“, SNP), která určila největší genetickou diverzitu v jihozápadní Asii, čímž se shoduje s archeologickými nálezy z této lokality (vonHoldt et al., 2010). Evropské archeologické nálezy ale nyní podporuje nejnovější srovnávací studie mitochondriálních

genomů prehistorických psovitých a současně žijících psů, vlků a kojotů (Thalmann et al., 2013). Byla vyřčena i hypotéza o nezávislé domestikaci psa v Novém světě, genetické studie původních amerických plemen ji však vyvrátily (Leonard et al., 2002).

Nesrovnalosti mezi archeologickými nálezy a genetickými studiemi by mohla vysvětlit studie zabývající se analýzou mtDNA neolitických psů v Evropě (Deguilloux et al., 2008). U fosilních nálezů byly totiž nalezeny haplotypy, z nichž jeden se u dnešních evropských psů nevyskytuje vůbec a druhý pouze u 5 % populace, z čehož lze usuzovat, že další domestikační centrum mohlo být i v Evropě a původní populace psů byla nahrazena psy pocházejícími z Asie. Tato studie tedy podporuje dnešní nejrozšířenější názor o teorii tzv. nezávislé domestikace, totiž že k domestikaci psa došlo v různých regionech v různých časových údobích (Deguilloux et al., 2008).

3.1.3 Obecná charakteristika psovitých

Jedním z typických morfologických znaků čeledi psovitých je uspořádání chrupu – většinou obsahuje 42 zubů, velké špičáky a mohutně vyvinutý trhákový komplex (poslední premolár v horní čelisti a první molár v dolní). Pes je prstochodec s pětiprstými předními a čtyřprstými zadními končetinami s nezatažitelnými tupými drápy. Charakteristická je také oblá či kulatá zornice. Oproti stejně velkému vlku má pes až o 30 % menší hmotnost mozku, což je jedním z důsledků domestikace. Díky mohutně vyvinutým čelním lalokům má pes mimořádně citlivý čich, který využívá především při lovu ve smečkách, které mají přísnou hierarchii. Jedinou výjimku v tomto ohledu představují lišky, které, až na období páření, většinou žijí samostatně (MacDonald a Sillero-Zubiri, 2004; Císařovský, 2008).

3.2 Struktura a organizace psího genomu

Pes je se svými více než 300 plemeny (FCI, 2015) velice atraktivním modelem pro genetické studie a analýzy. Právě kvůli své velké fenotypové variabilitě, vysokému výskytu dědičných onemocnění s podobnými projevy příznaků jako u lidí, často vysoké úrovni veterinární péče a životu v prostředí stejném jako lidé je vhodný k doplnění genetických analýz u lidí a myší (Neff et al., 1999; Lindblad-Toh et al., 2005). K tomu je však zapotřebí znát, jak je celý genom organizovaný a strukturovaný, k čemuž se využívají kvalitní genetické mapy, ať už vazbové, radiační hybridní (RH) či fyzické a v neposlední řadě také přečtení celého psího genomu (Lindblad-Toh et al., 2005).

3.2.1 Historie mapování psího genomu

Mezi první studie psího genomu patří vazbová mapa obsahující 150 mikrosatelitních markerů aplikovaných na 163 jedinců tvořících 17 třígeneračních rodokmenů (Mellersh et al., 1997). Tato mapa byla výchozím zdrojem pro další mapování a sloužila jako základ pro vytváření kompletní genetické mapy psího genomu. Jako další byla vypracována RH mapa obsahující 400 markerů zahrnujících 218 genů a 182 mikrosatelitů (Priat et al., 1998). Tvůrci mapy předpokládali, že tato mapa by mohla být klíčem k lokalizaci a identifikaci genů, které mají za následek fenotypové vlastnosti a dědičné choroby.

O rok později Vignaux et al. (1999) sestavili radiační hybridní panel celého psího genomu, s jehož pomocí můžeme určit umístění jednotlivých genů v genomu prostřednictvím RH mapy. Další vazbová mapa zvýšila počet zmapovaných markerů ze 150 na 276 (Neff et al. 1999). Patnáct z nich zastupovalo geny se známou funkcí, majících význam ve srovnávacím mapování u psů.

Vazbová mapa z roku 1997 (Mellersh et al., 1997) a RH mapa vypracovaná o rok později (Priat et al., 1998) se staly nepostradatelnými výchozími body pro sjednocenou vazbovo-radiační mapu, kterou se podařilo sestavit z RH mapy, sestávající z 600 markerů, a vazbové mapy s 341 markery (Mellersh et al., 2000). Výsledná mapa se svými 724 markery ve své době poskytovala nejkomplexnější pokrytí většiny psího genomu.

Dále byly vypracovány podrobné fyzické a RH mapy částí jednotlivých psích chromozomů, konkrétně chromozomu 12 (Li et al., 2001) a chromozomu X (Everts et al., 2002), které mohou významně pomoci při studiu lidských nemocí majících původ v mutacích právě v těchto zmapovaných úsecích chromozomů. Další integrovanou vazbovo-radiační mapu, vypracovanou s pomocí 1 800 markerů a pokrývající přes 90 % psího genomu, sestavili Breen et al. (2001). Tato mapa, společně s dalšími později sestavenými RH mapami (Guyon et al., 2003b; Breen et al., 2004; Hitte et al., 2005), umožňuje vědcům získat velké množství informací při srovnávacích analýzách genomů jednotlivých organismů, mezi něž patří např. člověk či myš (Guyon et al., 2003a; Frith a Noé, 2014).

Velkým mezníkem historie mapování psího genomu je osekvenování celého genomu. Jako první se o to pokusili Kirkness et al. (2003). Hloubka pokrytí sekvenování byla však pouze 1,5x. Srovnáním „přečtených" sekvencí genomu pudla s genomem člověka bylo identifikováno 18 473 předpokládaných orthologů k lidským genům a 29 673 transkriptů (Kirkness et al., 2003). V témže roce započalo na Broad Institute of Harvard and MIT ve Spojených státech amerických druhé sekvenování genomu (Lindblad-Toh et al., 2005). Zde už byla hloubka pokrytí sekvenování vyšší – 7,5x. K sekvenování byla vybrána fena boxera jménem Tasha.

Boxer byl vybrán jako vysoce prošlechtěné plemeno, u nějž byl předpoklad vysoké genetické homogenity, a genom Tashy se navíc jevil jako takřka univerzální i pro ostatní plemena psů (Lindblad-Toh et al., 2005). Během výzkumu vědci určili pořadí 2,411 miliardy párů bází, představujících 99 % genomu psa. S již sestavenými mapami vykazovalo vynikající shodu 97 % sekvencí (Breen et al., 2001; Breen et al., 2004; Hitte et al., 2005). Zbývající 3 % reprezentují z velké části vysoce repetitivní sekvence. Při čtení psího genomu byla také sestavena mapa SNPs pomocí porovnání právě přečteného genomu Tashy, dříve zkoumaného genomu pudla (Kirkness et al., 2003) a částí genomů dalších devíti plemen psů, čtyř vlků a jednoho kojota. Mapa obsahuje více než 2,5 milionu SNPs, takže průměrně se v genomu vyskytuje jeden SNP na tisíc bází. Tato mapa umožní další studie zabývající se identifikací genů zodpovědných za nemoci, což bude hrát důležitou roli ve zdraví lidí i zvířat. Na základě osekvenování psího genomu byl také sestaven fylogenetický strom čeledi Canidae (Obr. 1) (Lindblad-Toh et al., 2005).

S využitím poznatků z přečteného psího genomu byla nejnověji vytvořena vazbová mapa obsahující 3 000 mikrosatelitních markerů, od které si vědci slibují, že bude využita při dalších studiích genetických nemocí jak psa, tak i člověka (Wong et al., 2010).

3.2.2 Organizace psího genomu

3.2.2.1 Chromozomální organizace

Karyotyp psa sestává z 38 párů akrocentrických autozomů, velkého sub-metacentrického X chromozomu a malého metacentrického Y chromozomu (Breen, 2008). Mezi největší chromozomy patří chromozom 1 a chromozom X, jejichž délka je přibližně 125 Mb, respektive 126 Mb, zatímco nejmenší je chromozom Y sestávající pouze z 27 Mb (Obr. 2) (Langford et al., 1996; Breen et al., 1999). Podobné velikosti ostatních chromozomů bez použití barvicích metod neumožňují spolehlivé rozpoznání homologních párů (Breen, 2008). Různé metody barvení a pruhování (GTG, R, DAPI) psího karyotypu byly zveřejněny v průběhu posledních čtyřiceti let (Selden et al., 1975; Fujinaga et al., 1989; Langford et al., 1996; Yang et al., 1999) a kvůli zajištění standardizace popisu karyotypu byl na počátku 90. let minulého století založen Výbor pro standardizaci karyotypu psa domácího („Committee for the Standardization of the Karyotype of the Domestic Dog") pod záštitou DogMap Workshopu (Breen, 2001). Pomocí cytogenetických metod se jim podařila standardizace identifikace chromozomů 1 – 21. Po společném úsilí mnoha vědců (Switoński et al., 1996; Breen et al.,

1998, 1999) byla v roce 2000 mezinárodně schválena standardizace popisu zbývajících chromozomů.

Obr. 2: Porovnání velikostí chromozomů dle Langford et al. (1996) a Lindblad-Toh et al. (2005). Převzato z Breen (2008).

Chromozom	Přibližná velikost v Mb odvozená z průtokové cytometrie	Přibližná velikost v Mb odvozená ze sekvenace genomu
CFA01	135	125
CFA02	100	88
CFA03	104	94
CFA04	102	91
CFA05	99	91
CFA06	88	80
CFA07	95	83
CFA08	87	77
CFA09	79	64
CFA10	81	72
CFA11	87	77
CFA12	86	75
CFA13	76	66
CFA14	73	63
CFA15	76	67
CFA16	74	62
CFA17	81	67
CFA18	67	58
CFA19	67	56
CFA20	68	61
CFA21	63	54
CFA22	72	64
CFA23	63	55
CFA24	55	50
CFA25	60	54
CFA26	48	42
CFA27	57	48
CFA28	55	44
CFA29	51	44
CFA30	47	43
CFA31	50	42
CFA32	51	41
CFA33	41	34
CFA34	50	45
CFA35	38	29
CFA36	41	33
CFA37	40	33
CFA38	38	26
CFA X	137	126
CFA Y	27	--
TOTAL	2782*	2424

*Velikost samičího haploidního genomu.

3.2.2.2 Subchromozomální struktura

Velikost haploidního genomu psa domácího byla zjištěna při jeho sekvenaci a činí 2,411 miliardy párů bází (Lindblad-Toh et al., 2005), přičemž repetitivní úseky tvoří 34 % genomu (Lindblad-Toh et al., 2005), z nichž jsou 4 % rodově specifická (Galibert a André, 2008). V psím genomu byly objeveny čtyři základní typy repetitivních sekvencí: SINEs, LINEs, ELA-SINEs a satelitní DNA (Bentolila et al., 1999).

SINEs („short interspersed nuclear elements“ – krátké rozptýlené jaderné elementy) jsou jednou ze skupin retrotranspozonů, které se řadí mezi rozptýlené repetice. Bývají velké 80-

500 bp a jsou transkribovány RNA polymerázou III (Gelaleti et al., 2014). U psa se nacházejí tzv. tRNA-SINEs, které jsou patrně odvozeny z tRNA (transferová RNA) genů (Minnick et al., 1992), na rozdíl od člověka, kde jsou SINEs odvozeny od jiného genu, konkrétně *7SL RNA* (Brookfield, 1994).

LINEs („long interspersed nuclear elements" – dlouhé rozptýlené jaderné elementy) patří stejně jako SINEs mezi retrotranspozony. Na rozdíl od SINEs jsou LINEs autonomní, tzn., že si samy kódují proteiny potřebné k transpozici. Většinou jsou přes 5 kB velké a jsou transkribovány RNA polymerázou II (Bentolila et al., 1999).

ELA-SINEs („essentially LINE-associated SINEs") jsou nově objeveným typem SINEs v psím genomu. Nejsou odvozeny od genu *7SL RNA* ani od tRNA genů, ale vykazují určité podobnosti s „pravými" SINEs. Svůj název dostaly vzhledem k tomu, že většina (12 ze 17) je přidružena k LINEs (Bentolila et al., 1999).

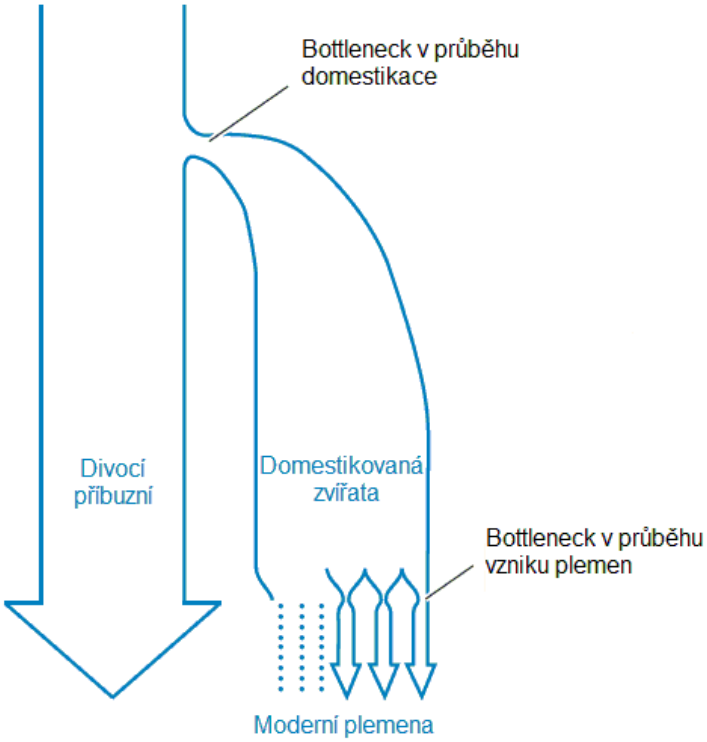
Jako poslední repetitivní sekvence se v psím genomu vyskytuje satelitní DNA, patřící na rozdíl od všech předchozích mezi tandemové repetice, které jsou tvořeny za sebou jdoucími (téměř) identickými sekvencemi. Podle velikosti je můžeme dělit na satelity, které jsou složeny z poměrně dlouhých jednotek, minisatelity, mající rozsah v počtu kilobází, a nejmenší mikrosatelity, tvořené obvykle opakováním 1-5 bází (Richard et al., 2008; Lim et al., 2013).

Sekvenace mitochondriálního genomu psa určila pořadí 16 728 bp, nicméně tato délka není absolutní, jelikož sekvenování znesnadňovalo velké množství repetitivní sekvence 5'-GTACACGT(A/G)C-3'. Vedle regulační oblasti 13 ORFs bylo zaznamenáno 22 genů pro tRNA a 2 geny pro RNA (Kim et al., 1998).

Lindblad-Toh et al. (2005) po přečtení psího genomu odhadovali počet genů na 19 300, přičemž v současné době je známo 19 856 genů, 3 774 tzv. small non coding genes, které jsou obvykle menší než 200 bp a které mohou být transkribovány, ale nikoli translatovány, dále 950 pseudogenů a 29 884 možných genových transkriptů (Cunningham et al., 2015).

Parker et al. (2004) ve své studii zjistili hodnotu průměrné nukleotidové heterozygotnosti, která odpovídá hodnotě 8×10^{-4} a v podstatě je stejná jako v lidské populaci. Během historie byla genetická diverzita psů dvakrát snížena tzv. efektem hrdla láhve („bottleneck effect") (Obr. 3), způsobeným poprvé samotnou domestikací a podruhé počátkem šlechtění moderních plemen (Lindblad-Toh et al., 2005). Právě vznik současných plemen v posledních dvou staletích podle Ostrandera a Wayna (2005) představuje možná jeden z největších genetických experimentů.

Obr. 3: Efekty hrdla láhve v průběhu historie psa. Oba ovlivnily strukturu haplotypů a vazbovou nerovnováhu v psí populaci. Upraveno dle Wang et al., 2013.



3.2.3 Komparativní analýza s genomy jiných savců

Studium psího genomu je důležité i pro srovnávací analýzy s genomy jiných živočichů. Ty jsou nyní možné v souvislosti s přečtením psího genomu, a tedy přesným zařazením psa ve fylogenetickém stromu savců (Lindblad-Toh et al., 2005). Do této doby jsou podrobně prozkoumány genomy téměř třiceti druhů savců včetně člověka (Lander et al., 2001; Sachidanandam et al., 2001; Venter et al., 2001), šimpanze (Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium, 2005), myši (Waterston et al., 2002), krysy (Gibbs et al., 2004) a koně (Wade et al., 2009).

V současnosti je známo 20 389 lidských genů, 22 592 myších a 19 856 psích (Cunningham et al., 2015). Lindblad-Toh et al. (2005) odhadovali počet genů na 19 300, z nichž většina je homologní ke známým lidským genům. Pes je proto vhodným modelem pro výzkum velkého počtu lidských dědičných nemocí, zejména rakoviny, srdečních a neurogenerativních onemocnění (Marschall a Distl, 2010). Existuje tedy velké množství komparativních map člověk – pes, které jsou stále zpřesňovány.

Deschênes et al. (1994) využili jako první získané poznatky z mapování a objevili mutaci genu způsobující kombinovanou imunodeficienci psů. Při porovnání chromozomů X

obou druhů navíc odhalili vysokou evoluční konzervovanost proximálních částí jejich q ramen. Everts et al. (2002) dále uvádějí, že chromozomy X člověka a psa jsou si, s výjimkou primátů, vzájemně nejpodobnější ze všech savců.

Poměrně časté je mapování různých psích chromozomů, případně jejich částí, kde se předpokládá výskyt např. kandidátních genů pro různé dědičné nemoci. Mezi ně patří chromozomy 5 (Thomas et al, 2001; Comstock et al, 2004), 9 (Sidjanin et al., 2002), 12 (Li et al., 2001) a X (Everts et al., 2002).

Komparativní mapy genomu psa se kromě člověka konstruují samozřejmě i s jinými živočichy. Pro příklad je možno uvést komparativní mapu s kočkou domácí (Pontius et al., 2007), prasetem (Biltueva et al., 2004), liškou (Graphodatsky et al., 2000) a psíkem mývalovitým (Nie et al., 2003).

3.3 Struktura a organizace Y chromozomu

Zatímco chromozom X je u všech placentálních savců (Placentalia, Eutheria) víceméně identický, u chromozomu Y můžeme mezi jednotlivými druhy pozorovat značné morfologické a genetické rozdíly. Oproti chromozomu X bývá menší a nese pouze nízký počet genů, což je způsobeno jeho degenerací v průběhu vzniku pohlavních chromozomů.

3.3.1 Původ a evoluce pohlavních chromozomů

Chromozomální determinaci pohlaví můžeme pozorovat u širokého spektra zvířecích taxonů. Tento rozšířený, ale ne všudypřítomný, způsob určování pohlaví napovídá, že pohlavní chromozomy vznikly několikrát nezávisle na sobě (Rice, 1996; Marín a Baker, 1998; Charlesworth, 2004; Liu et al., 2004; Livernois et al., 2012). O mechanismu vzniku se vedly debaty po celá desetiletí poté, co H. J. Muller (1914) vyslovil teorii, že vznikly z páru autozomů. V současné době nejpoužívanější model popisují ve své studii Fridolfsson et al. (1998). Uvádějí, že pohlavní chromozomy plazů, ptáků a savců vzhledem k nedostatku homologie pocházejí z různých autozomů jednoho společného předka. U savců a ptáků byla tato teorie potvrzena genetickým mapováním pohlavních chromozomů (Nanda et al., 1999).

Savčí pohlavní chromozomy vznikly z obyčejného páru autozomů před zhruba 300 miliony lety (Graves a Shetty, 2001). Předpokládá se, že tento proces započal ve chvíli, kdy jeden z homologů získal určitý faktor determinující pohlaví. U savců je tímto faktorem gen *SRY*, který determinuje samčí pohlaví (Graves a Shetty, 2001; Garzón et al., 2012). Rice (1987) popisuje, že v blízkosti takovéhoto pohlavního lokusu se hromadí alely výhodné či přímo potřebné pro samčí pohlaví (např. geny pro spermatogenezi). Na druhém pohlavním

chromozomu se podobně mohou akumulovat alely výhodné pro samičí pohlaví. Rekombinace pomocí crossing-overu probíhající po celé délce chromozomů by však tyto geny výhodné pro jedno pohlaví mohla přesunout na druhý chromozom. U značné části nepárového pohlavního chromozomu (alozomu) Y proto byla potlačena rekombinace (Graves, 2006). Jednou z možností potlačení rekombinace je postupná regulace crossing-overů (Charlesworth et al., 2005) nebo výskyt mutací, jako jsou inverze a delece (Graves, 2006). Potlačení rekombinace mezi oběma chromozomy vyústilo v diferenciaci a následnou degeneraci, a tak je chromozom Y dnes jen malým a na geny chudým zbytkem proto-Y chromozomu, zatímco chromozom X je, co se velikosti a celkového vzhledu týče, stále podobný autozomům (Obr. 4) (Vicoso a Charlesworth, 2006).

Degenerace chromozomu Y byla vyvolána právě potlačením rekombinací, protože zmutované geny nemohou být opraveny svým homologním protějškem. Prvním krokem samotné degenerace je pravděpodobně hromadění transpozibilních elementů (zejména retrotranspozonů), což vede k přeměně euchromatinu na heterochromatin (Steinemann a Steinemann, 1998; 2005). Pro další postup degenerace existuje několik teorií: Mullerova rohatka, selekce na pozadí, genetické svezení se a ruby in the rubbish (Charlesworth a Charlesworth, 2000; Bachtrog, 2008).

Hromadění negativních mutací v místě snížené rekombinace se nazývá Mullerovou rohatkou („Muller's ratchet“) (Felsenstein, 1974). V nepřítomnosti rekombinace je mnohem větší pravděpodobnost vzniku negativních mutací než zpětné mutace, která by mohla opravit původní funkci poškozeného genu. Vznikají tak alely s různým počtem škodlivých mutací. Genetickým posunem (driftem) může v konečně velkých populacích alela s nejnižším počtem škodlivých mutací opakovaně zcela vymizet, což vede k hromadění mutovaných alel v populaci (Charlesworth a Charlesworth, 2000; Gordo a Charlesworth, 2000).

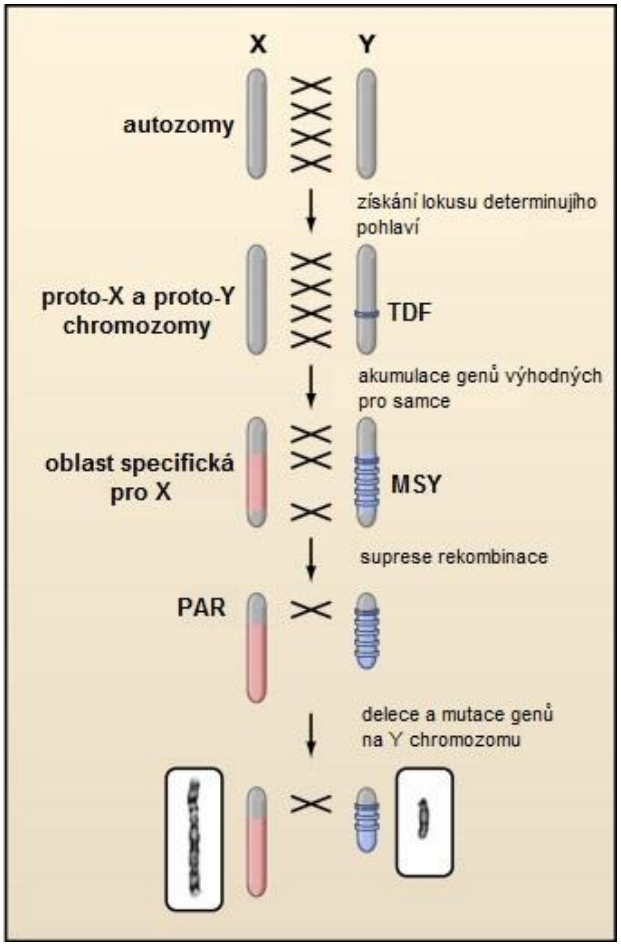
Degenerace chromozomu Y pomocí selekce na pozadí („background selection“) je úzce spjatá s Mullerovou rohatkou. Neutrální či slabě škodlivé mutace mají šanci se v populaci udržet a postupem času se fixovat, pokud se nenacházejí ve vazbě s mutacemi silně škodlivými, které jsou z populace odstraňovány. Výsledkem je hromadění slabě škodlivých mutací majících nižší součet negativních účinků na fitness jedinců náhodným genetickým driftem v důsledku snížené velikosti populace (Charlesworth a Charlesworth, 2000; Bachtrog, 2008).

Proces genetického svezení se („genetic hitchhiking“) popisuje zvýšení frekvence škodlivé alely pomocí její vazby na alelu silně výhodnou (Charlesworth a Charlesworth, 2000). To je ovšem podmíněno skutečností, že účinek silně prospěšné alely musí převažovat nad účinkem alely s mutací škodlivou. Pokud tomu tak není, dochází k procesu zvanému ruby in

the rubbish, spočívajícím v odstranění jak škodlivých, tak i prospěšných alel, které jsou se škodlivými ve vazbě (Bachtrog, 2013).

Navzdory celému degeneračnímu procesu se však pohlavní chromozomy během evoluce mohly dokonce i zvětšit přidáním některých autozomálních regionů nebo repeticemi určitých sekvencí (Graves, 2000).

Obr. 4: Vznik pohlavních chromozomů dle Graves (2006). Pohlavní chromozomy vznikly z páru autozomů rekombinujících po celé své délce (naznačeno symboly x) poté, co jeden z nich získal lokus určující pohlaví („testis determining factor“, TDF). Následné hromadění alel specifických pro samčí pohlaví vede k postupnému potlačení (supresi) rekombinace v této oblasti, a vzniká tak oblast specifická pro X a oblast specifická pro samce na chromozomu Y („male specific-region on the Y“, MSY). Suprese rekombinace následně vede k degeneraci alozomu a ten ztrácí většinu genů s výjimkou genů výhodných pro samce.



3.3.2 Obecný popis Y chromozomu psa

Y chromozom se svou velikostí 27 Mb představuje nejmenší psí chromozom (Langford et al., 1996; Breen et al., 1999). Navzdory jeho velikosti probíhala sekvenace tohoto

chromozomu pouze po malých částech. I přes rapidní rychlost sekvenování genomů je v současnosti počet osekvenovaných chromozomů Y velmi malý (Skaletsky et al., 2003; Hughes et al., 2005; 2010; 2012; Kuroki et al., 2006; Koerich et al., 2008; Carvalho et al., 2009). To může být způsobeno především předpokládaným nízkým počtem genů a velkým množstvím repetitivní DNA uspořádané do dlouhých úseků s téměř totožnými sekvencemi, které se standardními metodami sekvenují obtížně (Li et al., 2013).

Téměř polovina metacentrického Y chromozomu se skládá z nukleolárního organizátoru jadérka („nucleolar organizer region", NOR), který pokrývá krátké rameno chromozomu (p rameno, Yp). Většinu dlouhého ramene chromozomu (q rameno, Yq) tvoří 6,6 Mb velká pseudoautozomální oblast a na zbylé části Yq se nachází přibližně 2,5 Mb velká MSY (Li et al., 2013).

3.3.2.1 Pseudoautozomální oblast

Pseudoautozomální oblasti („pseudoautosomal regions", PARs) jsou specifické segmenty nacházející se na obou pohlavních chromozomech, charakteristické svými homologními sekvencemi (Das et al., 2009). Nacházejí se na koncích chromozomů a můžeme je vymezit tzv. pseudoautozomální hranicí („pseudoautosomal boundary", PAB) – od této hranice již nepokračuje homologní sekvence typická pro pseudoautozomální oblast a objevují se zde sekvence již typické pro jednotlivé pohlavní chromozomy (Galtier, 2004). Při meióze pseudoautozomální oblasti zastávají důležitou úlohu v párování morfologicky jinak zcela odlišných chromozomů X a Y (Raudsepp a Chowdhary, 2008). Lokusy nacházející se v PAR tedy vykazují podobné vlastnosti jako lokusy autozomální: jsou diploidní, dochází zde k rekombinaci a geny uložené v PAR chromozomu X nejsou inaktivovány lyonizací. Právě tyto autozomům podobné vlastnosti vedly k pojmenování této oblasti „pseudoautozomální" (Burgoyne, 1982).

Tato oblast byla zatím prozkoumána jen u několika málo druhů (Graves et al., 1998; Raudsepp a Chowdhary, 2008; Das et al., 2009; 2013; Raudsepp et al., 2012), a tak je podrobných informací stále nedostatek. Raudsepp et al. (2012) uvádějí, že ve většině osekvenovaných genomů tento region chybí buď úplně, nebo je vymezen jen z části. To je způsobeno hlavně tím, že při sekvenování zvířecích genomů bývá použita především DNA jedinců samičího pohlaví. Jsou tedy dostupná data z chromozomu X, ale je zde zároveň nedostatek informací z Y chromozomu, což výrazně omezuje možnosti správného vymezení této oblasti. I přesto je již však známo, že pseudoautozomální oblasti se napříč jednotlivými druhy liší jak ve velikosti, tak v obsahu genů (Das et al., 2009).

Psí PAR je přibližně 6,6 Mb velká, je tedy více než dvakrát větší než lidská PAR1, a obsahuje přinejmenším 34 genů (Young et al., 2008).

3.3.2.2 MSY

MSY zastává důležitou úlohu v diferenciaci pohlaví, u psa se nachází v proximální části Yq a je přibližně 2,5 Mb velká (Li et al., 2013). V současnosti je nejpodrobněji popsána ve studii Ganga Li a jeho týmu (2013), kteří zkombinovali výsledky analýz MSY psa domácího (*Canis lupus familiaris*) a kočky domácí (*Felis silvestris catus*) společně s dřívějšími studiemi MSY člověka, šimpanze, makaka a myši (Mazeyrat et al., 1998; Skaletsky et al., 2003; Hughes et al., 2005; 2010; 2012; Kuroki et al., 2006). Výsledkem všech těchto studií je rozdělení MSY taxonu Eutheria do čtyř odlišných tříd – sekvencí heterochromatických a tří typů sekvencí euchromatických.

3.3.2.2.1 Heterochromatické sekvence

Heterochromatické sekvence se vyznačují soustředěním repetitivních sekvencí. U psa se vyskytují čtyři základní typy repetitivních sekvencí: SINEs, LINEs, ELA-SINEs a satelitní DNA (Bentolila et al., 1999) (viz. kap. 3.2.2).

3.3.2.2.2 Euchromatické sekvence

Euchromatické sekvence se rozdělují do tří typů (Skaletsky et al., 2003). První typ euchromatických sekvencí, degenerované sekvence z chromozomu X („X-degenerated“), obsahuje především geny s homologním protějškem na X chromozomu. To však na první pohled nemusí být patrné, neboť mnoho původních genů zaniklo při degeneraci Y chromozomu nebo ztratilo své funkce při mutacích (Skaletsky et al., 2003; Li et al., 2013).

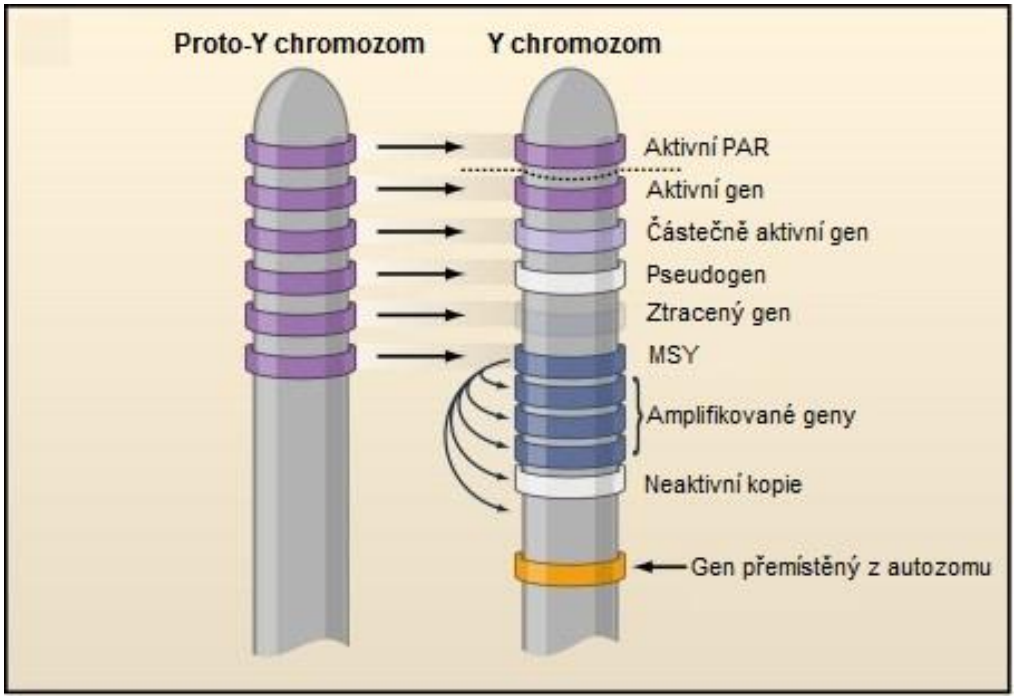
Další třídou jsou sekvence přesunuté z X chromozomu („X-transposed“). Jedná se o oblast v délce 120 Kb obsahující nejmenší počet genů z euchromatinových sekvencí MSY a velké množství rozptýlených repetic (Skaletsky et al., 2003).

Posledním typem euchromatických sekvencí jsou tzv. amplikony skládající se z invertovaných palindromů a tandemových repetitivních sekvencí. Obsahují jak proteiny kódující genové rodiny, jež jsou v naprosté většině exprimovány ve varlatech a hrají důležitou roli ve spermatogenezi, tak i genové rodiny pro nekódující RNA v mnoha téměř identických kopiích. Amplikony představují unikátní sekvence chromozomu Y a vykazují nejmenší počet rozptýlených repetic (Skaletsky et al., 2003; Hughes et al., 2012; Li et al., 2013).

3.3.3 Geny na Y chromozomu psa

Z důvodu diferenciace a následné degenerace obsahuje Y chromozom daleko menší počet genů než jeho protějšek X; vesměs jsou to geny potřebné pro vývoj varlat (Graves, 2010). Některé z genů jsou stále plně aktivní, jiné pouze částečně aktivní, většina se ale postupem času stala nefunkční a byla postupně odstraněna. Geny s funkcemi specifickými pro samčí pohlaví se mohou vyskytovat v mnoha kopiích, z nichž některé se mohou stát inaktivními a degradovat. Další geny se na Y chromozom mohly dostat přemístěním z autozomů (Obr. 5) (Graves, 2006).

Obr. 5: Osud genů na Y chromozomu dle Graves (2006). Plně aktivní geny (tmavě fialová), jiné jsou částečně aktivní (světle fialová), většina je nefunkční (bílá) a je postupně odstraněna. Geny s funkcemi specifickými pro samčí pohlaví (tmavě modrá) mohou být v mnoha kopiích (naznačeno šipkami), některé z nich mohou přestat být funkční a degradují. Další geny jsou přemístěny z autozomů (oranžová).



Po objevení prvních genů na Y chromozomu, mezi nimiž byl gen *ZFY* (Page et al., 1987) a gen *SRY* (Sinclair et al., 1990), bylo na základě jejich rozdílných vlastností navrženo rozdělení genů do dvou tříd – na geny exprimující v mnoha orgánech, které mají své homology na chromozomu X, a geny, jejichž exprese se projevuje především ve varlatech, majících mnoho kopií, ale bez homologů na chromozomu X (Lahn a Page, 1997). Nicméně ne všechny dále objevené geny tomuto rozdělení odpovídaly (Delbridge et al, 1999; 2004; Pask et al., 2000). Později bylo proto vytvořeno nové rozdělení (Lahn et al., 2001), ovšem ani to po nějaké době

nebylo uspokojující. Zdá se totiž, že většina genů na Y chromozomu představuje různé stupně degradace a divergence původních genů. Mnoho genů se stalo neaktivními a bylo rychle ztraceno či se stalo pseudogeny v různých fázích degradace. Některé z genů měly nebo získaly specifické funkce, které zajistily jejich zachování. Proto se jako nejlepší zdá rozdělení genů podle oblastí, ve kterých se vyskytují, i když ani to není stoprocentně přesné (Murphy et al., 2006):

- geny v pseudoautozomální oblasti, které rekombinují s homology na chromozomu X
- degenerované z X („X-degenerate"), které jsou představovány pozměněnými kopiemi genů z chromozomu X
- přemístěné z X („X-transposed"), které byly nedávné době přesunuty z chromozomu X
- Y-specifické amplikonické geny vyskytující se v mnoha téměř identických kopiích, exprimující výhradně ve varlatech.

Jelikož u psa není chromozom Y dosud podrobně prozkoumán, je znám pouze malý počet genů, které se na něm vyskytují. Většina z nich jsou analogy k již objeveným genům na Y chromozomu u jiných savců (Obr. 6).

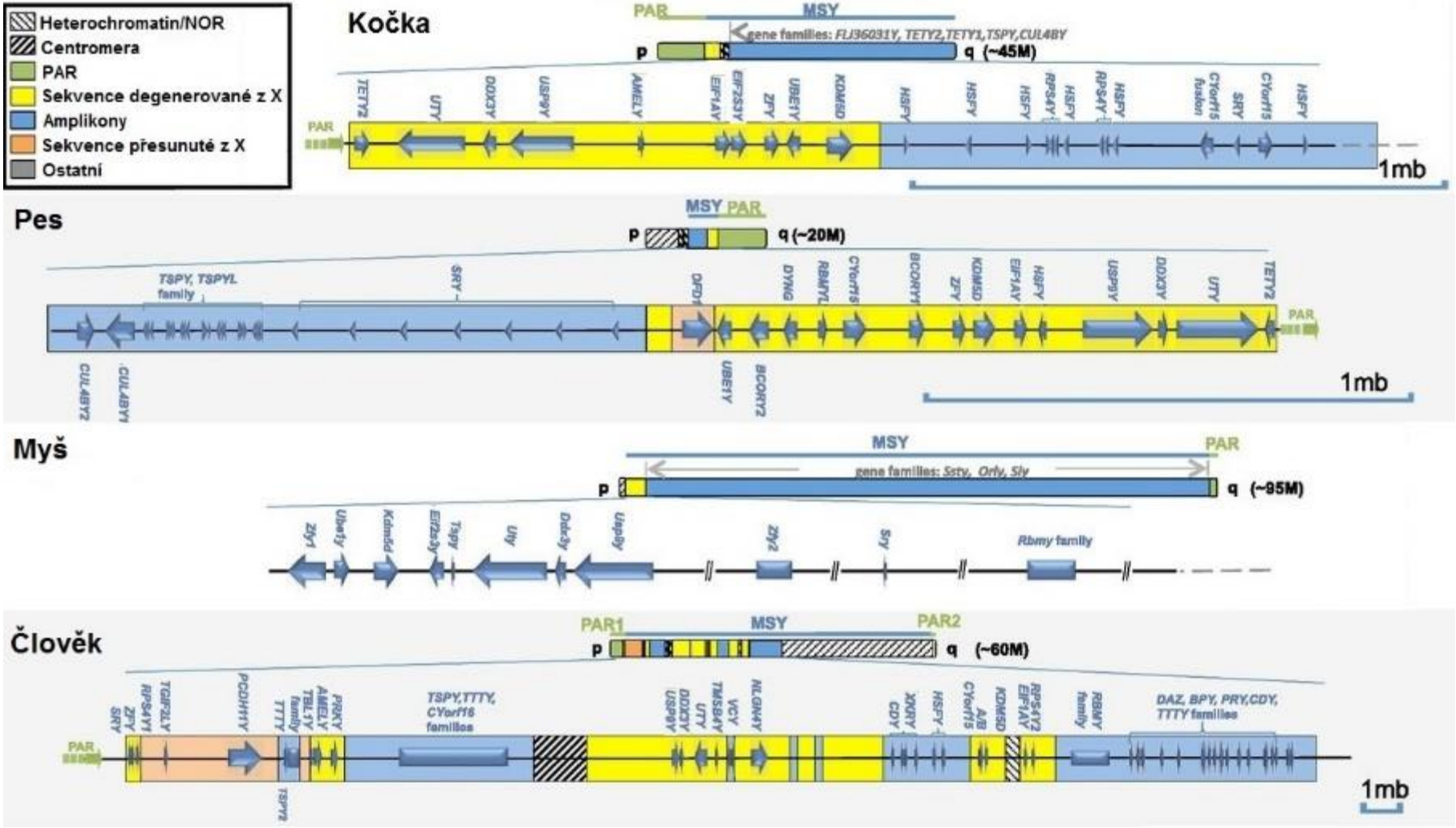
3.3.3.1 Gen *SRY*

Gen *SRY* („sex-determining region of the Y chromosome", pohlaví determinující region Y chromozomu) byl objeven při zkoumání 35 Kb velkého úseku p ramene lidského chromozomu Y (Sinclair et al., 1990). Již tehdy byl považován za možný faktor zodpovědný za vývoj varlat z nediferencovaných gonád (TDF). U savců byl gen *SRY* jednoznačně určen jako TDF po analýzách zvratů pohlaví u člověka a myši a studiích provedených u dalších savců a také vačnatců (Sinclair et al., 1990; Foster a Graves, 1994; Wilhelm a Koopman, 2006).

SRY kóduje transkripční faktor, který je velmi podobný tzv. HMB proteinům („High Mobility Group"), které patří mezi chromozomové proteiny kyselé povahy (Goodwin et al., 1973). Je exprimován nejenom v buňkách nediferencovaných gonád, ale také v mozku v oblasti zvané substantia nigra, kde ovlivňuje tvorbu tyrosin hydrolázy potřebné pro syntézu dopaminu (Lahr et al., 1995; Mayer et al., 1998).

U psa se gen *SRY* nachází v proximální části q ramene, a díky svému rozšíření do sedmi kopií v rámci 700 Kb tandemové repetice se řadí mezi amplikonické geny (Li et al., 2013).

Obr. 6: Schématické znázornění MSY včetně genů u čtyř savců dle Mazeyrat et al. (1998), Skaletsky et al. (2003) a Hughes et al. (2005; 2010; 2012). Převzato a upraveno z Li et al. (2013). Jednotlivé typy sekvencí jsou vyznačeny různými barvami.



3.3.3.2 Gen *ZFY*

Gen *ZFY* („zinc finger protein, Y-linked“) byl objeven jako jeden z prvních genů na Y chromozomu (Page et al., 1987). Představoval jednoho z kandidátů na TDF u savců, Palmer et al. (1989) však prokázali, že jím není. Pomocí PCR byla Palmerem et al. (1990) dokázána úzká podobnost genu *ZFY* s genem *ZFX* ležícím na chromozomu X. Dále prokázali expresi obou genů v celé řadě lidských tkání, ať už u dospělých či nenarozených jedinců. Sekvence obdobné genům *ZFY* a *ZFX* byly nalezeny i u vačnatců (Sinclair et al., 1988), nikoli ale na pohlavních chromozomech, nýbrž na autozomech, což vedlo k závěru, že *ZFY* u vačnatců není TDF.

Tento gen je transkribován u jedinců samčího pohlaví, a pravděpodobně se tedy účastní dějů, jako je dozrávání spermií (Donnelly et al., 1996).

3.3.3.3 Gen *UTY*

Poprvé byl gen *UTY* („ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on Y chromosome“) popsán u myši, kde je exprimován v mnoha tkáních a kóduje tzv. TPR protein, jehož aminokyselinové sekvence bývají součástí mnoha dalších proteinů, a předpokládá se, že zprostředkovávají interakce protein-protein (Greenfield et al., 1996). U člověka je tento gen již kompletně osekvenovaný a své uplatnění má pravděpodobně ve spermatogenezi (Shen et al., 2000).

3.3.3.4 Gen *KDM5D*

Tento gen, úplným názvem lysine-specific demethylase 5D byl poprvé popsán u myši, kdy byl pojmenován také jako SMCY („selected mouse cDNA on Y“) (Agulnik et al., 1994a). Na X chromozomu byl nalezen také jeho homolog SMCX (Agulnik et al., 1994b). U lidí a koní byly zjištěny homology, které vykazují více jak 93 % shodu (Agulnik et al., 1994a). Exprese SMCY byla detekována ve všech samčích tkáních a exprese SMCX ve všech samčích i samičích testovaných tkáních (Agulnik et al., 1994b). Stejně jako např. *SRY* je zachován na Y chromozomu již od doby oddělení vačnatců od podtřídy Theria před asi 120 miliony lety (Agulnik et al., 1994b).

Při zkoumání tohoto genu u myši bylo také prokázáno, že kóduje histokompatibilní antigen H-2, který je tvořen peptidem TENSGKDI, zatímco u SMCX žádný podobný produkt nebyl prokázán (Scott et al., 1995). Tím je pravděpodobně vytvořen genetický základ pro antigenní rozdíl mezi samčím a samičím pohlavím, který může přispívat k odmítnutí transplantované tkáně (Scott et al., 1995). Kent-First et al. (1996) provedli kompletní osekvenování tohoto genu u člověka a potvrdili, že podobně jako u myší, kóduje

histokompatibilní antigen, který je součástí komplexu HLA-B7 („Human Leucocyte Antigen“) histokompatibilního systému člověka.

3.4 Molekulárně genetické metody využívané pro studium Y chromozomu

Molekulárně genetické metody představují v oblasti zoologie významný pokrok. Možnost přečtení nukleotidových a proteinových sekvencí, namnožení požadovaných fragmentů DNA a automatizace těchto procesů umožnily rozvoj molekulárně genetických metod v masovém měřítku. V současné době se molekulárně genetické metody využívají v mnoha odvětvích biologie včetně populační a evoluční biologie, etologie, systematiky a v celé řadě dalších.

3.4.1 Sekvenování DNA

Do dnešní doby je známo mnoho způsobů sekvenování DNA lišících se základními principy a také časovou a cenovou náročností (Grada a Weinbrecht, 2013). Od tradičních metod vyvinutých během sedmdesátých let 20. století, po metody tzv. druhé generace („second generation sequencing“, SGS či „next generation sequencing“, NGS), přičemž v blízké budoucnosti můžeme očekávat nástup již třetí generace sekvenátorů, od kterých lze očekávat nejenom zlevnění, ale také podstatné urychlení celého procesu sekvenování (Grada a Weinbrecht, 2013).

3.4.1.1 Tradiční sekvenační metody

Mezi tradiční sekvenační metody, někdy též nazývané sekvenační metody 1. generace, patří dideoxyterminační Sangerova metoda a chemická Maxam-Gilbertova, vyvinuté nezávisle na sobě v sedmdesátých letech minulého století (Brown, 2007). Do současné doby je využívána Sangerova metoda, a to i navzdory jejím vyšším nákladům, především díky své přesnosti (Shendure a Ji, 2008). V roce 1980 obdrželi Sanger a Gilbert za své objevy Nobelovu cenu.

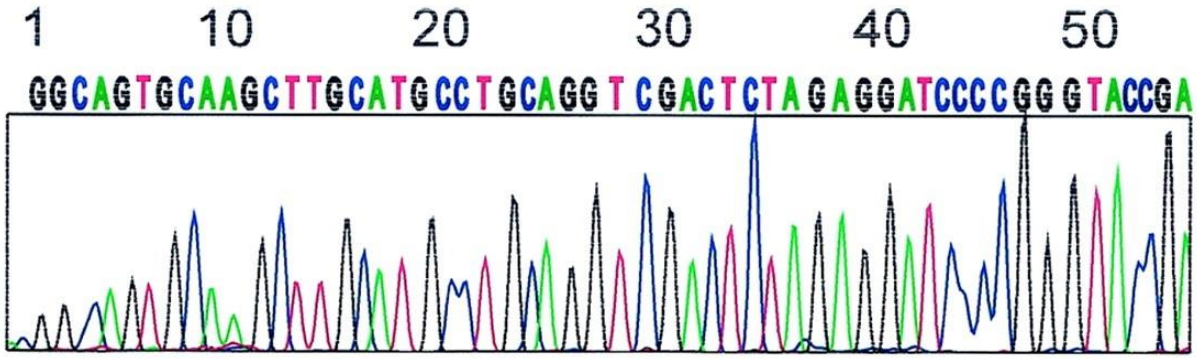
3.4.1.1.1 Sangerova metoda

Tato metoda, známá také jako metoda „plus a mínus“, „dideoxy“ nebo „primed synthesis“ metoda (King et al., 2006) byla vyvinuta v roce 1975 anglickými vědci pod vedením F. Sangera (Sanger et al., 1977). U této metody se využívá jednovláknová DNA sloužící jako vzor (templát) pro syntézu komplementárního řetězce. V originální podobě bylo zapotřebí čtyř zkumavek obsahujících vždy vhodný primer, který je radioaktivně označen, DNA polymerázu, templát, deoxynukleotidy (dNTPs) a v každé zkumavce vždy po jednom typu dideoxynukleotidů (ddNTPs) – ddATP, ddTTP, ddCTP a ddGTP (Brown, 2007). ddNTPs se

od dNTPs liší tím, že na 3‘ uhlíku mají místo hydroxylové skupiny navázaný vodík. Tyto ddNTPs jsou ve směsi přítomny pouze v malé koncentraci (většinou bývá poměr 1 ddNTP : 100 dNTPs), zároveň jsou ve směsi přítomny i radioaktivní nukleotidy potřebné pro konečnou vizualizaci výsledků (Brown, 2007). V případě zařazení ddNTP do sekvence dojde k ukončení prodlužování komplementárního řetězce z důvodu znemožnění vytvoření fosfodiesterové vazby s dalším nukleotidem. Výsledkem jsou různě dlouhé fragmenty DNA lišící se délkou o jeden nukleotid, které vždy končí na pozici, kde by se v normálním řetězci vyskytoval daný dNTP (Brown, 2007). Získané fragmenty jsou denaturovány a následně roztříděny podle velikosti pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. K vizualizaci výsledků se využívá autoradiografie, kdy se gel po prodělané elektroforéze přiloží k filmu citlivému na rentgenové záření a díky radioaktivnímu označení se na filmu zobrazí fragmenty, z nichž lze následně odvodit pořadí jednotlivých nukleotidů (Sanger et al., 1977).

V současné době se již používají další, modernější metody, které však stále využívají stejného principu. Díky značení jednotlivých ddNTPs fluorofory může sekvenace probíhat v jedné zkumavce a analýza se provádí pomocí kapilární elektroforézy a laserové detekce schopné zachytit rozdílná záření fluorescenčně označených ddNTPs. Výsledkem je chromatograf, ze kterého je možné určit pořadí jednotlivých nukleotidů (Obr. 7) (Shendure a Ji, 2008). Pomocí této metody byl osekvenován celý genom psa (Lindblad-Toh et al., 2005).

Obr. 7: Chromatograf z kapilární elektroforézy sekvenace DNA. Každý peak představuje jeden nukleotid řetězce DNA. Převzato a upraveno dle Paegel et al. (2002).



3.4.1.1.2 Maxam-Gilbertova metoda

Maxam-Gilbertova metoda, která byla vyvinuta při studiu nukleových kyselin, je založena na chemické modifikaci DNA (Maxam a Gilbert, 1977). Na rozdíl od Sangerovy metody lze tímto způsobem sekvenovat nejenom jednovláknovou, ale i dvouvláknovou DNA (Maxam a Gilbert, 1977). Zkoumané molekuly DNA jsou na jednom konci (nezáleží, zda na

3‘-konci či 5‘-konci) označeny radioaktivním fosforem ^{32}P. Dále jsou rozděleny na fragmenty a vystaveny chemickému působení enzymů, které štěpí DNA vždy v místě daného dNTP. Takto získané sekvence jsou podrobeny elektroforéze. Stejně jako u Sangerovy metody se k vizualizaci jednotlivých fragmentů po elektroforéze využívá autoradiografie (Maxam a Gilbert, 1977).

3.4.1.2 Sekvenační metody nové generace

Tradiční metody sekvenace DNA se během let ukázaly jako nedostatečné a to zejména co se týče časové náročnosti, ceny a tím pádem i dostupnosti (Margulies et al, 2005; Grada a Weinbrecht, 2013). Bylo tedy vyvinuto značné množství NGS metod, které umožňují masivně paralelní sekvenování („massively parallel sequencing“), pomocí kterého nyní můžeme izolovat a amplifikovat obrovské množství (tisíce až miliony) molekul DNA a ty následně osekvenovat (Morrissy et al., 2009). V této práci je zmíněna pyrosekvenace a technologie označována jako Illumina/Solexa.

3.4.1.2.1 Pyrosekvenace (metoda 454/Roche)

Metoda pyrosekvenace („pyrosequencing“) je odvozena od Sangerovy metody a využívá aktivitu DNA polymerázy monitorovanou pomocí bioluminiscence, poprvé popsanou již v osmdesátých letech minulého století (Nyrén, 1987).

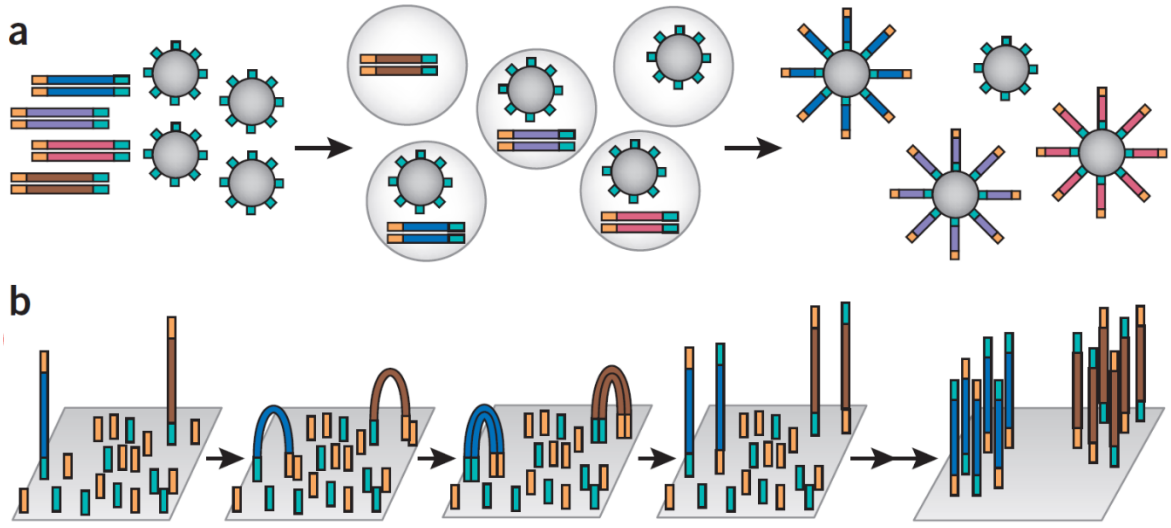
Pomocí technologií firem 454 Life Sciences a Roche Diagnostics byla pyrosekvenace vůbec první komerčně dostupná metoda NGS, která byla zpřístupněna v roce 2005 (Margulies et al, 2005).

Prvním krokem pyrosekvenace je vytvoření DNA knihovny (souboru molekul DNA určených k sekvenaci) štěpením molekuly DNA na fragmenty, na jejichž konce jsou následně navázány adaptéry důležité pro amplifikaci a sekvenaci (Shendure a Ji, 2008). Samotná amplifikace molekul jednořetězcové DNA probíhá pomocí emulzní PCR (emPCR). Jednotlivé fragmenty jsou navázány po povrch mikrokuliček majících 28 μm v průměru (Obr. 8) a každá mikrokulička je umístěna v kapce vody o objemu 100 μl. Kapky vody se nacházejí v olejové emulzi se všemi složkami potřebnými pro amplifikaci (Huse et al., 2007). Dále se mikrokuličky s navázanými naamplifikovanými molekulami DNA uloží do pikolitrových jamek čipu PicoTiterPlate^{TM} a přidá se enzym luciferáza potřebný pro emisi světla z uvolněného pyrofosfátu (PPi) při začlenění nového nukleotidu. Množství uvolněného PPi, které je odlišné podle jednotlivých dNTPs, je detekováno snímací CCD kamerou („the charge-coupled device“) a následně vyhodnoceno (Huse et al., 2007).

3.4.1.2.2 Illumina/Solexa

Pro technologii Illumina jsou stejně jako u metody 454/Roche zapotřebí fragmenty DNA, na jejichž koncích jsou navázány dva rozdílné adaptéry. Amplifikace fragmentů probíhá pomocí tzv. bridge PCR („můstková amplifikace“), jež dostala svůj název díky ohnutí fragmentů do „můstku“ po přidání enzymů (Obr.8) (Su et al., 2011). Výsledné kopie fragmentů (amplikony) jsou umístěny v těsných shlucích – klastrech („clusters“), kdy v každém klastru je cca 1 000 amplikonů (Shendure a Ji, 2008). Několik milionů klastrů je naamplifikováno na destičce („flow-cell“) v osmi oddělených pruzích, z nichž všechny mohou být paralelně osekvenovány během jednoho sekvenačního běhu. Po generování klastrů jsou na jednotlivá vlákna amplikonů od sebe oddělena denaturací a na jejich konce jsou navázány primery (Shendure a Ji, 2008). Následuje samotné sekvenování, které probíhá pomocí fluorescenčně odlišně označených bází, které hybridizují s amplikony a pomocí laseru se vyhodnocuje pořadí jednotlivých bází podle určitého fluorescenčního barviva (Shendure a Ji, 2008).

Obr. 8: Porovnání amplifikací technologií 454/Roche (a) a Illumina (b) dle Shendure a Ji (2008). Technologie 454/Roche k amplifikaci knihovny využívá emPCR. Fragmenty DNA s adaptéry (znázorněny tyrkysovou a žlutou barvou) jsou navázány na povrch mikrokuliček v olejové emulzi, kde následně dochází k paralelní amplifikaci jednotlivých molekul. U technologie Illumina je k amplifikaci knihovny využita bridge PCR. Fragmenty s navázanými adaptéry jsou na flow-cell destičce, která je pokryta oligonukleotidy komplementárními k oběma typům adaptérů. Hybridizací adaptérů a oligonukleotidů se fragment ohne a vytvoří „můstek“. Ke každému fragmentu je dosyntetizováno vlákno, které je následně odděleno denaturací. Opakováním procesu vznikají klastry s mnoha kopiemi původních fragmentů.



3.4.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“, PCR) je biochemická reakce umožňující amplifikaci (zmnožení) určitého úseku DNA vymezeného primery (Zvárová, 2012). Samotné kopírování umožňuje enzym DNA polymeráza. V případě PCR je však nutná přítomnost tzv. termostabilních polymeráz, které na rozdíl od „normálních“ polymeráz snášejí i vysoké teploty nutné pro denaturaci DNA nastávající na počátku každého cyklu PCR (Zvárová, 2012). Nejčastěji je používána tzv. *Taq*-polymeráza, nazvaná podle bakterie *Thermus aquaticus* (Innis et al., 1990). Pro reakci je tedy nutná termostabilní polymeráza, dále templát, který chceme namnožit, vhodné primery a dNTPs sloužící jako stavební materiál pro nově syntetizovanou DNA; to vše ve vhodném pufru a vhodných koncentracích (Zvárová, 2012). Reakce probíhá ve třech krocích, které jsou kontrolovány změnami teplot (Innis et al., 1990):

a) denaturace – dvouvláknová DNA je denaturována vystavením teplotě 94 °C
b) ochlazení („annealing“) – ochlazení na T_a (annealing temperature) primerů umožní jejich nasednutí na templát
c) elongace – aktivitu termostabilních polymeráz umožní zahřátí směsi na 72 °C, následuje syntéza nového řetězce podle templátu ve směru 5‘ → 3‘.

Vzniklé produkty jsou kopiemi templátu včetně vazebných míst primerů a při opakování cyklu (25 - 45x) slouží samy jako templát pro další syntézu produktů, jejichž množství tak roste geometrickou řadou (Zvárová, 2012).

3.4.3 Délkový polymorfismus restrikčních fragmentů

Délkový polymorfismus restrikčních fragmentů („restriction fragment length polymorphism“, RFLP) je způsoben různou mírou variability v sekvencích cílových míst restrikčních endonukleáz (Zvárová, 2012). Restrikční endonukleázy jsou bakteriální enzymy, které v řetězci DNA rozpoznávají určitou sekvenci bází (většinou jde o několik párů bází), často navíc palindromatickou, a které daný úsek následně štěpí (Attwood et al., 2006). Sekvence DNA se u jednotlivců může lišit, a pokud je tato variabilita právě v místě rozpoznávaném restrikční endonukleázou, ke štěpení nedojde. U různých jedinců tak mohou mít restrikční fragmenty DNA různou délku, což můžeme vidět po jejich rozdělení na gelové elektroforéze, přenesení na membránu a detekci značenou sondou (Zvárová, 2012).

3.4.4 Délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů

Délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů („amplified fragment length polymorphism“, AFLP) jsou variace v sekvenci DNA způsobené SNPs nebo indels, které vytvářejí nebo ruší rozpoznávací místa restrikčních endonukleáz. K štěpení se používá jedna nebo dvě restrikční endonukleázy, přičemž v druhém případě jedna štěpí častěji než druhá. K restrikčním fragmentům jsou déle naligovány adaptéry (krátké dvouvláknové úseky DNA) zabraňující obnově původního restrikčního místa (Vos et al., 1995). Následují dvě PCR, preselektivní a selektivní. Při preselektivní PCR se pomocí specifických primerů amplifikují úseky komplementární k sekvencím adaptérů plus jedné následující báze. U selektivní PCR je postup stejný, jen se amplifikují úseky komplementární k sekvencím adaptérů plus dalších tří následujících bází. Tím se sníží celkové množství amplifikovaných úseků a zároveň zvýší jejich specifičnosti. Tyto produkty PCR jsou nakonec elektroforeticky rozděleny v polyakrylamidovém gelu (Vos et al., 1995).

3.4.5 DNA microarray

DNA microarray neboli DNA čip je technologie využívající hybridizace neznámé DNA na DNA sondy navázané na čipu. Samotný čip je tvořen skleněnou nebo silikonovou destičkou, na jejímž povrchu jsou kovalentními vazbami navázány sondy – známé sekvence jednovláknové DNA odpovídající daným místům v genomu. Na tyto sondy později hybridizují vzorky zkoumané komplementární DNA (cDNA), které vznikají reverzní transkripcí z izolované mRNA. Při reverzní transkripci současně probíhá i označování vláken cDNA většinou fluorescenčními barvivy, jejichž množství bude dále detekováno. Vzorky jsou naamplifikovány pomocí PCR a smíchány ve stejném poměru se dají na čip. Dochází k již výše zmíněné hybridizaci sond a komplementárních cDNA a poté se čip omyje, čímž se odstraní nenavázané sekvence. Při následné excitaci laserem se zaznamená emitované záření, které umožní další analýzy – tedy k jakým sondám existovaly ve zkoumaném vzorku komplementární sekvence DNA a případně i v jakém množství (Nuwaysir et al., 1999).

DNA microarrays se nejčastěji využívají při porovnání exprese mnoha (až tisíců) různých genů najednou. Využívá se tzv. dvoukanálového experimentu, kdy se vzájemně porovnávají dva vzorky označené rozdílnými barvami. Jako příklad mohou sloužit dvě populace buněk – jedna zdravá a druhá napadená virem. Rozdílné značení snadno prokáže rozdílnou expresi genů mezi oběma vzorky (Vinciotti et al, 2005).

3.5 Využití Y specifických markerů pro genetické studie

Pomocí metod molekulární biologie můžeme snadno vytvářet Y specifické markery, a proto se staly oblíbeným nástrojem výzkumu. U psovitých šelem je můžeme využít při studiu evoluce a fylogeneze v jednotlivých populacích. Konkrétně u psa domácího bývají využity k objasnění otázek ohledně místa a času domestikace, při posuzování genetické rozmanitosti plemen, určení paternity a v neposlední řadě i ve zdravotnictví při výzkumu geneticky podmíněných onemocnění. Stále větší uplatnění mají DNA markery nyní i v kriminalistice.

Y markery se využívají hlavně při zjišťování genetické příbuznosti mezi jedinci (Salisbury et al., 2003), ale objevují se i případy, kdy je možné je (často s přispěním doplňujících analýz např. mtDNA) využít k identifikaci pohlaví (van Asch et al., 2010). Při studiu evoluční historie jsou Y markery obdobou mtDNA s tím rozdílem, že lze sledovat otcovskou linii (Barbaro et al., 2008).

Jako Y chromozomové markery se u člověka využívají SNPs, mikrosatelity, Alu elementy a minisatelity (Hammer, 1994; Jobling a Tyler-Smith, 2003); u psa se využívají především mikrosatelity a SNPs (Brown et al, 2011).

3.5.1 Původ a domestikace psa

Shrnutí současných názorů ohledně domestikace psa je popsáno v kapitole 3.1.2. Naprostá většina studií byla provedena pomocí analýz mtDNA (Vilà et al., 1997; Savolainen et al., 2002; Pang et al., 2009; Thalmann et al., 2013), jejichž výsledky umožňují sledování pouze mateřské linie, což může vést k poněkud zkreslenému celkovému výsledku (Sundqvist et al., 2001). Nicméně studie s využitím Y markerů zatím tak početné nejsou, i když zcela jistě poskytují vhodnou alternativu k analýzám mtDNA (Jobling a Tyler-Smith, 2003). Výjimku tvoří Brown et al. (2011), kteří analýzy mtDNA sekvencí doplnili o SNPs a mikrosatelity na Y chromozomu. Markery pouze z Y chromozomu ve své studii použili Ding et al. (2012), kteří identifikovali 28 rozdílných haplotypů Y chromozomu, pomocí nichž se snažili zjistit místo domestikace psa. Dalším příkladem je zjišťování původu dinga a to s pomocí 85 haplotypů Y chromozomu (Sacks et al., 2013). Počátky vzniku samotných plemen psů za pomoci autozomálních, mitochondriálních a Y chromozomových markerů popisují Sundqvist et al. (2006).

Vzhledem k panujícím neshodám mezi archeologickými nálezy a genetickými studiemi, zastoupenými v drtivé většině analýzami mtDNA, by mohly studie zahrnující markery na chromozomu Y do této problematiky vnést nový pohled.

3.5.2 Forenzní analýzy

Psi jsou v našich domácnostech nejčastěji chovanými zvířaty, přičemž jen v Evropské unii je jejich počet odhadován na 60 milionů (Eurogroup for Animals, 2013). Vzhledem k tomuto počtu a značné míře integrace psů do lidské společnosti mohou nastat situace, kdy genetická identifikace psa představuje důležitý nebo dokonce jediný zdroj důkazů (Eichmann et al., 2004). Zvíře se může stát obětí týrání či krádeže, může způsobit nehodu, škody na zdraví nebo majetku. Biologický materiál pocházející ze psa tedy často bývá nezbytný pro usnadnění identifikace (van Asch a Pereira, 2010). V současné době se forenzní analýzy také uplatňují při posuzování genetické rozmanitosti plemen, určování otcovství a pohlaví, struktury populací a inbreedingu nejenom u psů, ale v posledních uvedených případech i u příbuzných druhů jako je vlk (van Asch a Pereira, 2010). Forenzní analýzy lze dále využít i při určování kříženců pes-vlk, či rozeznávání jedinců pes x vlk, což má velký význam při populačních studiích vlčích populací (van Asch et al., 2010).

Samotné Y markery se běžně využívají v kombinaci s dalšími markery, jejichž výběr se liší podle typu dané studie a jejím požadovaném výsledku. Analýzy mtDNA, 12 autozomálních mikrosatelitů, 3 mikrosatelitů z chromozomu Y a samčího specifického ZFX/ZFY restrikčního místa, byly využity při vyšetřování případu pytláctví v italských Alpách (Caniglia et al., 2010). Van Asch et al. (2010) kromě dalších devíti markerů ve své studii použili i dva lokusy k identifikaci pohlaví u psů a vlků – 106 bp dlouhý fragment genu *SRY* a 186 bp dlouhý fragment genu *AR* („androgen receptor“) na X chromozomu. K určení pohlaví forenzními analýzami se dá použít i gen kódující amelogenin (Butler, 2014), čehož využili Morikawa et al. (2011) u celé řady zvířat včetně psa.

3.5.3 Populační studie

Možnost osekvenování celých genomů znamená významný pokrok v evolučních a populačních studiích především v množství dostupných genetických markerů (Pilot et al., 2014). Vedle mitochondriálních markerů jsou v nich stále častěji zastoupeny i markery nacházející se na Y chromozomu, které nám mohou poskytnout nové poznatky o populacích i z hlediska paternální linie (Sundqvist et al., 2001), ať už se jedná o informace ohledně migrací, genealogické struktury, genetické diverzity, životaschopnosti populace (inbreeding, bottleneck) či hybridizace.

Sundqvist et al. (2001) porovnávali přítomnost haplotypů Y chromozomu u populace skandinávských vlků s vlky žijícími v ostatních lokalitách severní Evropy, přičemž prokázali, že skandinávská populace je od ostatních velmi izolovaná a ze strany samců téměř nedochází

k toku genů. Tatáž populace byla o dva roky později podrobena dalšímu zkoumání (Flagstad et al., 2003), při němž na podkladě variability Y chromozomu nebyla vyloučena možnost migrace několika vlků z Ruska do této populace. Evoluční vztahy mezi třemi největšími evropskými populacemi vlků obecných ve srovnání s ostatními populacemi po celém světě analyzovali i Pilot et al. (2014), zatímco severoamerickou populací vlků žijící v oblasti Velkých jezer se zabývali Koblmüller et al. (2009), kteří ji podle mtDNA a haplotypů Y chromozomu označují jako jedinečný ekotyp vlka obecného.

Hybridizace mezi psy a vlky je závažným jevem, který může ohrozit vlčí populace. Hrozbou je především vnesení cizorodých genů do vlčích genomů, jehož škodlivé následky jsou zatím málo známy (Iacolina et al., 2010). Studie využívající mtDNA jsou však schopny určit křížence pouze po maternální linii. Vůbec první studie, ve které byly použity i markery z Y chromozomu v kombinaci s 18 autozomálními mikrosatelity a analýzami mtDNA, se týkala identifikace hybridních jedinců v populaci skandinávských vlků (Vilà et al., 2003). Stejným způsobem, jen s větším množstvím markerů, konkrétně s 6 mikrosatelity na chromozomu Y a 42 autozomálních mikrosatelitů, a též s analýzami mtDNA sekvencí, byla studována hybridizace psů a vlků na Pyrenejském poloostrově (Godinho et al., 2011). Páření vlčic s psími samci bylo prokázáno též v Itálii (Iacolina et al., 2010). Mezidruhová hybridizace dokonce se dvěma rozdílnými druhy, vlkem obecným (*Canis lupus*) a kojotem (*C. latrans*), byla zjištěna v Kanadě u vlků východních (*C. lycaon*) na základě zkoumání mitochondriálních, Y chromozomových autozomálních mikrosatelitů (Rutledge et al., 2010).

4 Závěr

Ve své práci jsem se zabývala strukturou a organizací genomu psa, se zvláštním zaměřením na Y chromozom. Výzkum Y chromozomu a aplikace získaných poznatků prozatím nejsou příliš rozšířeny, i když se situace v posledních letech postupně zlepšila. Důvodem může být nízký předpokládaný počet genů a značné množství repetitivních sekvencí, které ztěžují zejména sekvenování.

Samotný výzkum Y chromozomu probíhá pomocí molekulárně genetických metod, mezi nimiž se ve své práci podrobněji zmiňuji o sekvenování, PCR, AFLP a RFLP metodách. S jejich pomocí lze vytvořit Y specifické markery, které mohou být dále využívány v celé řadě studií, především evolučních, populačních a forenzních a s jejichž pomocí je možno dále identifikovat hybridy mezi vlky a dalšími psovitými šelmami. Existují i studie využívající poznatky ohledně Y chromozomu při určování oblasti a doby domestikace psa.

5 Seznam literatury

Adams, J. R., Leonard, J. A., Waits, L. P. 2003. Widespread occurrence of a domestic dog mitochondrial DNA haplotype in southeastern US coyotes. Molecular Ecology. 12 (2). 541-546.

Agulnik, A. I., Mitchell, M. J., Lerner, J. L., Woods, D. R., Bishop, C. E. 1994a. A mouse Y chromosome gene encoded by a region essential for spermatogenesis and expression of male-specific minor histocompatibility antigens. Human Molecular Genetics. 3 (6). 873-878.

Agulnik, A. I., Mitchell, M. J., Mattei, M. G., Borsani, G., Avner, P. A., Lerner, J. L., Bishop, C. E. 1994b. A novel X gene with a widely transcribed Y-linked homologue escapes X-inactivation in mouse and human. Human Molecular Genetics. 3 (6). 879-884.

van Asch, B., Pereira, F. 2010. State-of-the-art and future prospects of canine STR-based genotyping. The Open Forensic Science Journal. 3. 45-52.

van Asch, B., Alves, C., Santos, L., Pinheiro, H., Pereira, F., Gusmão, L., Amorim, A. 2010. Genetic profiles and sex identification of found-dead wolves determined by the use of an 11-loci PCR multiplex. Forensic Science International: Genetics. 4. 68-72.

Attwood, T. K., Cammack, R., Campbell, P. N., Parish, J. H., Smith, A. D., Stirling, J. L., Vella, F. 2006. Oxford dictionary of Biochemistry and molecular biology. Second edition. Oxford University Press. New York. p. 736. ISBN: 978-0198529170.

Bachtrog, D. 2008. The temporal dynamics of processes underlying Y chromosome degeneration. Genetics. 179 (3). 1513-1525.

Bachtrog, D. 2013. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. Nature Reviews. Genetics. 14 (2). 113-124.

Barbaro, A., Cormaci, P., Barbaro, A. 2008. Complex family relationship reconstruction by Y-STRs test. Forensic Science International: Genetic Supplement Series. 1. 494-495.

Benecke, N. 1987. Studies on early dog remains from Northern Europe. Journal of Archaeological Science. 14 (1). 31-49.

Bentolila, S., Bach, J.-M., Kessler, J.-L., Bordelais, I., Cruaud, C., Weissenbach, J., Panthier, J.-J. 1999. Analysis of major repetitive DNA sequences in the dog (*Canis familiaris*) genome. Mammalian Genome. 10. 699-705.

Biltueva, L. S., Yang, F., Vorobieva, N. V., Graphodatsky, A. S. 2004. Comparative map between the domestic pig and dog. Mammalian Genome. 15 (10). 809-818.

Boyko, A. R. 2011. The domestic dog: man's best friend in the genomic area. Genome Biology. 12 (2). 216.

Boyko, A. R., Boyko, R. H., Boyko, C. M., Parker, H. G., Castelhano, M., Corey, L., Degenhardt, J. D., Auton, A., Hedimbi, M., Kityo, R., Ostrander, E. A., Schoenebeck, J., Todhunter, R. J., Jones, P., Bustamante, C. D. 2009. Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 106 (33). 13903-13908.

Breen, M. 2008. Canine cytogenetics – from band to basepair. Cytogenetic and Genome Research. 120 (1-2). 50-60.

Breen, M., Bullerdiek, J., Langford, C. F. 1999. The DAPI banded karyotype of the domestic dog (*Canis familiaris*) generated using chromosome-specific paint probes. Chromosome Research. 7 (5). 401-406.

Breen, M., Hitte, C. Lorentzen, T. D., Thomas, R. Cadieu, E., Sabacan, L., Scott, A., Evanno, G., Parker, H. G., Kirkness, E. F., Hudson, R., Guyon, R., Mahairas, G. G., Gelfenbeyn, B., Fraser, C. M., André, C., Galibert, F., Ostrander, E. A. 2004. An integrated 4249 marker FISH/RH map of the canine genome. BMC Genomics. 5. 65.

Breen, M., Jouquand, S., Renier, C., Mellersh, C. S., Hitte, C., Holmes, N. G., Chéron, A., Suter, N., Vignaux, F., Bristow, A. E., Priat, C., McCann, E., André, C., Boundy, S., Gitsham, P., Thomas, R., Bridge, W. L., Spriggs, H. F., Ryder, E. J., Curson, A., Sampson, J., Ostrander, E. A., Binns, M. M., Galibert, F. 2001. Chromosome-Specific Single-Locus FISH Probes Allow Anchorage of an 1800-Marker Integrated Radiation Hybrid/Linkage Map of the Domestic Dog Genome to All Chromosomes. Genome Research. 11 (10). 1784-1795.

Brookfield, J. F. 1994. The human Alu SINE sequences – is there a role for selection in their evolution? BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. 16 (11). 793-795.

Brown, S. K., Pedersen, N. C., Jafarishorijeh, S., Bannasch, D. L., Ahrens, K. D., Wu, J.-T., Okon, M., Sacks, B. N. 2011. Phylogenetic distinctiveness of Middle Eastern and Southeast Asian village dog Y chromosomes illuminates dog origins. PLoS ONE. 6 (12). e28496.

Brown, T. A. 2007. Klonování genů a analýza DNA: Úvod. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc. 408 s. ISBN: 978-80-244-1719-6.

Burgoyne, P. S. 1982. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. Human Genetics. 61 (2). 85-90.

Butler, J. M. 2014. Advanced topics in feronsic DNA typing: interpretation. Academic Press. Gaithersburg. p. 608. ISBN: 978-0-12-405213-0.

Caniglia, R., Fabbri, E., Greco, C., Galaverni, M., Randi, E. 2010. Forensic DNA against wildlife poaching: identification of a serial wolf killing in Italy. Forensic Science International: Genetics. 4 (5). 334-338.

Carvalho, A. B., Koerich, L. B., Clark, A. G. 2009. Origin and evolution of Y chromosomes: Drosophila tales. Trends in Genetics. 25 (6). 270-277.

Císařovský, M. 2008. Pes: nekonečný příběh od pravěku do třetího tisíciletí. CANIS. Praha. 902 s. ISBN: 9788090082014.

Comstock, K. E., Lingaas, F., Kirkness, E. F., Hitte, C., Thomas, R., Breen, M., Galibert, F., Ostrander, E. A. 2004. A high-resolution comparative map of canine chromosome 5q14.3-q33 constructed utilizing the 1,5x canine genome sequence. Mammalian Genome. 15 (7). 544-551.

Cunningham, F., Amode, M. R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., Gil, L., Girón, C. G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S. E., Janacek, S. H., Johnson, N., Juettemann, T., Kähäri, A. K., Keenan, S., Martin, F. J., Maurel, T., McLaren, W., Murphy, D. N., Nag, R., Overduin, B., Parker, A., Patricio, M., Perry, E., Pignatelli, M., Riat, H. S., Sheppard, D., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Wilder, S. P., Zadissa, A., Aken, B. L., Birney, E., Harrow, J., Kinsella, R., Muffato, M., Ruffier, M., Searle,

S. M. J., Spudich, G., Trevanion, S. J., Yates, A., Zerbino, D. J., Flicek, P. 2015. Ensembl 2015. Nucleic Acids Research. 43.

Das, P. J., Chowdhary, B. P., Raudsepp, T. 2009. Characterization of the bovine pseudoautosomal region and comparison with sheep, goat, and other mammalian pseudoautosomal regions. Cytogenetic and genome research. 126 (1-2). 139-147.

Das, P. J., Mishra, D. K., Ghosh, S., Avila, F., Johnsos, G. A., Chowdhary, B. P., Raudsepp, T. 2013. Comparative organization and gene expression profiles of the porcine pseudoautosomal region. Cytogenetic and genome research. 141 (1). 26-36.

Davis, S. J. M., Valla, F. R. 1978. Evidence for domestication of the dog 12,000 years ago in the Natufian of Israel. Nature. 276. 608-610.

Deguilloux, M. F., Moquel, J., Pemonge, M. H., Colombeau, G. 2008. Ancient DNA supports lineage replacement in European dog gene pool: insight into Neolithic southeast France. Journal of Archaeological Science. 36 (2). 513-519.

Delbridge M. L., Lingenfelter, P. A., Disteche, C. M., Graves, J. A. M. 1999. The candidate spermatogenesis gene RBMY has a homologue on the human X chromosome. Nature Genetics. 22 (3). 223-224.

Delbridge, M. L., Longepied, G., Depetris, D., Mattei, M. G., Disteche, C. M., Graves, J. A. M., Mitchell, M. J. 2004. TSPY, the candidate gonadoblastoma gene on the human Y chromosome, has a widely expressed homologue on the X – implications for Y chromosome evolution. Chromosome Research. 12 (4). 345-356.

Deschênes, S. M., Puck, J. M., Dutra, A. S., Somberg, R. L., Felsburg, P. J., Henthorn, P. S. 1994. Comparative mapping of canine and human proximal Xq and genetic analysis of canine X-linked severe combined immunodeficiency. Genomics. 23 (1). 62-68.

Ding, Z.-L., Oskarsson, M., Ardalan, A., Angleby, H., Dahlgren, L.-G., Tepeli, C., Kirkness, E., Savolainen, P., Zhang, Y.-P. 2012. Origins of domestic dog in Southern East Asia is supported by analysis of Y-chromosome DNA. Heredity. 108. 507-514.

Donnelly, P., Tavaré, S., Balding, D. J., Griffiths, R. C. 1996. Estimating the age of the common ancestor of men from the ZFY intron. Science. 272 (5266). 1357-1359.

Eichmann, C., Berger, B., Steinlechler, M., Parson, W. 2004. Estimating the probability of identity in a random dog population using 15 highly polymorphic canine STR markers. Forensic Science International. 151. 37-44.

Eurogroup for Animals. Dogs and cats in the European Union [online]. 2013 [cit. 2015-04-03]. Dostupné z <http://eurogroupforanimals.org/files/publications/downloads/Dogs_and_cats_in_the_EU.pdf >.

Everts, R. E., van Wolferen, M. E., Versteeg, S. A., Zijlstra, C., Engelen, J. J. M., Bosma A. A., Rothuizen, J., van Oost, B. A. 2002. A radiation hybrid map of the X-chromosome of the dog (*Canis familiaris*). Cytogenetic and Genome Research. 98 (1). 86-92.

FCI. Breeds nomenclature. Fédération Cynologique Internationale [online]. 2015 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z <http://www.fci.be/en/Nomenclature/>.

Felsenstein, J. 1974. The evolutionary advantage of recombination. Genetics. 78 (2). 737-756.

Flagstad, Ø., Walker, C. W., Vilà, C., Sundqvist, A.-K., Fernholm, B., Hufthammer, A. K., Wiig, Ø., Koyola, I., Ellegren, H. 2003. Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. Molecular Ecology. 12 (4). 869-880.

Foster, J. W., Graves, J. A. M. 1994. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91 (5). 1927-1931.

Fridolfsson, A.-K., Cheng, H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Liu, H.-C., Raudsepp, T., Woodage, T., Chowdhary, B., Halverson, J., Ellengren, H. 1998. Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95 (14). 8147-8152.

Frith, M. C., Noé, L. 2014. Improved search heuristics find 20 000 new alignments between human and mouse genomes. Nucleic Acids Research. 42 (7). e59.

Fujinaga, T., Yamashita, M., Yoshida, M. C., Mizuno, S., Tajima, M., Okamoto, Y., Otomo, K. 1989. The banding patterns of normal canine chromosomes. Nihon Juigaku Zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science. 51 (2). 294-299.

Galibert, F., André, C. 2008. The dog: A powerful model for studying genotype-phenotype relationships. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics. 3 (1). 67-77.

Galtier, N. 2004. Recombination, GC-content and the human psedoautosomal boundary paradox. Trends in Genetics. 20 (8). 347-349.

Garzón, F. A. C., Camacho, N. E. M., Sánchez, A. 2012. Sex-determination systems and their evolution: mammals. Acta Biológica Colombiana. 17 (1). 3-18.

Gelaleti, G. B. ,Granzotto, A., Leonel, C., Jardim, B. V., Moschetta, M. G., Carareto, C. M. A., Zuccari, D. A. P. P. C. 2014. Short interspersed CAN SINE elements as prognostic markers in canine mammary neoplasia. Oncology Reports. 31. 435-441.

Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K. C., Burch, P. E., Okwuonu, G., Hines, S., Lewis, L., DeRamo, C., Delgado, O., Dugan-Rocha, S., Miner, G., Morgan, M., Hawes, A., Gill, R., Celera, Holt, R. A., Adams, M. D., Amanatides, P. G., Baden-Tillson, H., Barnstead, M., Chin, S., Evans, C. A., Ferriera, S., Fosler, C., Glodek, A., Gu, Z., Jennings, D., Kraft, C. L., Nguyen, T., Pfannkoch, C. M., Sitter, C., Sutton, G. G., Venter, J. C., Woodage, T., Smith, D., Lee, H. M., Gustafson, E., Cahill, P., Kana, A., Doucette-Stamm, L., Weinstock, K., Fechtel, K., Weiss, R. B., Dunn, D. M., Green, E. D., Blakesley, R. W., Bouffard, G. G., De Jong, P. J., Osoegawa, K., Zhu, B., Marra, M., Schein, J., Bosdet, I., Fjell, C., Jones, S., Krzywinski, M., Mathewson, C., Siddiqui, A., Wye, N., McPherson, J., Zhao, S., Fraser, C. M., Shetty, J., Shatsman, S., Geer, K., Chen, Y., Abramzon, S., Nierman, W. C., Havlak, P. H., Chen, R., Durbin, K. J., Egan, A., Ren, Y., Song, X. Z., Li, B., Liu, Y., Qin, X., Cawley, S., Worley, K. C., Cooney, A. J., D'Souza, L. M., Martin, K., Wu, J. Q., Gonzalez-Garay, M. L., Jackson, A. R., Kalafus, K. J., McLeod, M. P., Milosavljevic, A., Virk, D., Volkov, A., Wheeler, D. A., Zhang, Z., Bailey, J. A., Eichler, E. E., Tuzun, E., Birney, E., Mongin, E., Ureta-Vidal, A., Woodwark, C., Zdobnov, E., Bork, P., Suyama, M., Torrents, D., Alexandersson, M., Trask, B. J., Young, J. M., Huang, H., Wang, H., Xing, H., Daniels, S., Gietzen, D., Schmidt,

J., Stevens, K., Vitt, U., Wingrove, J., Camara, F., Mar Albà, M., Abril, J. F., Guigo, R., Smit, A., Dubchak, I., Rubin, E. M., Couronne, O., Poliakov, A., Hübner, N., Ganten, D., Goesele, C., Hummel, O., Kreitler, T., Lee, Y. A., Monti, J., Schulz, H., Zimdahl, H., Himmelbauer. H., Lehrach. H., Jacob, H. J., Bromberg, S., Gullings-Handley, J., Jensen-Seaman, M. I., Kwitek, A. E., Lazar, J., Pasko, D., Tonellato, P. J., Twigger, S., Ponting, C. P., Duarte, J. M., Rice, S., Goodstadt, L., Beatson, S. A., Emes, R. D., Winter, E. E., Webber, C., Brandt, P., Nyakatura, G., Adetobi, M., Chiaromonte, F., Elnitski, L., Eswara, P., Hardison, R. C., Hou, M., Kolbe, D., Makova, K., Miller, W., Nekrutenko, A., Riemer, C., Schwartz, S., Taylor. J., Yang, S., Zhang, Y., Lindpaintner, K., Andrews, T. D., Caccamo, M., Clamp, M., Clarke, L., Curwen, V., Durbin, R., Eyras, E., Searle, S. M., Cooper, G. M., Batzoglou, S., Brudno, M., Sidow, A., Stone, E. A., Venter, J. C., Payseur, B. A., Bourque, G., López-Otín, C., Puente, X. S., Chakrabarti, K., Chatterji, S., Dewey, C., Pachter, L., Bray, N., Yap. V. B., Caspi, A., Tesler, G., Pevzner, P. A., Haussler, D., Roskin, K. M., Baertsch, R., Clawson, H., Furey, T. S., Hinrichs, A. S., Karolchik, D., Kent, W. J., Rosenbloom, K. R., Trumbower, H., Weirauch, M., Cooper, D. N., Stenson, P. D., Ma, B., Brent, M., Arumugam, M., Shteynberg, D., Copley, R. R., Taylor, M. S., Riethman, H., Mudunuri, U., Peterson, J., Guyer, M., Felsenfeld, A., Old, S., Mockrin, S., Collins. F. 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. Nature. 428 (6982). 493-521.

Godinho, R., Llaneza, L., Blanco, J. C., Lopes, S., Álvares, F., García, E. J., Palacios, V., Cortés, Y., Talegón, J., Ferrand, N. 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. Molecular Ecology. 20 (24). 5154-5166.

Goodwin, G. H., Sanders, C., Johns, E. W. 1973. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. European Journal of Biochemistry. 38 (1). 14-19.

Gordo, I., Charlesworth, B. 2000. The degeneration of asexual haploid populations and the speed of Muller's ratchet. Genetics. 154 (3). 1379-1387.

Gottelli, D., Sillero-Zubiri, C., Applebaum, G. D., Roy, M. S., Girman, D. J., Garcia-Moreno, J., Ostrander, E. A., Wayne, R. K. 1994. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. Molecular Ecology. 3 (4). 301-312.

Grada, A., Weinbrecht, K. 2013. Next-generation sequencing: methodology and application. Journal of Investigative Dermatology. 133. e11.

Graphodatsky, A. S., Yang, F., O'Brien, P. C. M., Serdukova, N., Milne, B. S., Trifonov, V., Ferguson-Smith, M. A. 2000. A comparative chromosome map of the Arctic fox, red fox and dog defined by chromosome painting and high resolution G-banding. Chromosome Research. 8 (3). 253-263.

Graves, J. A. M. 2000. Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis – a feminist view. Biology of Reproduction. 63 (3). 667-676.

Graves, J. A. M. 2006. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. Cell. 124 (5). 901-914.

Graves, J. A. M. 2010. Review: Sex chromosome evolution and the expression of sex-specific genes in the placenta. Placenta. 31. S27-S32.

Graves, J. A. M., Shetty, S. 2001. Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. Journal of Experimental Zoology. 290. 449-462.

Graves, J. A. M., Wakefield, M. J., Toder, R. 1998. The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. Human molecular genetics. 7 (13). 1991-1996.

Greenfield, A., Scott, D., Pennisi, D., Ehrmann, I., Ellis, P., Cooper, L., Simpson, E., Koopman, P. 1996. An H-YDb epitope is encoded by a novel mouse Y chromosome gene. Nature Genetics. 14 (4). 474-478.

Guyon, R., Kirkness, E. F., Lorentzen, T. D., Hitte, C., Comstock, K. E., Quignon, P., Derrien, T., André, C., Fraser, C. M., Galibert, F., Ostrander, E. A. 2003a. Building comparative maps using 1.5x sequence coverage: human chromosome 1p and the canine genome. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 68. 171-177.

Guyon, R., Lorentzen, T. D., Hitte, C., Kim, L., Cadieu, E., Parker, H. G., Quignon, P., Lowe, J. K., Renier, C., Gelfenbeyn, B., Vignaux, F., DeFrance, H. B., Gloux, S., Mahairas, G. G., André, C., Galibert, F., Ostrander, E. A. 2003b. A 1-Mb resolution hybrid map of the canine

genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100 (9). 5296-5301.

Hammer, M. F. 1994. A recent insertion of an alu element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies. Molecular Biology and Evolution. 11 (5). 749-761.

Hill, W. G., Robertson, A. 1966. The effect of linkage on limits to artificial selection. Genetical Research. 8 (3). 269-297.

Hitte, C., Madeoy, J., Kirkness, E. F., Priat, C., Lorentzen, T. D., Senger, F., Thomas, D., Derrien, T., Ramirez, C., Scott, C., Evanno, G., Pullar, B., Cadieu, E., Oza, V., Lourgant, K., Jaffe, D. B., Tacher, S., Dréano, S., Berkova, N., André, C., Deloukas, P., Fraser, C., Lindblad-Toh, K. Ostrander, E. A., Galibert, F. 2005. Falicitating genome navigation: survey sequencing and dense radiation-hybrid gene mapping. Nature Reviews Genetics. 6 (8). 643-648.

Hughes, J. F., Skaletsky, H., Brown, L. G., Pyntikova, T., Graves, T., Fulton, R. S., Dugan, S., Ding, Y., Buhay, C. J., Kremitzki, C., Wang, Q., Shen, H., Holder, M., Villasana, D., Nazareth, L. V., Cree, A., Courtney, L., Veizer, J., Kotkiewicz, H., Cho, T.-J., Koutseva, N., Rozen, S., Muzny, D. M., Warren, W. C., Gibbs, R. A., Wilson, R. K., Page, D. C. 2012. Strict evolutionary conservation followed rapid gene loss on human and rhesus Y chromosomes. Nature. 483 (7387). 82-86.

Hughes, J. F., Skaletsky, H., Pyntikova, T., Graves, T. A., van Daalen S. K., Minx, P. J., Fulton, R. S., McGrath, S. D., Locke, D. P., Friedman, C., Trask, B. J., Mardis, E. R., Warren, W. C., Repping, S., Rozen, S., Wilson, R. K., Page, D. C. 2010. Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. Nature. 463 (7280). 536-539.

Hughes, J. F., Skaletsky, H., Pyntikova, T., Minx, P. J., Graves, T., Rozen, S., Wilson, R. K., Page, D. C. 2005. Conservation of Y-linked genes during human evolution revealed by comparative sequencing in chimpanzee. Nature. 437 (7055). 100-103.

Huse, S. M., Huber, J. A., Morrison, H. G., Sogin, M. L., Welch, D. M. 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. Genome Biology. 8 (7). R143.

Charlesworth, B. 2004. Sex determination: Primitive Y chromosomes in fish. Current Biology. 14 (18). R745-R747.

Charlesworth, B., Charlesworth, D. 2000. The degeneration of Y chromosomes. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 355 (1403). 1563-1572.

Charlesworth, D., Charlesworth, B., Marais, G. 2005. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. Heredity. 95. 118-128.

Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. 2005. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. Nature. 437 (7055). 69-87.

Iacolina, L., Scandura, M., Gazzola, A., Cappai, N., Capitani, C., Mattioli, L., Vercillo, F., Apollonio, M. 2010. Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves: a contribution to the study of wolf-dog hybridization patterns. Mammalian Biology – Zeitschift für Säugetierkunde. 75 (4). 341-347.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. 1990. PCR protocols: a quide to methods and applications. Academic Press. San Diego. p. 482. ISBN: 0-12-372180-6.

Jobling, M. A., Tyler-Smith, C. 2003. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. Nature Reviews Genetics. 4. 598-612.

Kent-First, M. G., Maffitt, M., Muallem, A., Brisco, P., Shultz, J., Ekenberg, S., Agulnik, A. I., Agulnik, I., Shramm, D., Bavister, B., Abdul-Mawgood, A., VandeBerg, J. 1996. Gene sequence and evolutionary conservation of human SMCY. Nature Genetics. 14 (2). 128-129.

Kim, K. S., Lee, S. E., Jeong, H. W., Ha K. H. 1998. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (Canis familiaris) mitochondrial genome. Molecular Phylogenetics and Evolution. 10 (2). 210-220.

King, R. C., Stansfield, W. D., Mulligan, P. K. 2006. A dictionary of genetics (7th edition). Oxford University Press. New York. p. 608. ISBN: 978-0195307610.

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 comparative analysis. Science. 301 (5641). 1898-1903.

Koblmüller, S., Nord, M., Wayne, R. K., Leonard, J. A. 2009. Origin and status of the Great Lakes wolf. Molecular Ecology. 18 (11). 2313-2326.

Koerich, L. B., Wang, X., Clark, A. G., Carvalho, A. B. 2008. Low conservation of gene content in the Drosophila Y chromosome. Nature. 456 (7224). 949-951.

Kuroki, Y., Toyoda, A., Noguchi, H., Taylor, T. D., Itoh, T., Kim, D. S., Kim, D. W., Choi, S. H., Kim, I. C., Choi, H. H., Kim, Y. S., Satta, Y., Saitou, N., Yamada, T., Morishita, S., Hattori, M., Sakaki, Y., Park, H. S., Fujiyama, A. 2006. Comparative analysis of chimpanzee and human Y chromosomes unveils complex evolutionary pathway. Nature Genetics. 38 (2). 158-167.

Lahn, B. T., Page, D. C. 1997. Functional coherence of the human Y chromosome. Science. 278 (5338). 675-680.

Lahn, B. T., Pearson, N. M., Jegalian, K. 2001. The human Y chromosome, in the light of evolution. Nature Reviews. Genetics. 2 (3). 207-216.

Lahr, G., Maxson, S. C., Mayer, A., Just, W., Pilgrim, C., Reisert, I. 1995. Transcription of the Y chromosomal gene, Sry, in adult mouse brain. Brain Research. Molecular Brain Research. 33 (1). 179-182.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng. J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.

A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada ,T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kaspryzk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K,, Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y. J. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 409 (6822). 860-921.

Langford, C. F., Fischer, P. E., Binns, M. M., Holmes, N. G., Carter, N. P. 1996. Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog. Chromosome Research. 4 (2). 115-123.

Leonard, J. A., Wayne, R. K., Wheeler, J., Valadez, R., Guillén, S., Vilà, C. 2002. Ancient DNA evidence for old world origin of new world dogs. Science. 298 (5598). 1613-1616.

Li, G., Davis, B. W., Raudsepp, T., Pearks Wilkerson, A. J., Mason, V. C., Ferguson-Smith, M., O'Brien, P. C., Waters, P. D., Murphy, W. J. 2013. Comparative analysis of mammalian Y

chromosomes illuminates ancestral structure and lineage-specific evolution. Genome Research. 23. 1486-1495.

Li, R., Faraco, J. H., Lin, L., Lin, X., Hinton, L., Rogers, W., Lowe, J. K., Ostrander, E. A., Mignot, E. 2001. Physical and radiation hybrid mapping of canine chromosome 12, in a region corresponding to human chromosome 6p12-q12. Genomics. 73 (3). 299-315.

Lim, K. G., Kwoh, C. K., Hsu, L. Y., Wirawan, A. 2013. Review of tandem repeat search tools: a systematic approach to evaluating algorithmic performance. Briefings in Bioinformatics. 14 (1). 67-81.

Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., deJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.-P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M. J., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C., Lander, E. S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature. 438 (7069). 803-819.

Liu, Z., Moore, P. H., Ma, H., Ackerman, C. M., Ragiba, M., Yu, Q., Pearl, H. M., Kim, M. S., Charlton, J. W., Stiles, J. I., Zee, F. T., Paterson, A. H., Ming, R. 2004. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. Nature. 427. 348-352.

Livernois, A. M., Graves, J. A. M., Waters, P. D. 2012. The origin and evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. Heredity. 108 (1). 50-58.

MacDonald, D. W., Sillero-Zubiri, C. 2004. Biology and conservation of wild Canids. Oxford University Press. New York. p. 465. ISBN: 0198515553.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Goodwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L. I., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J.-B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T.,

Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F., Rothberg, J. M. 2005. Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. Nature. 437 (7057). 376-380.

Marín, I., Baker, B. S. 1998. The evolutionary dynamics of sex determination. Science. 281 (5385). 1990-1994.

Marschall, Y., Distl, O. 2010. Current developments in canine genetics. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift. 123 (7 – 8). 325-338.

Maxam, A. M., Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74 (2). 560-564.

Mayer, A., Lahr, G., Swaab, D. F., Pilgrim, C., Reisert, I. 1998. The Y-chromosomal gene SRY and ZFY are transcribed in adult human brain. Neurogenetics. 1 (4). 281-288.

Mazeyrat, S., Saut, N., Sargent, C. A., Grimmond, S., Longepied, G., Ehrmann, I. E., Ellis, P. S., Greenfield, A., Affara, N. A., Mitchell, M. J. 1998. The mouse Y chromosome interval necessary for spermatogonial proliferation in gene dense with syntenic homology to the human *AZFa* region. Human Molecular Genetics. 7 (11). 1713-1724.

Mellersh, C. S., Hitte, C., Richman, M., Vignaux, F., Priat, C., Jouquand, S., Werner, P., André, C., DeRose, S., Patterson, D. F., Ostrander, E. A., Galibert, F. 2000. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. Mammalian Genome. 11 (2). 120-130.

Mellersh, C. S., Langston, A. A., Acland, G. M., Fleming, M. A., Ray, K., Wiegand, N. A., Francisco, L. V., Gibbs, M., Aguirre, G. D., Ostrander, E. A. 1997. A Linkage Map of the Canine Genome. Genomics. 46 (3). 326-336.

Minnick, M. F., Stillwell, L. C., Heineman, J. M., Stiegler, G. L. 1992. A highly repetitive DNA sequence possibly unique to canids. Gene. 110 (2). 235-238.

Morey, D. F. 2010. Dogs: domestication and the development of a social bond. Cambridge University Press. New York. p. 380. ISBN: 9780521757430.

Morikawa, T., Yamamoto, Y., Miyaishi, S. 2011. A new method for sex determination based on detection of SRY, STS and amelogenin gene regions with simultaneous amplification of their homologous sequences by a multiplex PCR. Acta Medica Okayama. 65 (2). 113-122.

Morrissy, A. S., Morin, R. D., Delaney, A., Zeng, T., McDonald, H., Jones, S., Zhao, Y., Hirst, M., Marra, M. A. 2009. Next-generation tag sequencing for cancer gene expression profiling. Genome Research. 19 (10). 1825-1835.

Muller, H. J. 1914. A gene for the fourth chromosome of Drosophila. Journal of Experimental Zoology. 17 (3). 325-336.

Murphy, W. J., Pearks Wilkerson, A. J., Raudsepp, T., Agarwala, R., Schäffer, A. A., Stanyon, R., Chowdhary, B. P. 2006. Novel gene acquisition on carnivore Y chromosomes. Plos Genetics. 2 (3). 353-363.

Nanda, I., Shan, Z., Schartl, M., Burt, D. W., Koehler, M., Nothwang, H.-G., Grützner, F., Paton, I. R., Windsor, D., Dunn, I., Engel, W., Staeheli, P., Mizuno, S., Haaf, T., Schmid, M. 1999. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. Nature Genetics. 21. 258-259.

Neff, M. W., Broman, K. W., Mellersh, C. S., Ray, K., Acland, G. M., Aguirre, G. D., Ziegle, J. S., Ostrander, E. A., Rine, J. 1999. A Second-Generation Genetic Linkage Map of the Domestic Dog, Canis familiaris. Genetics. 151 (2). 803-820.

Nie, W., Wang, J., Perelman, P., Graphodatsky, A. S., Yang, F. 2003. Comparative chromosome painting defines the karyotypic relationships among the domestic dog, Chinese raccoon dog and Japanese raccoon dog. Chromosome Research. 11 (8). 735-740.

Nobis, G. 1979. Der älteste Haushunde lebte vor 14000 Jahren. Umschau. 79. 610.

Nuwaysir, E. F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J. C., Afshari, C. A. 1999. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. Molecular Carcinogenesis. 24. 153-159.

Nyrén, P. 1987. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. Analytical Biochemistry. 167 (2). 235-238.

Ostrander, E. A., Wayne, R. K. 2005. The canine genome. Genome Research. 15. 1706-1716.

Paegel, B. M., Emrich, E. C., Wedemayer, G. J., Scherer, J. R., Mathies, R. A. 2002. High throughput DNA sequencing with a microfabricated 96-lane capillary array electrophoresis bioprocessor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99 (2). 574-579.

Page, D. C., Mosher, R., Simpson, E. M., Fisher, E. M. C., Mardon, G., Pollack, J., McGillivray, B., de la Chapelle, A., Brown, L. G. 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. Cell. 51 (6). 1091-1104.

Palmer, M. S., Berta, P., Sinclair, A. H., Pym, B., Goodfellow, P. N. 1990. Comparison of human ZFY and ZFX transcripts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 87 (5). 1681-1685.

Palmer, M. S., Sinclair, A. H., Berta, P., Ellis, N. A., Goodfellow, P. N., Abbas, N. E., Fellous, M. 1989. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. Nature. 342 (6252). 937-939.

Pang, J.-F., Kluetsch, C., Zou, X.-J., Zhang, A.-b., Luo, L.-Y., Angleby, H., Ardalan, A., Ekström, C., Sköllermo, A., Lundeberg, J., Matsumura, S., Leitner, T., Zhang, Y.-P., Savolainen, P. 2009. MtDNA data indicate a single origin for dogs South of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. Molecular Biology and Evolution. 26 (12). 2849-2864.

Parker, H. G., Kim, L. V., Sutter, N. B., Carlson, S., Lorentzen, T. D., Malek, T. B., Johnson, G. S., DeFrance, H. B., Ostrander, E. A., Kruglyak, L. 2004. Genetic strucure of the purebred domestic dog. Science. 304 (5674). 1160-1164.

Pask, A., Renfree, M. B., Graves, J. A. M. 2000. The human sex-reversing ATRX gene has a homologue on the marsupial Y chromosome, ATRY: implications for the evolution of mammalian sex determination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97 (24). 13198-13202.

Pilot, M., Greco, C., vonHoldt, B. M., Jędrzejewska, B., Randi, E., Jędrzejewski, W., Sidorovich, V. E., Ostrander, E. A., Wayne, R. K. 2014. Genome-wide signatures of population bottlenecks and diversifying selection in Europe wolves. Heredity. 112. 428-442.

Pontius, J. U., Mullikin, J. C., Smith, D. R., Lindblad-Toh, K., Gnerre, S., Clamp, M., Chang, J., Stephens, R., Neelam, B., Volfovsky, N., Schaffer, A. A., Agarwala, R., Narfstrom, K., Murphy, W. J., Giger, U., Roca, A. L., Antunes, A., Menotti-Raymond, M., Yuhki, N., Pecon-Slattery, J., Johnson, W. E., Bourque, G., Tesler, G., O'Brien, S. J. 2007. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. Genome Research. 17 (11). 1675-1689.

Priat, C., Hitte, C., Vignaux, F., Renier, C., Jiang, Z., Jouquand, S., Chéron, A., André, C., Galibert, F. 1998. A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. Genomics. 54 (3). 361-378.

Raudsepp, T., Das, P. J., Avila, F., Chowdhary, B. P. 2012. The pseudoautosomal region and sex chromosome aneuploidies in domestic species. Sexual Development. 6 (1-3). 72-83.

Raudsepp, T., Chowdhary, B. P. 2008. The horse pseudoautosomal region (PAR): characterization and comparison with the human, chimp and mouse PARs. Cytogenetic and genome research. 121 (2). 102-109.

Rice, W. R. 1987. The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex-chromosomes. Evolution. 41. 911-914.

Rice, W. R. 1996. Evolution of the Y sex chromosome in animals. BioScience. 46 (5). 331-343.

Richard, G.-F., Kerrest, A., Dujon, B. 2008. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in Eukaryotes. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 72 (4). 686-727.

Roy, M. S., Geffen, E., Smith, D., Wayne, R. K. 1996. Molecular genetics of pre-1940 red wolves. Conservation Biology. 10 (5). 1413-1424.

Rutledge, L. Y., Garroway, C. J., Loveless, K. M., Patterson, B. R. 2010. Genetic differentiation of eastern wolves in Algonquin Park despite bridging gene flow between coyotes and grey wolves. Heredity. 105. 520-531.

Sablin, M., Khlopachev, G. A. 2002. The earliest ice age dogs: evidence from Eliseevichi. Current Anthropology. 43 (5). 795-799.

Sacks, B. N., Brown, S. K., Stephens, D., Pedersen, N. C., Wu, J.-T., Berry, O. 2013. Y chromosome analysis of dingoes and Southeast Asian village dogs suggests a Neolithic continental expansion from Southeast Asia followed by multiple Austronesian dispersals. Molecular Biology and Evolution. 30 (5). 1103-1118.

Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M., Stein, L. D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J. C., Mortimore, B. J., Willey, D. L., Hunt, S. E., Cole, C. G., Coggill, P. C., Rice, C. M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D. R., Kwok, P.-Y., Mardis, E. R., Yeh, R. T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R. H., McPherson, J. D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W. J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M. J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M. C., Linton, L., Lander, E. S., Altshuler, D. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1,42 million single nucleotide polymorphism. Nature. 409 (6822). 928-933.

Salisbury, B. A., Pungliya, M., Choi, J. Y., Jiang, R., Sun, X. J., Stephens, J. C. 2003. SNP and haplotype variation in the human genome. Mutation Research. 526 (1-2). 53-61.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74 (12). 5463-5467.

Savolainen, P., Zhang, Y.-p., Luo, J., Lundeberg, J., Leitner, T. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. Science. 298 (5598). 1610-1613.

Scott, D. M., Ehrmann, I. E., Ellis, P. S., Bishop, C. E., Agulnik, A. I., Simpson, E., Mitchell, M. J. 1995. Identification of a mouse male-specific transplantation antigen, H-Y. Nature. 376 (6542). 695-698.

Selden, J. R., Moorhead, P. S., Oehlert, M. L., Patterson, D. F. 1975. The Giemsa banding pattern of the canine karyotype. Cytogenetics and Cell Genetics. 15. 380-387.

Shen, P., Wang, F., Underhill, P. A., Franco, C., Yang, W.-H., Roxas, A., Sung, R., Lin, A. A., Hyman, R. W., Vollrath, D., Davis, R. W., Cavalli-Sforza, L. L., Oefner, P. J. 2000. Population genetics implications from sequence variation in four Y chromosome genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97 (13). 7354-7359.

Shendure, J., Ji, H. 2008. Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnology. 26. 1135-1145.

Sidjanin, D. J., Lowe, J. K., McElwee, J. L., Milne, B. S., Phippen, T. M., Sargan, D. R., Aguirre, G. D., Acland, G. M., Ostrander, E. A. 2002. Canine *CNGB3* mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus *ACHM3*. Human Molecular Genetics. 11 (16). 1823-1833.

Sinclair, A. H., Berta, P., Plamer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P. N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature. 346 (6281). 240-244.

Sinclair, A. H., Foster, J. W., Spencer, J. A., Page, D. C., Palmer, M., Goodfellow, P. N., Graves, J. A. 1988. Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. Nature. 336 (6201). 780-783.

Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S. F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfing, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S. P., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Rozen, S., Page, D. C. 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature. 423 (6942). 825-837.

Steinemann, M., Steinemann, S. 1998. Enigma of Y chromosome degenaretion: neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosomes evolution. Genetica. 102-103 (1-6). 409-420.

Steinemann, M., Steinemann, S. 2005. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. Cytogenetic and Genome Research. 110 (1-4). 134-143.

Su, Z., Ning, B., Fang, H., Hong, H., Perkins, R., Tong, W., Shi, L. 2011. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. Expert Review of Molecular Diagnostics. 3 (11). 333-343.

Sundqvist, A.-K., Björnerfeldt, S., Leonard, J. A., Hailer, F., Hedhammar, Å, Ellegren, H., Vilà, C. 2006. Unequal contribution of sexes in the origin of dog breeds. Genetics. 172 (2). 1121-1128.

Sundqvist, A.-K., Ellegren, H., Olivier, M., Vilà, C. 2001. Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. Molecular Ecology. 10 (8). 1959-1966.

Switoński, M., Reimann, N., Bosma, A. A., Long, S., Bartnitzke, S., Pieńkowska, A., Moreno-Milan, M. M., Fischer, P. 1996. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. Chromosome Research. 4 (4). 306-309.

Thalmann, O., Shapiro, B., Cui, P., Schuenemann, V. J., Sawyer, S. K., Greenfield, L. D., Germonpré, M. B., Sablin, M. V., López-Giráldez, F., Domingo-Roura, X., Napierala, H., Uerpmann, H.-P., Loponte, D. M., Acosta, A. A., Giemsch, L., Schmitz, R. W., Wortington, B., Buikstra, J. E., Druzhkova, A., Graphodatsky, A. S., Ovodov, N. D., Wahlberg, N., Freedman, A. H., Schweizer, R. M., Koepfli, K.-P., Leonard, J. A., Meyer, M., Krause, J., Pääbo, S., Green, R. E., Wayne, R. K. 2013. Complete mitochondrial genomes of ancient Canids suggest a European origin of domestic dogs. Science. 342. 871-874.

Thomas, R., Breen, M., Deloukas, P., Holmes, N. G., Binns, M. M. 2001. An integrated cytogenetic, radiation-hybrid, and comparative map of the dog chromosome 5. Mammalian genome. 12 (5). 371-375.

Tchernov, E. 1997. Two new dogs, and other Natufian dogs, from the southern Levant. Journal of Archaeological Science. 24 (1). 65-95.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco,

V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigó, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz. B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen. M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., Zhu X. 2001. The sequence of the human genome. Science. 291 (5507). 1304-1351.

Vicoso, B., Charlesworth, B. 2006. Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. Nature Reviews Genetics. 7. 645-653.

Vignaux, F., Hitte, C., Priat, C., Chuat, J.-C., Andre, C., Galibert, F. 1999. Construction and optimization of a dog whole-genome radiation hybrid panel. Mammalian Genome. 10 (9). 888-894.

Vigne, J.-D. 2005. L'humérus de chien magdalénien de Erralla (Gipuzkoa, Espagne) et la domestication tardiglaciaire du loupe en Europe. Munibe Antropologia-Arkeologia. 57. 279-287.

Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R., Rice, J. E., Honeycutt, R. L., Crandall, K. A., Lundeberg, J., Wayne, R. K. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. Science. 276 (5319). 1687-1689.

Vilà, C., Walker, C., Sundqvist, A. K., Flagstad, Ø., Andersone, Z., Casulli, A., Kojola, I., Valdmann, H., Halverson, J., Ellengren, H. 2003. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. Heredity. 90. 17-24.

Vinciotti, V., Khanin, R., D'Alimonte, D., Liu, X., Cattini, N., Hotchkiss, G., Bucca, G., de Jesus, O., Rasaiyaah, J., Smith, C. P., Kellam, P., Wit, E. 2005. An experimental evaluation of a loop versus a reference design for two-channel microarrays. Bioinformatics. 21 (4). 492-501.

vonHoldt, B. M, Pollinger, J. P, Lohmueller, K. E., Han, E., Parker, H. G., Quignon, P., Degenhardt, J. D., Boyko, A. R., Earl, D. A., Auton, A., Reynolds, A., Bryc, K., Brisbin, A., Knowles, J. C., Mosher, D. S., Spady, T. C., Elkahloun, A., Geffen, E., Pilot, M., Jedrzejewski, W., Greco, C., Randi E., Bannasch, D., Wilton, A., Shearman, J., Musiani, M., Cargill, M., Jones, P. G., Qian, Z., Huang, W., Ding, Z.-L., Zhang, Y.-p., Bustamante, C. D., Ostrander, E. A., Novembre, J., Wayne, R. K. 2010. Genome - wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. Nature. 464 (7290). 898-902.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research. 23 (21). 4407-4414.

Wade, C. M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Imsland, F., Lear, T. L., Adelson, D. L., Bailey, E., Bellone, R. R., Blöcker, H., Distl, E., Edgar, R. C., Garber, M., Leeb, T., Mauceli, E., MacLeod, J. N., Penedo, M. C. T., Raison, J. M., Sharpe, T., Vogel, J., Andersson, L., Antczak, D. F., Biagi, T., Binns, M. M., Chowdhary, B. P., Coleman, S. J., Della

Valle, G., Fryc, S., Guérin, G., Hasegawa, T., Hill, E. W., Jurka, J., Kiialainen, A., Lindgren, G., Liu, J., Magnani, E., Mickelson, J. R., Murray, J., Nergadze, S. G., Onofrio, R., Pedroni, S., Piras, M. F., Raudsepp, T., Rocchi, M., Røed, K. H., Ryder, O. A., Searle, S., Skow, L., Swinburne, J. E., Syvänen, A. C., Tozaki, T., Valberg, S. J., Vaudin, M., White, J. R., Zody, M. C., Lander, E. S., Lindblad-Toh, K. 2009. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. Science. 326 (5954). 865-867.

Wang, G.-D., Xie, H.-B., Peng, M.-S., Irwin, D., Zhang, Y.-P. 2013. Domestication genomics: evidence from animals. Annual Review of Animal Biosciences. 2. 65-84.

Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F. S., Cook, L. L., Copley, R. R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K. D., Deri, J., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Dickens, N. J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D. M., Eddy, S. R., Elnitski, L., Emes, R. D., Eswara, P., Eyras, E., Felsenfeld, A., Fewell, G. A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W. N., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Furey, T. S., Gage, D., Gibbs, R. A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T. A., Green, E. D., Gregory, S., Guigó, R., Guyer, M., Hardison, R. C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L. W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D. B., Johnson, L. S., Jones, M., Jones, T. A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E. K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W. J., Kirby, A., Kolbe ,D. L., Korf, I., Kucherlapati, R. S., Kulbokas, E. J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J. P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D. R., Mardis, E. R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J. H., McCarthy, M., McCombie, W. R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J. D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J. P., Miller, W., Miner, T. L., Mongin, E., Montgomery, K. T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J. C., Muzny, D. M., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor ,M. J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K. H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C. S., Poliakov, A., Ponce, T. C., Ponting, C. P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B. A., Roskin, K. M., Rubin, E.

M., Rust, A. G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M. S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J. B., Slater, G., Smit, A., Smith, D. R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J. P., Von Niederhausern, A. C., Wade, C. M., Wall, M., Weber, R. J., Weiss, R. B., Wendl, M. C., West, A. P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R. K., Winter, E., Worley, K. C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S. P., Zdobnov, E. M., Zody, M. C., Lander, E. S. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature. 420 (6915). 520-562.

Wayne, R. K. 1993. Molecular evolution of the dog family. Trends in Genetics. 9 (6). 218-224.

Wayne, R. K., Geffen, E., Derek, J. G., Koepfli, K. P., Lau, L. M., Marshall, C. R. 1997. Molecular systematics of the Canidae. Systematic Biology. 46 (4). 622-653.

Wilhelm, D., Koopman, P. 2006. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. Nature Reviews Genetics. 7. 620-631.

Wilson, D. E., Reeder, D. M. 2005. Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference (3rd ed). The Johns Hopkins University Press. p. 2142. ISBN: 0801882214.

Wilson, P. J., Grewal, S., Lawford, I. D., Heal, J. N. M., Granacki, A. G., Pennock, D., Theberge, J. B., Theberge, M. T., Voigt, D. R., Waddell, W. 2000. DNA profiles of the eastern Canadian wolf and the red wolf provide evidence for a common evolutionary history independent of the gray wolf. Canadian Journal of Zoology. 78 (12). 2156-2166.

Wong, A. K., Ruhe, A. L., Dumont, B. L., Robertson, K. R., Guerrero, G., Shull, S. M., Ziegle, J. S., Millon, L. V., Broman, K. W., Payseur, B. A., Neff, M. W. 2010. A comprehensive linkage map of the dog genome. Genetics. 184 (2). 595-605.

Yang, F., O'Brien, P. C., Milne, B. S., Graphodatsky, A. S., Solanky, N., Trifonov, V., Rens, W., Sargan, D., Ferguson-Smith, M. A. 1999. A compete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetics maps. Genomics. 62 (2). 189-202.

Young, A. C., Kirkness, E. F., Breen, M. 2008. Tackling the characterization of canine chromosomal breakpoints with an integrated in-situ/in-silico approach: the canine PAR and PAB. Chromosome Research. 16 (8). 1193-1202.

Zvárová, J. 2012. Biomedicínská informatika V. Metody molekulární biologie a bioinformatiky. Karolinum. Praha. 344 s. ISBN: 978-80-246-2150-0.