

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Genetické profilování pomocí STR markerů u psovitých
šelem
Bakalářská práce**

Autor práce: Polina Tolkachova

Obor studia: Kynologie

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

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Genetické profilování pomocí STR markerů u 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17.07.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jakubu Vaškovi, Ph.D. za věnovaný čas a cenné odborné rady při vedení mé bakalářské práce.

Genetické profilování pomocí STR markerů u psovitých šelem

Souhrn

Bakalářská práce se zaměřila na shromáždění a zpracování dostupných literárních zdrojů k problematice související s genetickým profilováním pomocí STR markerů u psovitých šelem (*Canidae*). Byla stručně popsána čeleď psovitých šelem z hlediska taxonomického zařazení, anatomicko-morfologických vlastností a evoluce studovaného taxonu. Zvláštní pozornost byla věnována dvěma zástupcům této čeledi, a sice psu domácím (*Canis lupus familiaris*) a vlku obecnému (*Canis lupus*), jelikož především pro ně jsou STR profilovací systémy vyvíjeny. K získání uceleného přehledu o aktuálním pokroku v genetice psů byly rovněž shrnuty poznatky o průběhu a možných příčinách domestikace psa a výzkumu jeho genomu.

Jako modelový organismus se pes hojně používá v řadě genetických a populačních studií díky své unikátní genetické variabilitě a vnitrodruhové rozmanitosti. Kompletně mapování psiho genomu umožnilo se zaměřit na výzkum některých dědičných onemocnění společných pro člověka a psy. Kromě toho kompletní osekvenování psiho genomu umožnilo sestavit podrobný fylogenetický strom psovitých šelem, na základě čehož byla posouzena variabilita tohoto taxonu. Jsou známy různé metody jak provádět genetické studie u psa. Jednou z takových možností je genetické profilování pomocí STR markerů neboli mikrosatelitů.

Předkládaná práce začíná historií objevu tandemových repetitivních v podobě tzv. satelitní DNA, ke kterému došlo před více než padesáti lety. Postupem času byly objeveny a klasifikovány různé typy repetitivní DNA počínaje větší satelitní DNA až po menší mini- a mikrosatelitní DNA. Dále byly vysvětleny příčiny problémů spojených s pokusy o jednocení nomenklatury mikrosatelitů, popsány mechanismy a možné následky jejich mutací. STR jsou považovány za nejvhodnější genetické markery právě díky tomu, že jsou velice polymorfní, což vyplývá z vysoké frekvence mutací.

Rovněž byly popsány metody odběru vzorků (invazivní a neinvazivní) pro úspěšnou izolaci DNA a následnou amplifikaci mikrosatelitů. Byly popsány techniky (PCR, elektroforéza a jejich modifikace), které se využívají v analýze mikrosatelitních markerů.

Klíčová slova: mikrosatelity, genetické profilování, STR, *Canis lupus*, *Canis lupus familiaris*

Genetic profiling of canidae species by STR markers

Summary

This bachelor's thesis is dedicated to the collection and review of available literature on genetic profiling using STR markers in canines (*Canidae*). The canine family has been briefly described in terms of taxonomic classification, anatomical and morphological properties, and the evolution of the taxon under study. Particular attention has been paid to two representatives of this family, namely the domesticated dog (*Canis lupus familiaris*) and the common wolf (*Canis lupus*) since STR profiling systems are mainly developed for them. To have a comprehensive overview of up-to-date progress made in studying canine genetics, knowledge about the course and possible causes of domestication of a dog and its genome studies have also been generalized.

As a model organism, the dog is widely used in many genetic and population studies because of its unique genetic variation and intraspecific diversity. A complete mapping of the canine genome allowed us to focus on studying some inherited diseases common to humans and dogs. Besides, the fully sequenced dog's genome made it possible to collect a detailed phylogenetic canine tree, which served as the basis for assessment of the variability of this taxon. Various methods are known for conducting genetic studies of a dog's genome. One of these methods is genetic profiling using STR markers or microsatellites.

In this paper, microsatellites (short tandem repeats in DNA) were studied starting with the point of satellite DNA discovery, which occurred more than 50 years ago. During this time, various variants of repeating DNA were gradually identified and classified – from larger satellite DNA to smaller mini- and microsatellites. The causes of the problem in compiling a unified STR nomenclature were also considered and explained, the mechanisms and possible consequences of their mutations were described. STR are considered to be the most suitable genetic markers because they have pronounced polymorphism and a high mutation rate.

In addition, methods (invasive and non-invasive) of material sampling for successful DNA isolation and subsequent amplification of microsatellites have been listed. A overview of methods (PCR, electrophoresis, and their modifications) used in the assays of microsatellite markers has been compiled.

Keywords: microsatellites, genetic profiling, STR, *Canis lupus*, *Canis lupus familiaris*

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíl práce.....	9
3	Literární rešerše.....	10
3.1	Psovité šelmy.....	10
3.1.1	Taxonomie	10
3.1.2	Popis psovitých šelem.....	12
3.1.2.1	Popis těla, lebky a končetin	12
3.1.2.2	Zubní vzorec.....	13
3.1.3	Evoluce.....	14
3.1.4	Domestikace	15
3.1.5	Genetika psa domácího	17
3.1.5.1	Genom psa.....	18
3.2	Mikrosatelity	19
3.2.1	Úvod.....	19
3.2.2	Klasifikace opakujících se DNA sekvencí.....	20
3.2.2.1	Klasifikace mikrosatelitů	20
3.2.2.2	Nomenklatura mikrosatelitů.....	21
3.2.2.3	Historie objevu.....	21
3.2.3	Funkce.....	22
3.2.4	Mutační mechanismy	23
3.2.4.1	Replikační sklouznutí	23
3.2.4.2	Rekombinace	24
3.2.4.3	Možné následky mutace	24
3.2.5	Využití mikrosatelitů	26
3.3	Metody.....	27
3.3.1	Odběr vzorků	27
3.3.1.1	Invazivní metody odběru	27
3.3.1.2	Neinvazivní metody odběru.....	27
3.3.1.3	Izolace DNA.....	27
3.3.2	PCR.....	29
3.3.2.1	Popis metody	29
3.3.2.2	Varianty PCR	30
3.3.2.3	Výhody a nevýhody PCR	31

3.3.2.4	Využití PCR.....	31
3.3.3	Elektroforéza.....	32
3.3.3.1	Základní princip	32
3.3.3.2	Agarosová a polyakrylamidová elektroforéza.....	32
3.3.3.3	Kapilární elektroforéza.....	33
3.4	Využití STR markerů pro analýzu DNA u psů a vlků	35
3.4.1	Forenzní genetik.....	35
3.4.1.1	Identifikace.....	35
3.4.1.2	Kriminalistika	35
3.4.2	Populační genetik.....	38
3.4.3	Chovatelství	39
4	Závěr	40
5	Literatura.....	41

1 Úvod

Pes žije s člověkem již mnoho desítek tisíc let. Dnes je to jeden z nejrozšířenějších druhů domácích zvířat ve světě, kdy jeho celkový počet na planetě činí více než 500 milionů jedinců. K tomu aby se pes změnil z divokého vlka na nejlepšího přítele člověka, vedla dlouhá cesta za pomoci umělé selekce. Tato selekce a unikátní genetická plasticita vedly ke vzniku více než 400 plemen uznávaných FCI, což činí psa zvířetem s největší fenotypovou variabilitou. Na druhou stranu má tato selekce i negativní dopad v podobě relativně častého výskytu různých dědičných onemocnění. Díky své genetické variabilitě pes stal modelovým organismem pro obrovský počet genetických, medicínských a populačních studií, ve kterých je hlavní důraz kladen na mikrosatelitní markery psa.

Mikrosatelity (STR, SSR) jsou krátká tandemová opakování o délce 1 až 6 bp. Za krátkou dobu od počátku jejich objevu v 80. letech bylo zjištěno, že se nacházejí v hojném počtu ve všech studovaných organismech, podléhají rychlým mutacím, a tedy vykazují vysoký stupeň polymorfismu. Díky svým vlastnostem a snadné amplifikovatelnosti lokusů pomocí PCR jsou mikrosatelity vhodnými markery pro hodnocení genetické struktury populace, určení parentity, forenzní analýzu, genetické mapování a studium molekulární evoluce.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo sepsání strukturovaného textu zabývajícího se problematikou genetického profilování u psovitých šelem. Jednotlivé cíle práce odrážejí náplň příslušných kapitol zaměřených na taxonomii psovitých šelem, problematiku molekulárně genetických markerů, zejména mikrosatelitních, a laboratorních technik (izolace DNA z různých biologických materiálů, PCR, elektroforéza) potřebných k získání genetických profilů. Poslední kapitola navíc ukazuje reálné příklady uplatnění těchto profilovacích systémů v různých oblastech lidské činnosti.

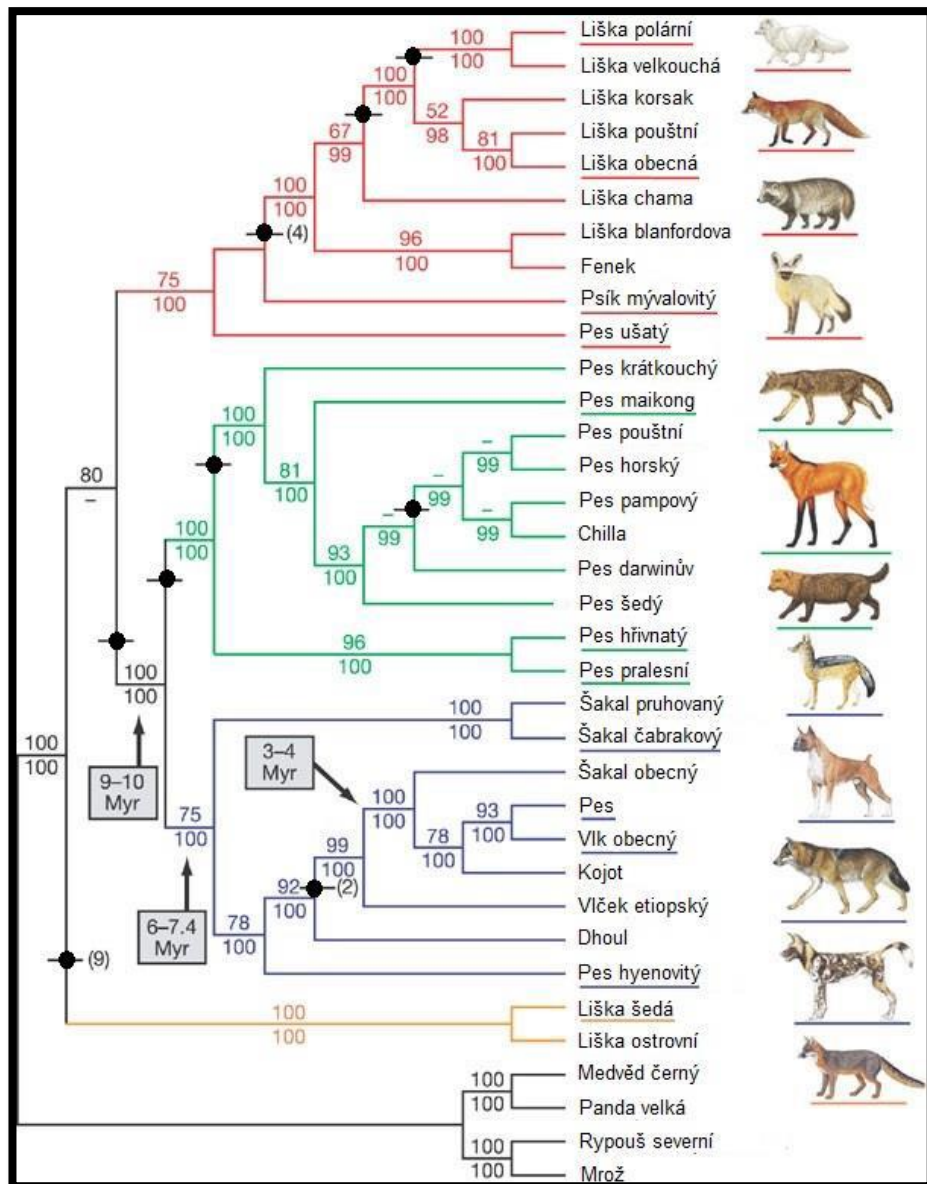
3 Literární rešerše

3.1 Psovité šelmy

3.1.1 Taxonomie

Čeď psovití (*Canidae*), řád šelmy (*Carnivora*), třída savci (*Mammalia*), kmen strunatci (*Chordata*), říše živočichové (*Animalia*).

Psovití jsou skupinou kosmopolitně rozšířených dravých savců, jichž existuje kolem 13 rodů (Byčkov 2017). K nejvýznamnějším patří rod *Canis*, ze kterého pocházejí takové druhy jako je vlk obecný (*Canis lupus*), šakal obecný (*Canis aureus*), šakal pruhovaný (*Canis adustus*), kojot préríjní (*Canis latrans*) a nyní vymřelý pravlk obrovský (*Canis dirus*). Dalšími rozšířenými rody jsou rod *Vulpes* a rod *Urocyon*, které představují různé druhy lišek (Lyras & Van Der Geer 2003). Naopak málo početným je rod *Otocyon*, který obsahuje jenom jeden druh, a sice psa ušatého (*Otocyon megalotis*) (Clark 2005). Zajímavým je také rod *Lycalopex*, který zahrnuje druhy považované za tzv. *Pseudalopex* – „falešné lišky“ (Jimenez 2005) a další rody. Během genetických studií bylo zjištěno, že čeď psovitých šelem je rozdělena na tři fylogenetická uskupení, a sice formy vlkovité, liškovité a jihoamerické liškovité (Wayne et al. 1997).



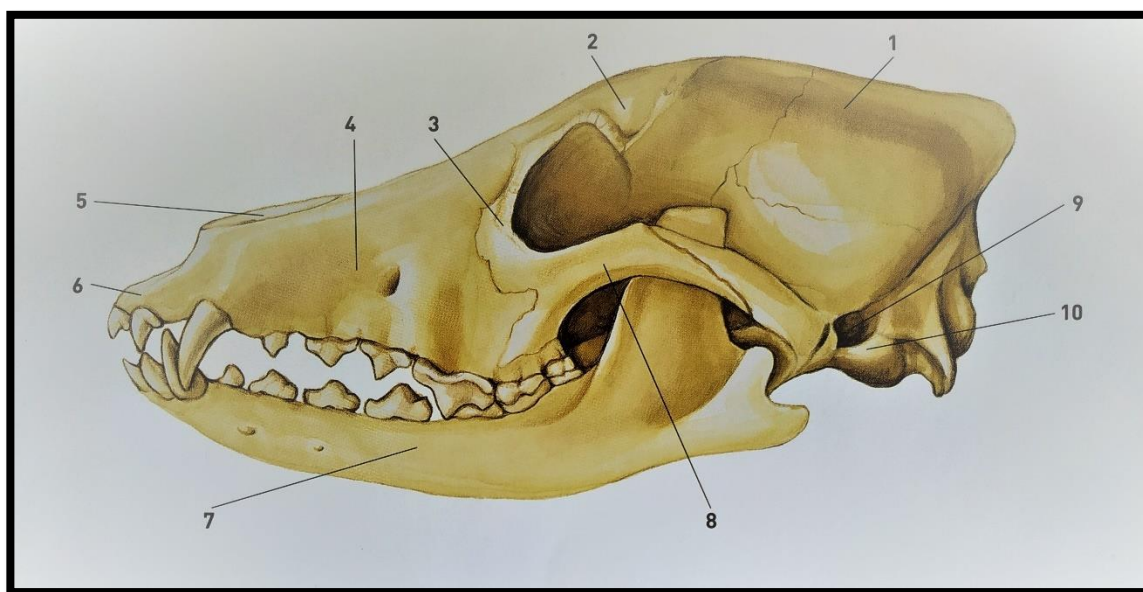
Obr.1: Fylogenetický strom řady šelem (*Carnivora*) je vytvořen na základě sekvenční 15 kb exonů a intronů dle Lindblad-Toh et al. (2005), kdy je zvláště detailně popsána čeleď psovitých (*Canidae*). Strom je rozdělen na 5 základních linií, které jsou označeny různými barvami: podřád ploutvonožci (*Pinnipedia*) a čeleď medvědovití (*Ursidae*) (černá), rod ostrovních lišek (*Urocyon*) (oranžová), rod vlkovitých (*Canis*) (modrá), jihoamerické liškovité (*Lycalopex*, *Atelocynus*, *Chrysocyon*, *Cerdocyon* atd.) (zelená), liškovité formy (*Vulpes*, *Otocyon*, *Nyctereutes*) (červená). Horizontálně podtržené názvy druhů jsou prezentovány s odpovídajícími ilustracemi. Horní indexy vyjadřují bootstrapové hodnoty (pomlčky označují, že hodnoty jsou menší než 50 %) a dolní indexy bayesovské hodnoty posteriorní pravděpodobnosti (pomlčky označují, že hodnoty jsou menší než 95 %).

3.1.2 Popis psovitých šelem

3.1.2.1 Popis těla, lebky a končetin

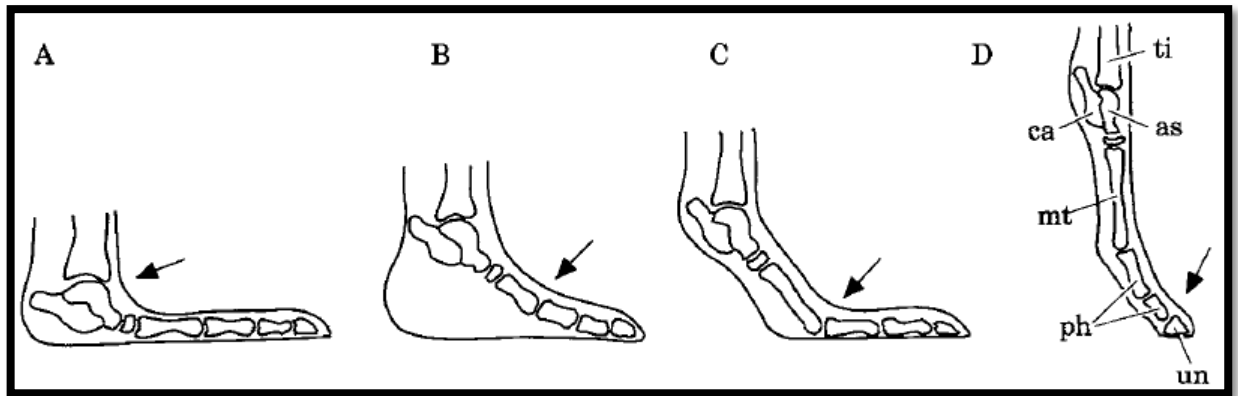
Zástupci čeledi *Canidae* dosahují středních až velkých rozměrů. Jejich štíhlé a svalnaté tělo u různých druhů může dosahovat délky 18 až 160 cm. Výška v kohoutku se pohybuje v rozmezí 20 až 85 cm (Cope 1879).

Obličejová část lebky (*Splanchnocranium*) je protažená a úzká, je delší než mozková část lebky (*Neurocranium*). Uši jsou obvykle ostrého tvaru a jsou umístěny poměrně vysoko. Jejich délka je střední až velmi dlouhá (delší než hlava), výjimkou mohou být krátké uši se zaobleným vrcholem. Díky specifické stavbě lebky mají psovité šelmy nejlepší čich ze všech savců (Nanova 2009).



Obr.2: Lebka psa domácího při pohledu ze strany (laterálně) dle Suchlý et al. (2015). 1 – temenní kost (*os parietale*), 2 – čelní kost (*os frontale*), 3 – slzní kost (*os lacrimale*), 4 – horní čelist (*maxilla*), 5 – nosní kost (*os nasale*), 6 – řezáková kost (*os incisivum*), 7 – dolní čelist (*mandibula*), 8 – jařmová kost (*os zygomaticum*), 9 – ústí zevního zvukovodu (*meatus acusticus externus*), 10 – spánková kost (*os temporale*).

Končetiny psovitých šelem jsou dlouhé a štíhlé, a proto jsou dobře přizpůsobené pro dlouhý a rychlý běh (Stuchlý 2015). Šelmy patří mezi prstochodce, což znamená že mají digitigrádní typ chůze. Na předních končetinách mají 5 prstů, přičemž palec je rudimentární, na zadních končetinách mají pouze 4 prsty. Nicméně některá plemena psů a vlci (Ciucci et al. 2011) mají na pánevních končetinách paspárky (*digitus primus*), což jsou vlastně evoluční pozůstatky palce (Park et al. 2004). Rovněž existují plemena psů s dvojitými paspárky, které jsou plemenným znakem. Mezi tato plemena patří například beauceron, pyrenejský mastin a pyrenejský ovčák. Drápy na končetinách psovitých jsou silné, tupé a nezatažitelné (Park et al. 2004).



Obr. 3: Poloha chodidla u různých druhů savců dle Carrano (1996). Pohled ze strany. Šipky ukazují na hlavní kloub ohybu stopy. (A) – plantigrádní typ, (B) – subunguligrádní typ, (C) – digitigrádní typ, (D) – unguligrádní typ. Zkratky: as = hlezenní kost (*astragalus*); ca = patní kost (*calcaneum*); ti = holenní kost (*tibia*); mt = nártní kost (*metatarsals*); ph = kosti prstů (*phalanges*); un = poslední článek modifikovaného prstu (*unguals*).

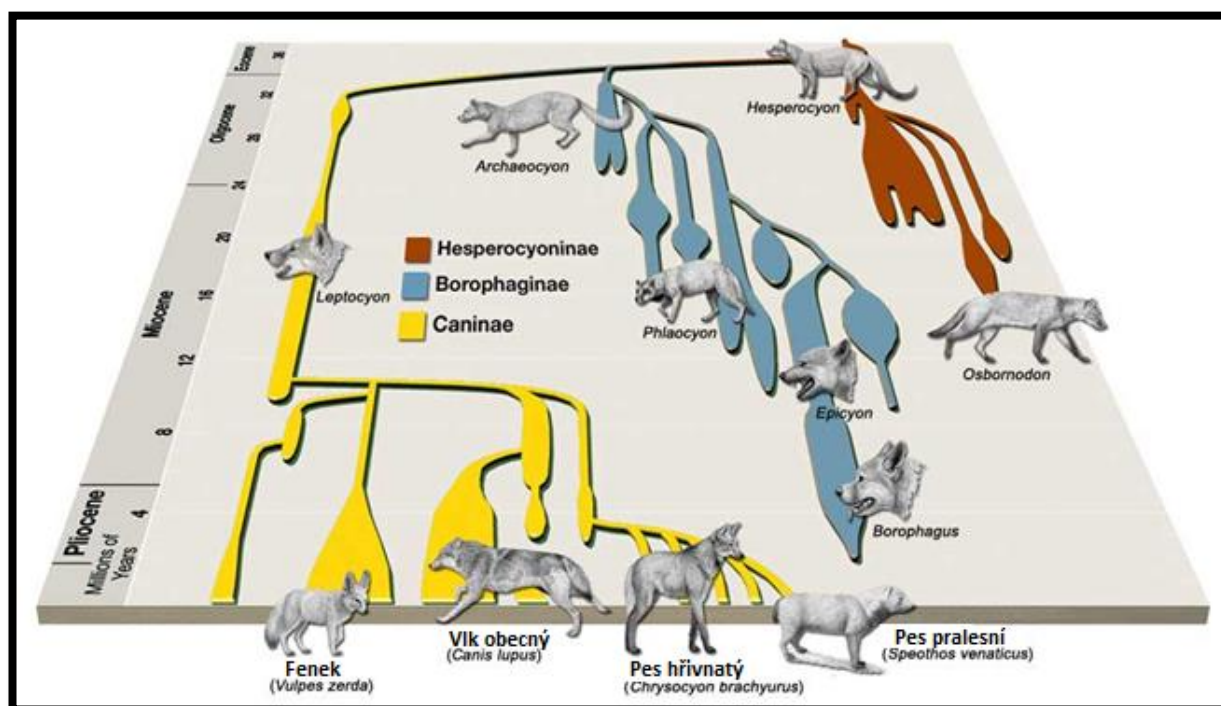
3.1.2.2 Zubní vzorec

Většina druhů psovitých šelem má 42 zubů (Hough 1948). Nejmenší počet (38-40) má pes pralesní (*Speothos venaticus*) (de Mello Beisiegel & Zuercher 2005), největší množství (až 50) má pes ušatý (*Otocyon megalotis*) (Clark 2005). Řezáky se výrazně zvětšují od prvního k třetímu. Pomocí těchto řezáků pečují psovitě šelmy o svou srst, odstraňují parazity a odhryzávají zbytky masa z kostí (Stuchlý 2015). Dlouhé špičáky jsou silně vyvinuté, slouží k zakousnutí kořisti a roztrhání velkých kusů masa. Třenové zuby a stoličky (horní P4 a dolní M1) se nazývají trhákovým komplexem (*dentes sectorii*), jsou velmi ostré a proti sobě postavené tak, že fungují jako nůžky. Tento komplex je používán ke krájení kusů masa a drcení kostí a je typickým morfologickým znakem této čeledi (Stuchlý 2015).

3.1.3 Evoluce

Pravděpodobně prvními společnými předky současných šelem byli primitivní draví savci z čeledi *Miacidae*, kteří žili na území současné Severní Ameriky a vznikli v Paleocénu. Tato zvířata byla podobná současným kunám, měli malé tělo a dlouhý ocas. Různé druhy žily buď na zemi nebo na stromech. Živily se bezobratlými živočichy, ještěrkami, hmyzem, ptáky a malými savci (Heinrich et al. 2008).

Dosud není přesně známo kdy se řád Carnivora rozdělil na podřády psotvární (*Caniformia*) a kočkotvární (*Feliformia*). Předpokládá se, že se to stalo v době před 55–50 mil. let př.n.l. (Wang & Tedford 2008). Za prvního prapředka čeledi *Canidae* je považován *Prohesperocyon wilsoni*, jehož pozůstatky byly nalezeny v jihozápadním Texasu a jsou datovány do doby zhruba 40 mil. let př.n.l. Přibližně v raném Oligocénu byla čeleď *Canidae* rozdělena na 3 podčeledi: *Hesperocyoninae* (fosilní), *Borophaginae* (fosilní) a *Caninae* (recentní) (Finarelli 2008).



Obr.4: Ilustrace znázorňuje hlavní body větvení u tří podčeledí psovitých v časovém rozmezí od Eocénu do Pliocénu dle Wang a Tedford (2008).

3.1.4 Domestikace

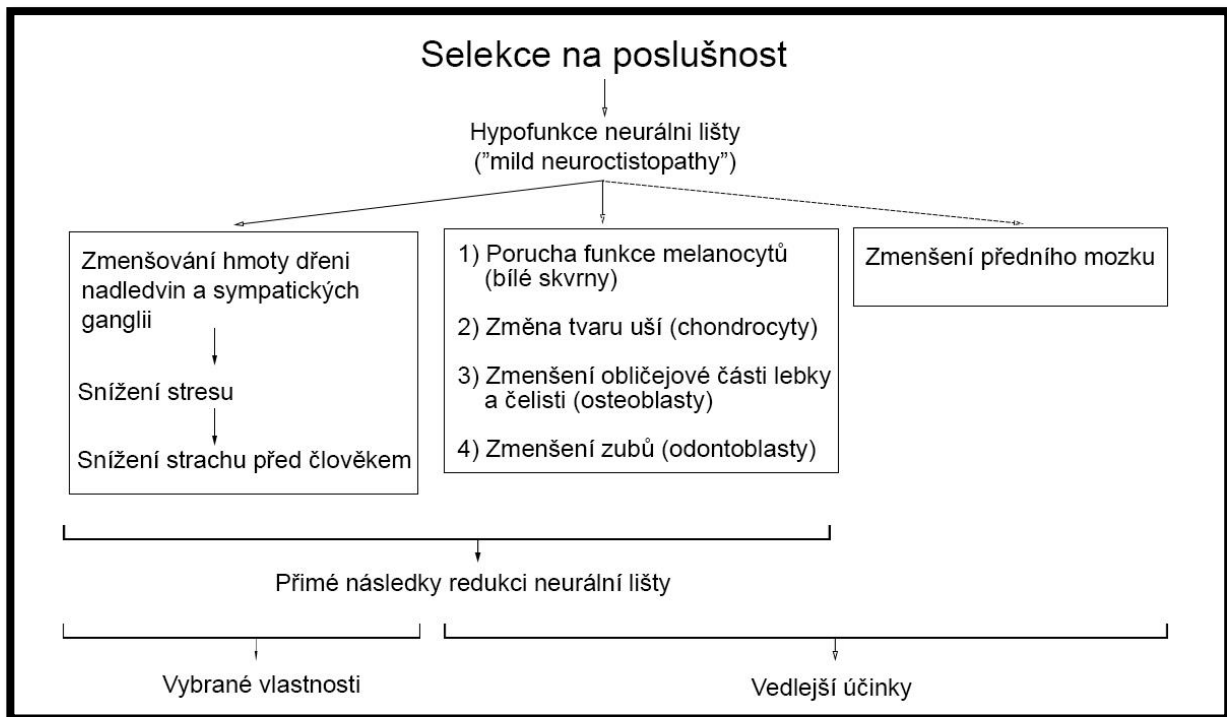
Domestikace je evolučním procesem adaptace. Vyznačuje se tím, že hlavní selektivní tlak je úmyslně vyvíjen člověkem. V průběhu domestikace dochází k tzv. domestikačnímu syndromu – transformaci fenotypových a fyziologických znaků. Mezi charakteristické znaky domestikace psů patří (Trut 2007):

- změna anatomické stavby končetin, zkrácení prstů na tlapách;
- zmenšení lebky a hmotnosti mozku;
- zakroucení ocasu;
- postupný přechod z masožravosti na všežravost;
- změna zbarvení, délky a struktury srsti;
- výskyt kožních řas a záhybů, svislé ušní boltce;
- změna hlasových projevů;
- větší poslušnost, porozumění člověku a jeho gest;

Pes byl pravděpodobně jedním z prvních člověkem domestikovaných zvířat (Axelsson et al. 2013; Ardalan et al. 2011), což bylo důležitým mezníkem v rozvoji lidské civilizace. Dosud není přesně známo, kdy začal proces domestikace u psa. Většina fosilních nálezů je datovaná od 11-15 tis. let př.n.l. (Izrael, Rusko, Irák, severní Čína, západní Evropa) až 33 tis. let př.n.l. (Axelsson et al. 2013; Larson et al. 2012). Předpokládá se, že první domestikační změny u předka psa začaly před 100 tis. let př.n.l. (Vaysse et al. 2011). Ve svém výzkumu Peter Savolainen provedl genetickou analýzu mtDNA (mitochondriální DNA) u 654 psů a došel k závěru, že psy byli plně domestikováni v době kolem 15 tis. let př.n.l. ve východní Asii (Savolainen et al. 2002).

Poslední genetické studie (Boyko et al. 2009) podporují představu, že psi pocházejí výhradně z vlka obecného, ale není jasné, proč a jak byli vlci domestikováni v psa domácího. Jedním, pravděpodobně nejrozšířenějším názorem je, že lidé chytali vlčí mláďata k účelu hlídání nebo lovu, což vedlo k výběru znaků důležitých pro tyto nové role. Taková selekce vedla k vývoji různých jedinců, kteří se stali předky moderních psů (Boyko et al. 2009). Také existuje teorie, že vlci byli předky psů, které z nějakého důvodu odmítli jejich smečky, a proto se přestěhovali blíže k lidskému obydlí, kde se mohli živit odpadky (Axelsson et al. 2013). Tito jedinci, kteří chtěli přežít, se museli naučit nejen neútočit na lidi, ale také s nimi nějak spolupracovat, získat jejich důvěru a poté i jejich sympatii. Vlk, který se naučil komunikovat s lidmi, se pravděpodobně přeměnil na psa (Trut 2007).

V průběhu domestikace si lidé vybírali zvířata podle jejich poslušnosti. Předpokládá se, že příčinou této poslušnosti byla hypofunkce neurální lišty a následné snížení migrací buněk v etapě embryonálního vývoje jedince. Existují tři hlavní cesty migrace těchto buněk. Jedna z nich probíhá ve ventrálním směru přes přední část primitivního segmentu (somit). Takto migrující buňky následně tvoří vegetativní (sympatické a parasympatické) ganglie, pátevní ganglie a dřeň nadledvin, která je zodpovědná za produkci adrenalinu a noradrenalinu – tzv. stresových hormonů. Následkem zmenšení dřeně nadledvin je nedostatečná výroba stresových hormonů, což má velký vliv na další chování jedince, dělá ho pokornějším a snižuje jeho agresivitu (Wilkins et al. 2014).



Obr. 5: Schematické znázornění důsledků hypofunkce neurální lišty, která může být příčinou domestikčního syndromu u psa dle Wilkins et al. (2014)

3.1.5 Genetika psa domácího

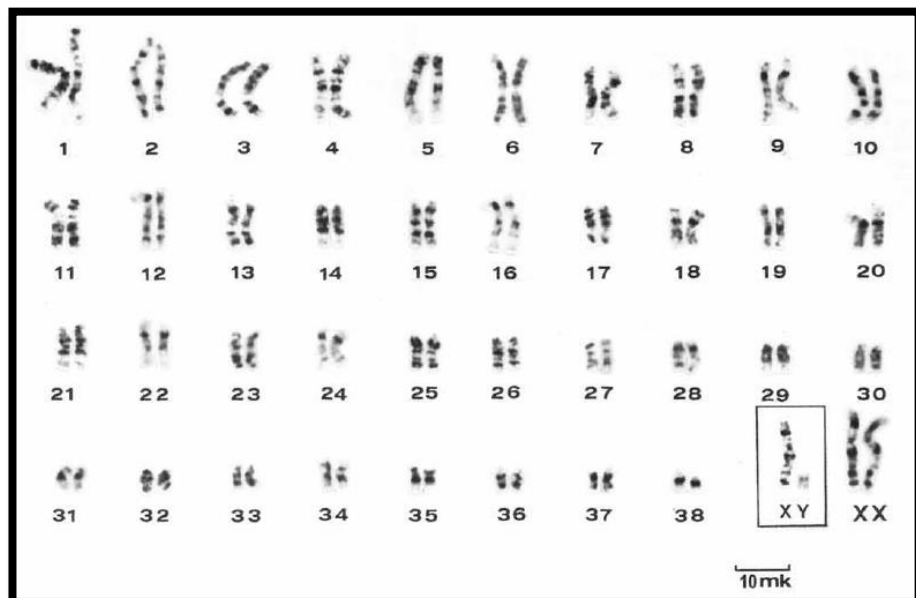
V dnešní době existuje více než 400 plemen psů, která se charakteristicky liší mezi sebou podle fenotypu a chování. Bez ohledu na takovou masivní plemennou diverzitu mají všichni psi stejný počet chromozomů, a proto se mohou mezi sebou volně pářit. Stejně tak může dojít u psů i k hybridizaci s vlky, šakaly a kojoty, což je následek stejného počtu chromozomů u uvedených druhů a jejich příslušnosti ke stejné čeledi (Vaysse et al. 2011).

Pes má v tělních buňkách celkem 78 chromozomů uspořádaných do 39 párů. Z toho 38 párů tvoří akrocentrické autozomy a 1 pár jsou metacentrické gonozomy (Dostál 2007), přičemž gonozom X je výrazně větší (125 Mb) než Y (27 Mb) (Breen 2008). Určení pohlaví u psů odpovídá typicky savčímu typu *Drosophila* tzn. že samice má homogametické pohlaví XX, samec má heterogametické pohlaví XY (Dostál 2007).

K podrobnějšímu studiu chromozomů lze využít různé techniky barvení, které pomáhají určit velikost, tvar, počet chromozomů a jejich možné aberace.

Existuje několik základních a velice rozšířených metod barvení chromozomu:

- G-pruhování (GTG) – je nejrozšířenější metodou barvení chromozomů. U této metody je pruhování na chromozomech způsobeno dodáním proteolytického trypsinu a obarvení roztokem podle Giemsky-Romanovského. Heterochromatinové oblasti se barví tmavě, euchromatinové naopak světle (Hosi & Ushiki 2001);
- R-pruhování (reverse, RHG) – je ve výsledku opačné G-pruhování; je založeno na působení teploty 87 °C a barvení roztokem podle Giemsky-Romanovského (Iannuzzi 1996);
- C-pruhování (constitutive heterochromatin, GBG) – zobrazuje konstitutivní heterochromatin satelitní DNA;
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) – je fluorescenční barvivo pro metodu FISH (fluorescent in situ hybridization) (Breen et al. 1999);



Obr. 6: Příklad G-pruhování karyotypu fenky psa domácího dle Graphodatsky et al. (1995). Rámeček ukazuje pro srovnání sestavu pohlavních chromozomů u samců.

3.1.5.1 Genom psa

Velký rozvoj genetiky v 90. letech 20. století dal vědcům možnost nejen zkoumat obrovský počet živých organismů na chromozomální úrovni, ale dokonce začít skládat mapy jejich genomu. Jedním z takových živých organismů se stal pes. Existuje spousta důvodů proč studovat a mapovat genom psa. Například moderní plemena psů představují obrovskou morfoloickou a behaviorální diverzitu uvnitř jednoho druhu, jejich geny mají velkou frekvenci mutací, což může vést k výskytu genetických onemocnění (Dostál 2007). Více než 650 mil. bp (25 %) sekvencí u psa se jednoznačně shoduje s lidským genomem, což dělá psa vhodným modelovým organismem pro komparativní analýzu genetických onemocnění u člověka (Kirkness et al. 2003).

První vazbová mapa u psů byla vytvořena pomocí 150 mikrosatelitních markerů na základě rodokmenové analýzy 163 jedinců. Tato práce byla základem pro další pokusy o mapování psího genomu (Mellersh et al. 1997). V roce 2005 se podařilo mezinárodnímu týmu vědců pod vedením profesorky Linblad-Toh osekvenovat genom psa (Linblad-Toh et al. 2005). Pro tento výzkum byl použit vzorek DNA od feny čistokrevného německého boxera jménem Tasha. Spolu s úplným osekvenováním genomu boxera byly částečně přečteny genomy několika dalších plemen psů, a jejich příbuzných druhů — vlka a kojota. Jak se ukázalo, u různých plemen psů se genomy shodují na 99,85 %, zbývající 0,15 % je příčinou meziplenné diverzity. Srovnání genomů různých plemen umožnilo také vytvořit mapu jednonukleotidových polymorfismů (SNP). Jejich celkový počet již dosahuje 2,5 milionu, což je srovnatelné s počtem SNP u člověka (Lindblad-Toh et al. 2005). Po skončení výzkumu bylo stanoveno, že celková velikost genomu psa činí 2,4 miliardy nukleotidů, které jsou rozděleny do 39 párů chromozomů (Breen et al. 1999). Pro srovnání lze uvést, že genom člověka má velikost přibližně 3,1 Gb.

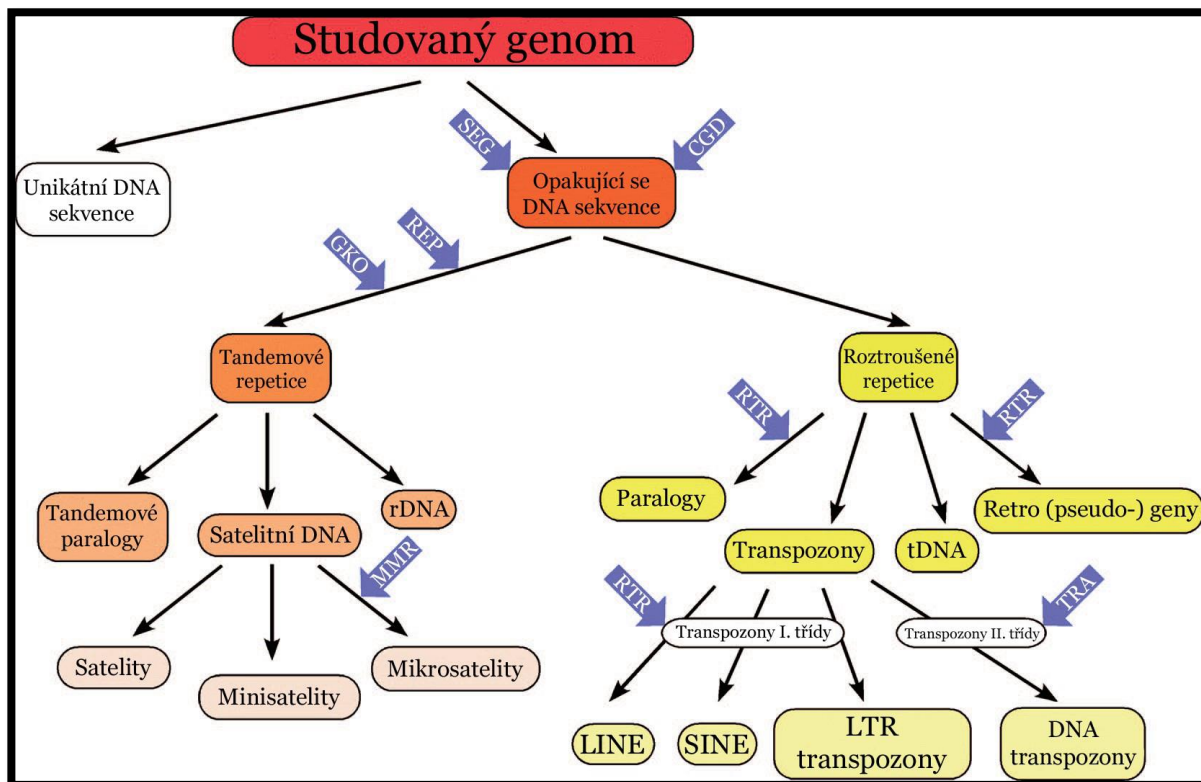
3.2 Mikrosatelity

3.2.1 Úvod

Mikrosatelity (STR-short tandem repeats, SSR-simple sequence repeats) jsou součástí tandemových opakování repetitivní oblasti DNA, které se skládají z krátkých motivů o délce 1-6 bp (Oliveira et al. 2006). Obecně platí, že počet opakování v jednom mikrosatelitu je v rozmezí od 5 do 40, ale může jich být i více. Celková délka takového opakování je obvykle méně než 300-400 nukleotidů. STR jsou lokalizovány v kódujících i nekódujících oblastech DNA (Galinskaja et al. 2019) a nacházejí se ve větším či menším množství v genomech téměř všech známých organismů (jak eukaryotických, tak i prokaryotických) a jejich semiautonomních organel (Chambers & MacAvoy 2000). Zajímavé je to, že frekvence mutací mikrosatelitů je mnohem vyšší než u ostatních částí genomu, kdy se pohybuje v rozmezí od 10^{-2} do 10^{-6} nukleotidů na lokus za jednu generaci (Oliveira et al. 2006). Vysoká frekvence mutací přispívá k značnému stupni polymorfismu mikrosatelitů, což dělá z STR jedny z nejvariabilnějších sekvencí DNA v genomu (Chambers & MacAvoy 2000).

3.2.2 Klasifikace opakujících se DNA sekvencí

V celkovém pojetí jsou opakující se DNA sekvence rozděleny na dvě velké skupiny, které se nazývají „tandemové repetice“ (tandem repeats) a „roztroušené repetice“ (dispersed repeats). Skupiny těchto repetic se mezi sebou liší podle typu (roztroušené nebo tandemové) v genomu a podle molekulárního mechanismu jejich vzniku. Na schématickém obrázku 7 je vidět, že každá skupina repetic je rozdělena na další podskupiny. Mikrosatelity patří do podskupiny satelitní DNA a skupiny tandemových repetic (Richard et al. 2008).



Obr. 7: Opakující se sekvence DNA v eukaryotických genomech a mechanismy jejich vzniku. převzato z Richard et al. (2008), překlad dle Vašek (2011). Modré šipky ukazují na molekulární mechanismy, které se podílejí na šíření a vývoji opakovaných sekvencí: replikační sklouznutí (REP); genová konverze (GKO); mismatch repair (MMR); duplikace celého genomu (WGD); segmentové duplikace (SEG); reverzní transkripce (RTR); transpozice (TRA).

3.2.2.1 Klasifikace mikrosatelitů

V podrobnější klasifikaci se mikrosatelity dají rozdělit podle délky repetice na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- až hexanukleotidové (Ellegren 2004). Mononukleotidové repetice jsou tvořené jednou opakující se bází, takovou repetici lze zapsat např. takto: $(C)_n$ (kde C je cytozin, n je počtem opakování dané báze). Dinukleotidové repetice jsou tvořeny dvěma nestejnými nukleotidy např. $(AT)_n$ atd. Četnost různých typů mikrosatelitních nukleotidových repetic závisí na jejich umístění v genomu (exony, introny, intergenové oblasti) a na studovaném organismu. V studiích o mikrosatelitech různých eukaryotických genomů bylo prokázáno, že

nejpočetnějšími jsou dinukleotidové (30–67 %) repetice (Tóth et al. 2000), avšak u primátů převládají mononukleotidové repetice (Chistiakov et al. 2006).

Dalším možností klasifikace mikrosatelitů je třídění podle struktury opakující se sekvence (Oliveira et al. 2006) na:

- dokonalé (perfect) – kdy opakovaná sekvence mikrosatelitu není přerušena žádnou bází (např. TATATATATATATATA);
- nedokonalé (imperfect) – kdy mezi opakovanými motivy mikrosatelitu je pár bází, který neodpovídá sekvenci motivu (např. TATATATACTATATA);
- přerušené (interrupted) – kdy uvnitř opakované sekvenci mikrosatelitu existuje malá sekvence, která neodpovídá sekvenci motivu (např. TATACCGTGTATATATATA);
- složené (composite) – kdy k opakované sekvenci mikrosatelitu přiléhá jedna nebo více repetice lišících se typem opakování sekvence (např. TATATATAGTGTGT);

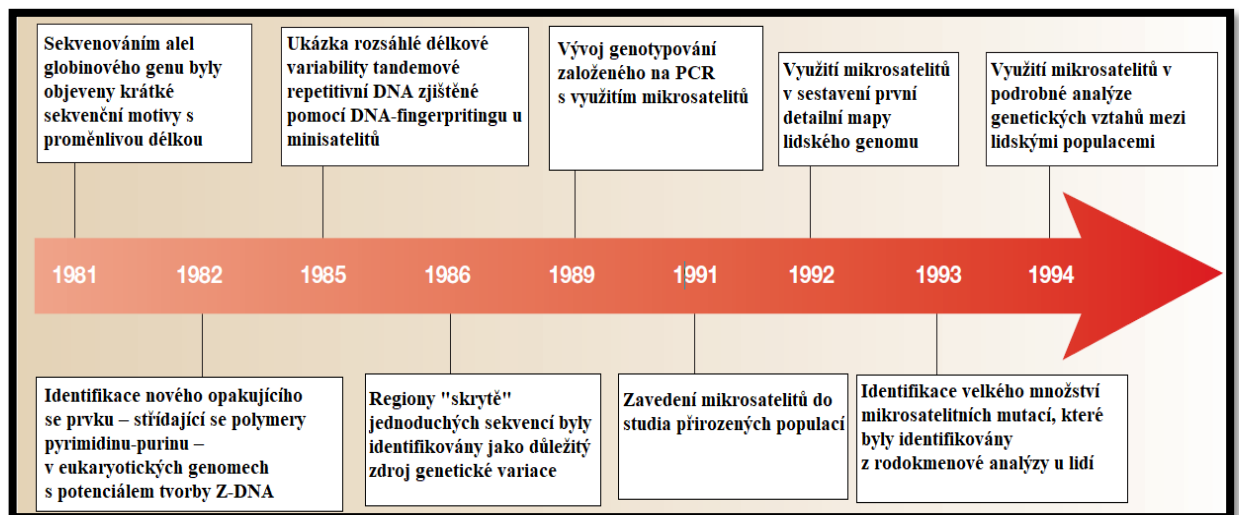
3.2.2.2 Nomenklatura mikrosatelitů

Dodnes neexistuje jediný standard v nomenklatuře mikrosatelitních lokusů. Problém je v tom, že řada autorů má různá měřítka pro definici mikrosatelitů z hlediska jejich typu, minimální a maximální délky sekvence či opakování. Další rozpory jsou spojeny s použitím různých algoritmů vyhledávání mikrosatelitů. Z těchto důvodů není prakticky možné porovnávat výsledky jednotlivých studií (Richard et al. 2008).

3.2.2.3 Historie objevu

První poznatky o tandemových repeticích byly získávány v 60. letech minulého století. V této době vědci začínali pracovat s genomickou DNA s použitím ultracentrifug. Samotný termín „satelitní DNA“ (stDNA) uvedl Saul Kit v roce 1961 (Kit 1961). Později byly identifikovány kratší (10–30 bp) tandemové repetice, které začaly být známé jako minisatelity (Ellegren 2004).

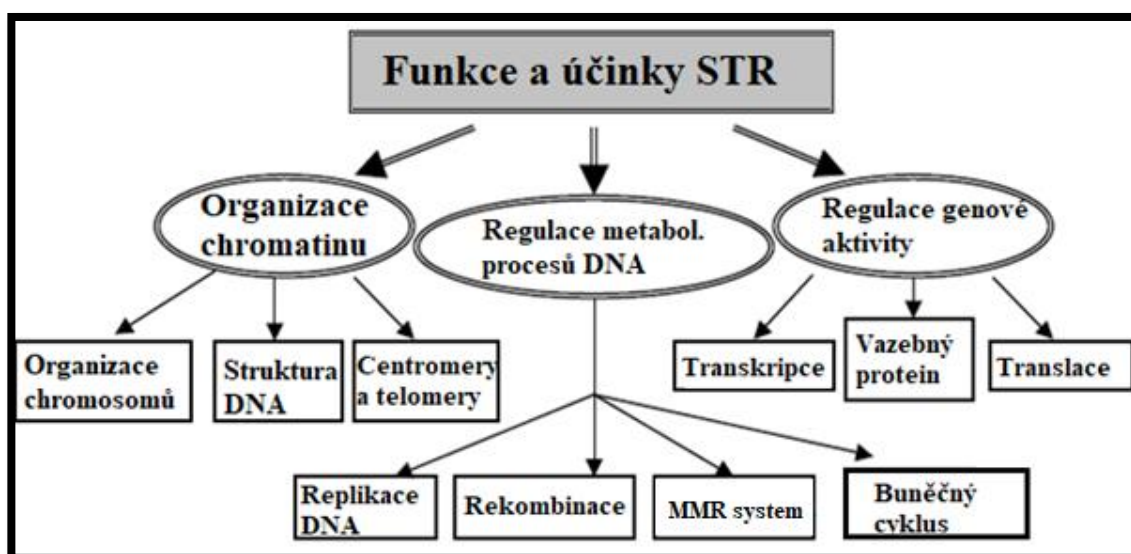
První mikrosatelity byly charakterizovány v práci Weller et al. (1984) jako polymorfní (GGAT)₁₆₅ opakování v genech lidského myoglobinu. Termín SSR se objevil o několik let později v práci Litt a Luty (1989), kteří studovali (TG)_n repetice v lidském genomu a zjistili, že (TG)_n vykazoval velikostní polymorfismy při amplifikaci metodou PCR.



Obr. 8: Počáteční historie objevů mikrosatelitů dle Ellegren (2004)

3.2.3 Funkce

Mikrosatelity jsou neoddělitelnou součástí genomu všech živých organismů. V nekódujících částech DNA jsou považovány za evolučně neutrální markery, často nemají vymezenou funkci a mohou nahromadit neomezený počet mutací během několika generací. Taková akumulace vede následně k velké genetické variabilitě, kterou lze použít pro populační analýzu a DNA fingerprintingu (Li et al. 2002). V kódujících částech DNA se vyskytují mikrosatelity, které mohou mít velký vliv na organismus. Tento vliv může být jak pozitivní, tak i negativní (Chistiakov et al. 2006). Na obrázku 9 je vidět, že se mikrosatelity mohou podílet na organizaci chromatinu, regulaci metabolických procesů DNA a regulaci genové aktivity.



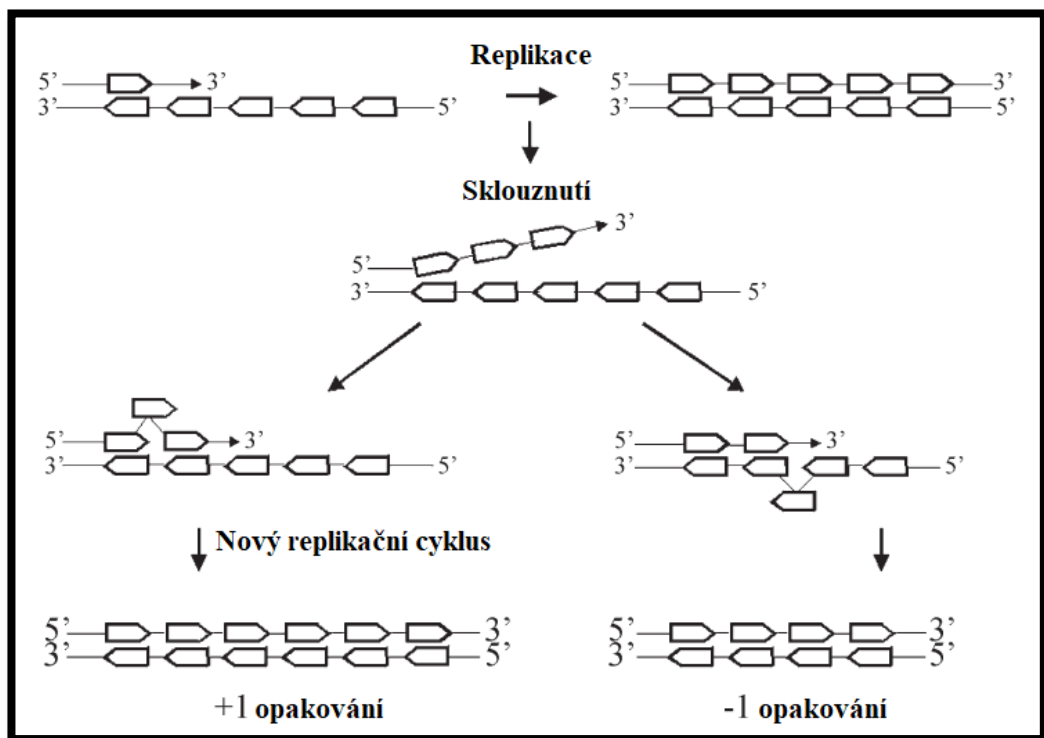
Obr. 9: Schematické zobrazení funkcí a účinků mikrosatelitů dle Li et al. (2002)

3.2.4 Mutační mechanismy

Jak už bylo dříve řečeno, mikrosatelity mutují rychleji než ostatní oblasti genomu. Obecně se dá říci, že neexistuje jednotná rychlost mutací u mikrosatelitů. Frekvence mutací se zpravidla liší podle lokusů, alel, chromozomů, mezi jedinci stejného druhu a mezi různými taxony. Frekvence mutací v STR částečně závisí na jeho vnitřních vlastnostech např. na opakujícím se motivu, jeho délce v bp, počtu opakovaných jednotek (Bhargava & Fuentes 2010). Po relativně dlouhou dobu nebyly známy přesné příčiny a mechanismy mutací mikrosatelitů. Bylo navrženo několik mechanismů vysvětlujících vysokou frekvenci mutací včetně rekombinačních chyb, nerovnoměrného crossing-overu a sklouznutí polymerasy během replikací a opravy DNA (Oliveira et al. 2006). Avšak při detailnější analýze všech představených variant, které by mohly vysvětlit tento jev, vědci identifikovaly dva hlavní mechanismy, to jsou: replikační sklouznutí (replication slippage) během replikace či opravy DNA a rekombinace mezi řetězci DNA (Oliveira et al. 2006).

3.2.4.1 Replikační sklouznutí

V dnešní době je replikační sklouznutí považováno za převládající mutační mechanismus u mikrosatelitů (Chambers & MacAvoy 2000). Tento jev se také nazývá SSM – single strand mispairing (Levinson & Gutman 1987). Proces replikačního sklouznutí nastává během replikace či opravy DNA a zahrnuje denaturaci a uvolnění řetězců DNA, což vede k chybnému párování komplementárních bází a následnému zvyšování nebo snižování počtu repetice (Chambers & MacAvoy 2000).

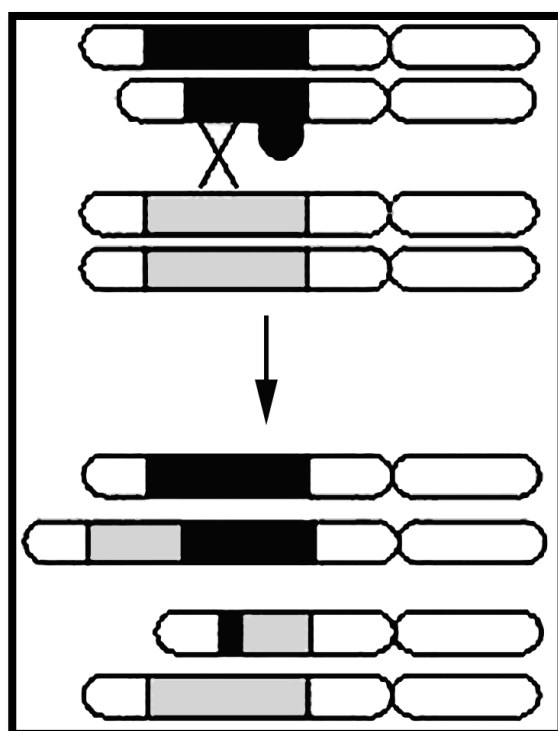


Obr. 10: Sklouznutí během replikace DNA. Představme si, že v původní molekule DNA bylo 5 repetice, které jsou zobrazeny jako obdélníky. Sklouznutí vede k tvorbě nových alel s 6 a

4 opakováními, v závislosti na řetězci, na kterém došlo ke sklouznutí polymerasy (Oliveira et al. 2006).

3.2.4.2 Rekombinace

Za další mechanismus je považována mitotická a meiotická homologní rekombinace. Pod tímto pojmem rozumíme typ genetické rekombinace v průběhu které dochází k výměně nukleotidových sekvencí mezi dvěma podobnými nebo identickými chromozomy (Richard & Pâques 2000). Při rekombinaci může dojít ke změně délky STR. Příčinou těchto změn může být nerovnoměrný crossing-over nebo genová konverze (Li et al. 2002).



Obr. 11: Nerovnoměrný crossing-over mezi homologními chromozomy. Černé a šedé oblasti odpovídají opakujícím se sekvencím mikrosatelitu (Oliveira et al. 2006).

3.2.4.3 Možné následky mutace

Velká část mikrosatelitů se nachází v nekódujících částech DNA a jsou biologicky neutrální (Chistiakov et al. 2006). Naproti tomu se STR mohou vyskytovat i v regulační nebo i dokonce v kódující části DNA, což v případě mutací může vést k fenotypovým a fyziologickým změnám např. různým onemocněním. Nedávná genetická studie lidského genomu prokázala, že variace mikrosatelitů přispívá k 10-15 % dědičných variací v genové expresi u lidí (Gymrek et al. 2016).

Velký vliv mají mutace mikrosatelitů na proteiny a genovou regulaci v organismu. Mutační změny v opakujících se segmentech některých genů mohou ovlivnit fyzikální a chemické vlastnosti proteinů, což může vést k postupným a předvídatelným změnám ve funkci bílkovin. Například změny délky v tandemově se opakujících oblastech genu *Runx2*, který kóduje protein zodpovědný za vývoj zubů, obličejových kostí a chrupavek, vedou k rozdílům v délce

obličejové části lebky u psa. Tyto fenotypové změny platí také pro většinu jednotlivých druhů psových šelem (Fondon & Garner 2004). Mutace v mikrosatelitech také mohou být příčinou různých onemocnění. Změny délky trinukleotidových opakování jsou spojeny s více než 40 neurologickými onemocněními u lidí jako je například Huntingtonova choroba, syndrom fragilního X, myotonická dystrofie atd. (Pearson et al. 2005). K mutacím rovněž dochází u evolučně jednodušších organismů. Například mutace v některých lokusech patogenních bakterií způsobuje rychlé evoluční změny povrchových proteinů, což zvětšuje adaptabilitu vůči imunitní reakci jejich hostitele (Moxon et al. 1998). Dalším příkladem mohou být změny v délce tandemových opakování u červené chlebové plísně (*Neurospora crassa*), které mění její cirkadiální cykly (Michael et al. 2007).

3.2.5 Využití mikrosatelitů

S narůstající dostupností amplifikačních metod na začátku 90. let došlo k obrovskému nárůstu studií využívajících mikrosatelitů jako genetických markerů (Oliveira et al. 2006). Díky svým vlastnostem jsou považovány za „zlatý standard“ v profilování DNA (Asch et al. 2009). Z těchto důvodů jsou mikrosatelitní markery často používány především v populační genetice, evolučních studiích, genetickém mapování, medicíně, archeologii či kriminalistice (Buschiazzo & Gemmell 2006).

Samozřejmě metody genetických analýz s využitím STR markerů mají stejně jako všechny metody své výhody a nevýhody. Mezi výhody STR markerů patří (Richard & Thorpe 2001):

- vysoký stupeň variability (je možné rozlišit homo- a heterozygotní jedince);
- značné rozšíření v genomu;
- výskyt u všech dosud studovaných taxonů;
- specifická a reprodukovatelnost;

Mezi nevýhody patří:

- rozdílná frekvence mutací v jednotlivých lokusech;
- problematické porovnání výsledků mezi jednotlivými laboratořemi;
- výskyt vedlejších produktů při provedení PCR;

3.3 Metody

3.3.1 Odběr vzorků

Pro jakoukoliv genetickou analýzu je nezbytné získat vzorky DNA ze studovaného objektu a bezpečně ji izolovat (Hearn & Arblaster 2010). Izolace DNA byla poprvé provedena v roce 1869 švýcarským doktorem Friedrichem Miescherem, který ani nevěděl, co přesně objevil. Pro něho a pro celý svět to byla úplně nová molekula (Dahm 2008). Od té doby uplynulo mnoho let a DNA se stala široce studovanou a nesmírně důležitou molekulou pro celou řadu vědních disciplín.

Pro snadnou analýzu DNA je nezbytným a důležitým krokem správně odebrat a uchovávat vzorek. Nejčastěji můžeme získat DNA z tělních tekutin (krev, moč, sliny, sperma), epitelu, trusu, nehtů, ušního mazu, vlasů/chlupů (ovšem nejlépe vytržených s chlupovým folikulem). Pro zamezení kontaminace vzorků cizorodou DNA je nezbytné dodržovat hygienické normy (práce v jednorázových rukavicích, čistota v laboratoři). Každý vzorek biologického materiálu musí být umístěn v individuálně označené obálce s kartáčkem s bukálním stěrem nebo ušním mazem, popř. chlupy nebo ve zkumavce obsahující krev, trus či moč (Hearn & Arblaster 2009).

3.3.1.1 Invazivní metody odběru

Invazivní metoda (invasive genetic sampling, IGS) předpokládá pronikání přístroje dovnitř organismu. To je například odběr krve, biopsie, punkce. Odběr krve patří mezi nejspolehlivější postup pro získání čistého vzorku DNA (Bartlett & Stirling 2003). Tento typ odběru smí provádět pouze odborník – specialista. Metoda je vhodná pro laboratorní vyšetření vzorků domácích zvířat. U divokých zvířat je situace složitější, protože odběr čerstvé krve u volně žijícího kojota, slona nebo vlka v přírodních podmínkách není možné bez použití sedativ. Proto nejsou invazivní metody populární pro odběr vzorků u volně žijících živočichů bez ohledu na svou efektivnost (Waits & Paetkau 2005).

3.3.1.2 Neinvazivní metody odběru

Pod neinvazivní metodou (non-invasive genetic sampling, NGS) rozumíme odebrání biologického materiálu bez poškození tkání. K tomuto můžeme provést bukální stěr, odebrat vzorky epitelu, stolice, moči, chlupů, peří nebo vaječné skořápky (Taberlet & Luikart 1999). Je to populární a široce rozšířená metoda pro studium divokých druhů zvířat. Pomocí této metody mohou vědci sbírat data o populaci, provést identifikaci druhu a určit pohlaví (Waits & Paetkau 2005).

3.3.1.3 Izolace DNA











Po odběru a uložení vzorku je dalším krokem izolace DNA. Pro vlastní extrakci genetického materiálu je třeba rozrušit buněčnou a jadernou membránu, aby došlo k uvolnění DNA do roztoku. Z živočišných buněk může být část DNA uvolněna například zahřátím. Pro úspěšnou analýzu je důležité zbavit DNA nečistot, protože inhibují aktivitu enzymů používaných v návazných molekulárních metodách. Nejrozšířenějšími inhibitory v biologických tkáních jsou: hem (komponent erytrocytů pomocí kterého je přenášen kyslík), kolagen v kostech a jiných

pojivových tkáních, melanin v chlupcích a kůži, myoglobin ve svalových tkáních a aromatické sloučeniny v rostlinných vzorcích (Rådström et al. 2004).

Jsou nutné 4 základní kroky pro úspěšnou izolaci DNA (Aukenov et al. 2014):

1. lyse buněčných a jaderných membrán pro uvolnění DNA, RNA, proteinů, lipidů a sacharidů do roztoku;
2. eliminace proteinů spojených s DNA pomocí proteas, enzymatické odstranění RNA pomocí RNas a inaktivace enzymů, které se vážou na uvolněnou DNA;
3. centrifugace různých roztoků ve zkumavkách s křemíkovou membránou na kterou se váže DNA a propouští zbývající organické složky buňky. Centrifugace mnohonásobně zvyšuje rychlost filtrování přes membránu;
4. rozpouštění a uchování DNA ve vhodném pufru. DNA rozpuštěná v pufru může být skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu několika let;

Podmínky a metody pro izolaci DNA se mohou mezi sebou lišit. Příčinou tohoto rozdílu je použití různých typů tkání a látek pro izolaci. Proto je pro vědeckou práci doporučeno používat komerční „kit“ (angl. kit – souprava) pro extrakci DNA. Použití kitů umožňuje rychle získat čistou DNA připravenou pro další etapy výzkumu. Většina moderních kitů pracuje na principu křemičitých filtrů, které jsou zabudovány do speciálních zkumavek (Aukenov et al. 2014). Příkladem může být kit NucleoSpin Tissue od Macherey-Nagel, který je určen pro rychlou přípravu malého množství čisté genomové DNA z jakýchkoli tkání, buněk, bakterií, kvasinek, vzorků pro forenzní analýzu, séra, plazmy nebo jiných tělních tekutin. Je také vhodný pro přípravu DNA z krve člověka nebo zvířat. Vyčištěná DNA může být použita přímo pro PCR, Southernův blotting nebo jakékoliv enzymatické reakce (Macherey-Nagel GmbH & Co 2014).

1 Příprava vzorku	Vložit 25 mg výchozího materiálu	
2 Pre-lyse vzorku		180 μL T1 25 μL Proteinase K 56 $^{\circ}\text{C}$, 1–3 h
3 Lyse vzorku		200 μL B3 70 $^{\circ}\text{C}$, 10 min
4 Úpravení podmínek pro navázání DNA		210 μL 96–100% ethanol
5 Navázání DNA	 	Load all 11,000 x g, 1 min
6 Promývání křemičité membrány	  1 st and 2 nd	1 st wash 500 μL BW 2 nd wash 600 μL B5 11,000 x g, 1 min
7 "Stažení sucho" k.m.		11,000 x g, 1 min
8 Eluce čisté DNA	 	100 μL BE (70 $^{\circ}\text{C}$) RT, 1 min 11,000 x g, 1 min

Obr. 12: Postup izolace genomické DNA z tkání dle Macherey-Nagel GmbH & Co (2014).

3.3.2 PCR

3.3.2.1 Popis metody

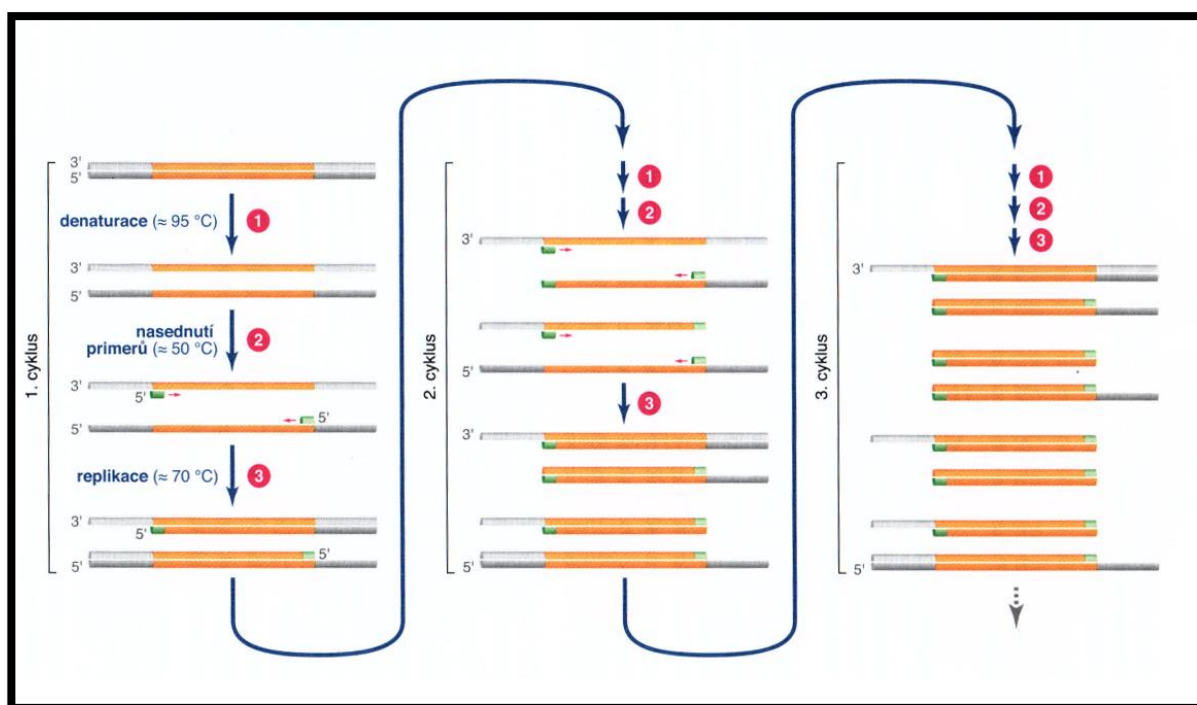
Polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“, PCR) je rychlou a citlivou laboratorní metodou v molekulární biologii, která byla objevena americkým biochemikem K. Mullisem v roce 1983 (Mullis 1990). Tato metoda byla považována za revoluční v tehdejší biologii (Van Guilder et al. 2008).

Podstatou PCR je mnohonásobné zmnožení (amplifikace) určitých úseků DNA během opakujících se cyklů in vitro. Pro provedení této reakce je nezbytné mít ve směsi následující komponenty (Innis & Gelfand 1990):

1. templátovou DNA, která poskytuje předlohu pro amplifikaci vybraného úseku molekuly;
2. dva primery (chemicky syntetizované krátké oligonukleotidy), které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě. Tím je zároveň vymezen určitý úsek DNA;
3. termostabilní DNA polymerasu sloužící k syntéze nového vlákna DNA. Pro tuto roli jsou nejčastěji používány enzymy termofilních bakterií *Thermus aquaticus* (*Taq* polymerasa), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* polymerasa), *Pyrococcus woesei* (*Pwo* polymerasa), *Thermus thermophilus* (*Tth* polymerasa); DNA polymerasa rozpoznává primery jako oblasti pro začátek syntézy, kdy na 3' konci začíná syntéza nových úseků DNA, které jsou komplementární k templátové ssDNA (jednovláknová DNA);
4. směs nukleotidů dNTP (deoxynukleosidtrifosfáty) slouží jako stavební bloky pro syntézu nových úseků DNA pomocí DNA polymerasy; Jsou 4 typy základní nukleotidů pro klasickou PCR: dATP, dCTP, dGTP a dTTP;
5. roztok pufru, který poskytuje potřebné reakční podmínky – pH, iontovou sílu roztoku;
6. ionty Mg^{2+} , které zesilují aktivitu polymerasy (Chien et al. 1976);

PCR probíhá ve specializovaném přístroji nazývaném termocykler. Toto zařízení můžeme naprogramovat tak, aby se automaticky měnila teplota v určitých intervalech, což je pro tuto metodu nezbytné (Šmarda et al. 2005). Optimální počet cyklů se zpravidla pohybuje v rozmezí 20-35 a je závislý na výchozím počtu molekul templátové DNA. Každý cyklus se skládá ze tří fází (Joshi & Deshpande 2013):

1. denaturace – templátová DNA se zahřívá na teplotu 90-97 °C (30 s–2 min.) než dojde k přerušení vodíkových můstků a vzniku ssDNA;
2. anelace („annealing“) – proces nasedání primerů na komplementární vlákno DNA při teplotě 50-60 °C. Obvykle teplota se nastaví o 5 °C nižší než teplota tání (T_m) vybraného primeru. Polymerasa se pak váže na úseky primerů;
3. elongace – vznik nových řetězců DNA ve směru 5' → 3' působením polymerasy při teplotě 72 °C (2-5 min.);



Obr. 13: Schéma PCR dle Kodíček et al. (2015).

Množství kopií vybraného úseku cílové molekuly narůstá exponenciálně (2^n , kde n je počtem cyklů). Konečné produkty PCR se nazývají amplikony (Šmarda et al. 2005). Po posledním cyklu zpravidla následuje tzv. finální elongace, kdy jsou vzorky zpravidla inkubovány při 72 °C (5 min) (Joshi & Deshpande 2013).

Pro separaci a vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA se obvykle používá gelová elektroforéza, která je popsána v další podkapitole.

3.3.2.2 Varianty PCR

Klasická metoda PCR existuje už skoro 40 let (Mullis 1994), proto samozřejmě došlo k jejímu rozvoji a vzniku velkého počtu různých variant. Modernizace metody odpovídá požadavkům konkrétních úkolů daného výzkumu (Joshi & Deshpande 2013). V dnešní době existují varianty jako například: kvantitativní PCR (qPCR, real-time PCR), inverzní PCR (IPCR), Nested PCR, mnohonásobná (multiplex) PCR, PCR-RFLP, AS-PCR, RT-PCR, asymetrická PCR a řada dalších (Šmarda et al. 2005). Jednou z nejznámějších a nejvyužívanějších metod je kvantitativní PCR (qPCR, real-time PCR), která je odlišná od klasické metody tím, že výsledky každého cyklu jsou zaznamenávány ve skutečném čase. U této metody je používán speciální termocykler, který v průběhu každého cyklu kontinuálně zaznamenává množství DNA. Pro detekci množství DNA se přidává fluorescenční substrát (Heid et al. 1996). Další často používanou metodou je mnohonásobná PCR (multiplex), která umožňuje současně amplifikovat velký počet cílových sekvencí v jedné reakční směsi. U této techniky se využívá více párů primerů, které se vážou na různé úseky templátové DNA. Pro snadnější průběh reakce je nezbytný proces optimalizace koncentrace primerů. Náklady na reagenzieny jsou v mnohonásobné PCR menší než v jiných technikách, proto je ideální pro úsporu drahé polymerasy (Edwards & Gibbs, 1994).

3.3.2.3 Výhody a nevýhody PCR

Stejně jako jiné molekulární metody má PCR své výhody a nevýhody, k výhodám PCR patří (Glik 2002):

- rychlost průběhu reakce a možnost automatizace;
- citlivost;
- nízké náklady na provedení reakce;
- univerzálnost;
- dostupnost;
- je základem pro další návazné techniky;
- bezpečnost práce s metodou;

Naopak k typickým nevýhodám PCR patří (Ignateva 2007):

- pro správný výběr vhodných primerů je nutné znát předem hledanou sekvenci DNA;
- primery použité pro PCR mohou nespecificky nasedat na sekvence, které jsou podobné, ale ne zcela identické cílové DNA;
- chybné nukleotidy mohou být zahrnuty do sekvence PCR DNA polymerasou;

Také jednou z výhod a zároveň nevýhod je schopnost detekovat minimální množství DNA ve vzorku. Během přípravy reakční směsi může dojít ke kontaminaci cizorodou DNA, což vede k falešně pozitivním výsledkům. Pro zamezení kontaminace se manipulace s DNA/RNA vzorky provádějí ve speciálních PCR boxech. Rovněž čistota vzorků je závislá na dodržování hygienických norem laboranty (Ignateva 2007).

3.3.2.4 Využití PCR

Objev PCR se stal průlomovým momentem pro všechny oblasti molekulárně-biologického výzkumu. Proto se nelze divit, že v dnešní době je PCR rozšířenou a často používanou metodou nejen v molekulární biologii, ale i v medicíně, genovém inženýrství, parazitologii, populační biologii, kriminalistice, archeologii atd. Je tedy používána všude, kde je potřeba namnožit unikátní sekvenci DNA (Gilmijarova et al. 2017). Pomocí PCR se stalo možné snadno a rychle určit paternitu, rozpoznat některá onemocnění v jejich inkubační době, detekovat přítomnost virových a bakteriálních agens v buňkách, identifikovat pachatele a mnoho dalších věcí. Neméně je důležitým je to, že využití PCR umožnilo rozvoj genetických studií v oblastech prenatalní diagnostiky, onkogenetiky, farmakogenetiky, imunogenetiky, metabolických poruch a dědičných onemocnění spojených s mutacemi (Gilmijarova et al. 2017).

3.3.3 Elektroforéza

3.3.3.1 Základní princip

Elektroforéza je separační metodou, kdy dochází k migraci iontů, makromolekul, molekul a koloidních částic v kapalném nebo plynném prostředí působením vnějšího elektrického pole (Kohlheyer et al. 2007). Základním principem je pohyb nabitých částic ve směru elektrody opačné polarity. Separace může probíhat buď ve volném pufrovaném roztoku nebo v jiném vhodném nosiči (škrob, agarosa, polyakrylamid, zesíťovaný dextran). Výběr konkrétní metody je závislý na velikosti a typu studovaných částic. Mobilita látek je ovlivněna elektroosmotickým tokem a elektroforetickou pohyblivostí (Záruba et al. 2016).

Tato metoda má široké uplatnění v biochemii, molekulární biologii, klinické diagnostice a populační biologii (Komarova & Kamentsev 2008). Pro rozdělení molekul DNA se nejčastěji používá gelová (agarosová, polyakrylamidová nebo kapilární) elektroforéza.

3.3.3.2 Agarosová a polyakrylamidová elektroforéza

Polyakrylamidová elektroforéza („polyacrylamide gel electrophoresis“, PAGE) a agarosová elektroforéza jsou univerzálními metody pro separaci proteinů a nukleových kyselin podle jejich molekulární hmotnosti a mobility (Chrumbach & Rodbard 1971).

Použití gelů v elektroforéze má řadu výhod, které určují jejich široké použití. To jsou (Chrumbach & Rodbard 1971):

- chemická inertnost a mechanická stabilita;
- lehká příprava;
- vysoká transparentnost (průhlednost);
- pružnost a pevnost;

Efektivní velikost pórů v gelu určuje jeho separační vlastnosti, tedy odolnost gelu vůči pohybu makromolekul. Avšak při provedení PAGE existují limity koncentrací akrylamidu, které lze ještě použít. Při vysokých koncentracích akrylamidu se gely stávají křehčími a obtížnějšími pro použití (Chrumbach & Rodbard 1971). S poklesem velikosti pórů se snižuje rychlost pohybu molekul gelem. Změnou koncentraci gelu můžeme upravit velikost pórů a následně optimalizovat rozlišovací schopnost metody pro konkrétně analyzovaný vzorek (Stručkova & Kaljasova 2012). V průběhu reakce je cukrofosfátová kostra molekuly DNA nabitá negativně, a proto se řetězce DNA pohybují směrem od katody k anodě. Delší molekuly migrují pomaleji, protože se zdržují v gelu, kratší molekuly se pohybují rychleji (Záruba et al. 2016).

Nicméně gelové elektroforézy mají i své nevýhody a to jsou (Heiger 2000):

- delší čas analýzy;
- časově náročné na vyhodnocování;
- nelze ji automatizovat;

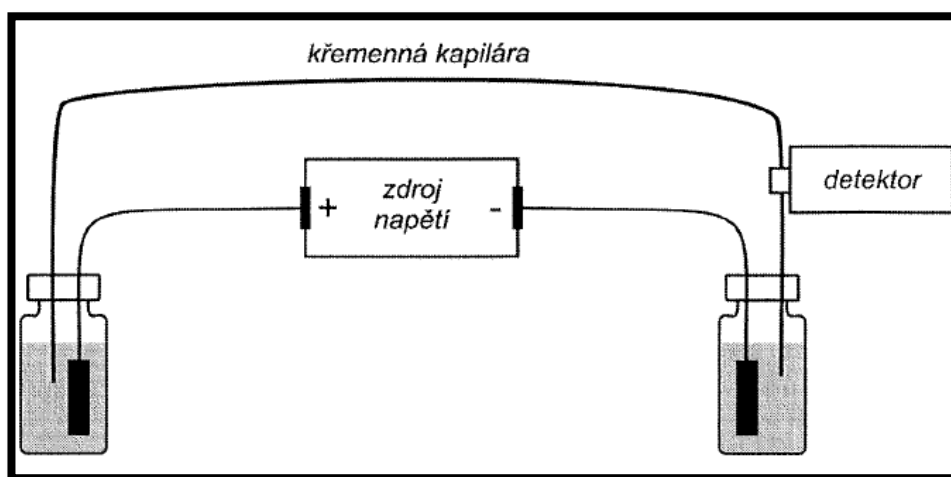
Etapy provedení gelové elektroforézy na příkladu pro separaci amplikonů (Stručkova & Kaljasova 2012):

1. příprava gelu *in situ* v elektroforetické cele;
2. formování jamek pomocí speciálních hřebenů umístěných v gelu před nalitím;

3. nanesení vzorků do jednotlivých jamek;
4. separace molekul v elektrickém poli;
5. dodání ethidium bromidu nebo stříbra pro vizualizaci DNA; vizualizace výsledků pomocí UV záření (pro ethidium) nebo barvení pomocí speciálních roztoků (pro stříbro);

3.3.3.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis, CE) je elektromigrační metodou ve které separace materiálu probíhá v křemenných kapilárách o délce 25-75 cm a průměru 20-100 μm (Záruba et al. 2016). Aparát CE se skládá ze dvou inertních elektrod ponořených do roztoku základního elektrolytu, zdroje vysokého napětí, křemenné kapiláry a detektoru umístěného před jedním z konců kapiláry. Vnitřní objem kapilár je naplněn elektrolytickým pufrem (Komarova & Jantsev 2008).



Obr. 14: Schéma přístroje pro CE s křemennou kapilárou a detektorem v blízkosti katodické nádoby s elektrolytem (Záruba et al. 2016).

Existuje několik technik kapilární elektroforézy: kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza (CGE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární isoelektrická fokusace (CIEF), isotachoforéza (ITP). Tyto techniky se rozlišují podle mechanismu separace a typu látek potřebných k separaci (Heiger 2000).

3.3.3.3.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Jednou z nejjednodušších a nejpoužívanějších technik je CZE, protože se v ní jako základní elektrolyt používá pouze pufř (Záruba et al. 2016). Separace probíhá tak, že se různé komponenty vzorku pohybují různou rychlostí a tvoří takzvané zóny. Rychlost pohybu každé zóny závisí na elektroforetické mobilitě rozpuštěné látky a na elektroosmotickém toku v kapiláře. Použití CZE umožňuje oddělení jak malých, tak velkých molekul. CZE je využívána například k analýze proteinů (Heiger 2000).

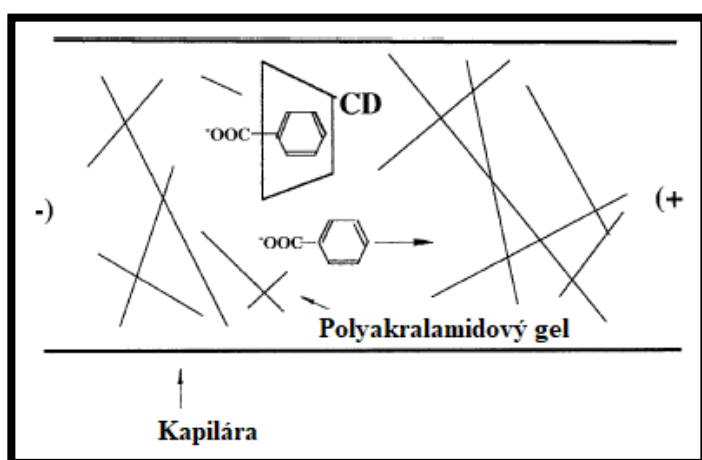
Postup CZE (Komarova & Jantsev 2008):

1. mikroobjem analyzované směsi je zaveden do kapiláry, která je předem naplněna vhodným pufřem;
2. ke koncům kapiláry je přiváděno vysoké napětí (do 30 kV);

3. složky směsi se začínají pohybovat kapiláře s různou rychlostí, která závisí především na náboji a hmotnosti složek;
4. dochází k separaci složek směsi na jednotlivé zóny;

3.3.3.3.2 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

CGE je často používanou metodou pro separaci makromolekul (proteiny, nukleové kyseliny, stereoizomery, sacharidy) podle jejich molekulové hmotnosti. Základem CGE je naplnění kapilár polymerním gelem, který tvoří tzv. molekulové síto (Heiger 2000). Důležité je to, že díky absorpci gelu na stěny kapiláry není pozorován elektroosmotický tok, a proto směrem k detektoru putuje jenom jeden druh iontů (kladný nebo záporný) (Záruba et al. 2016). Uvnitř může být kapilára naplněna lineárním, síťovaným nebo polymerním gelem, avšak mechanismus separace zůstane prakticky stejným (Heiger 2000).



Obr. 15: Příklad modelu CGE separaci derivátů cyklodextrinu (CD) (Lin et al. 1995).

Polymer	Koncentrace	Použití
Síťované polymery		
Polyakrylamid, bis-akrylamid	2– 6 % T, 3 – 6 % C	<ul style="list-style-type: none"> • Oligonukleotidy, DNA • Proteiny, SDS-vázané proteiny
Linreární polymery		
Polyakrylamid	< 0.1– 6 %	<ul style="list-style-type: none"> • Restrikční fragmenty
Dextran, polyvinylalkohol, hydroxylalkylcelulosa	6 –15 %	<ul style="list-style-type: none"> • Oligonukleotidy, DNA, proteiny
Agarosa	0.05 –1.2 %	<ul style="list-style-type: none"> • Restrikční fragmenty • Proteiny

Obr. 16: Polymerní matrice (základy) pro CGE dle Heiger (2000).

3.4 Využití STR markerů pro analýzu DNA u psů a vlků

3.4.1 Forenzní genetika

3.4.1.1 Identifikace

Prakticky od začátku svého objevu se mikrosatelity staly široce používanými v obrovském počtu genetických studií. Velmi často jsou mikrosatelitní markery používány pro identifikaci zvířat v souvislosti s kriminalistikou, chovatelstvím a populačními studiemi (Wictum et al. 2013).

Bohužel mělo použití STR markerů u živočichů ve forenzní analýze jednu velkou nevýhodu, což byl celkový nedostatek vlastních markerů a chybějící nomenklatura alel pro jejich standardizaci. Kvůli tomu nebylo možné snadno a rychle porovnávat výsledky mezi laboratořemi a vytvářet veřejnou genetickou databázi, což omezovalo potenciální použití těchto markerů (Ash et al. 2009). V dalších studiích byly předloženy návrhy nomenklatury alel, které byly založené na počtu opakování, což je normou v lidské genetice. Standardizovaná nomenklatura již byla zveřejněna pro kočky (Lipinski et al. 2007), skot (Van de Goor et al. 2009) nebo pro koně (Van de Goor et al. 2010). U psů se tomuto problému věnovalo několik prací (Eichmann et al. 2005; Hellmann et al. 2006; Van Asch et al. 2009; Tom et al. 2010). Například Eichmann et al. (2005) vypracoval nomenklaturu 15 STR lokusů u psů (ZUBECA6, FH2132, FH2087Ua, ZUBECA4, WLIMSTF, PEZ15, PEZ6, FH2611, FH2087Ub, FH2054, PEZ12, PEZ2, FH2010, FHX79 a FH2079). Další studie pak charakterizovala 6 nových STR (PEZ3, PEZ6, PEZ8, PEZ10, FHC2161 a FHC2328) (Hellmann et al. 2006). V současnosti už je charakterizováno 56 STR lokusů s jejichž pomocí byl vytvořen pevný základ pro systém genotypizace psů pomocí mikrosatelitů (<https://strbase.nist.gov/dogSTRs.htm>).

3.4.1.2 Kriminalistika

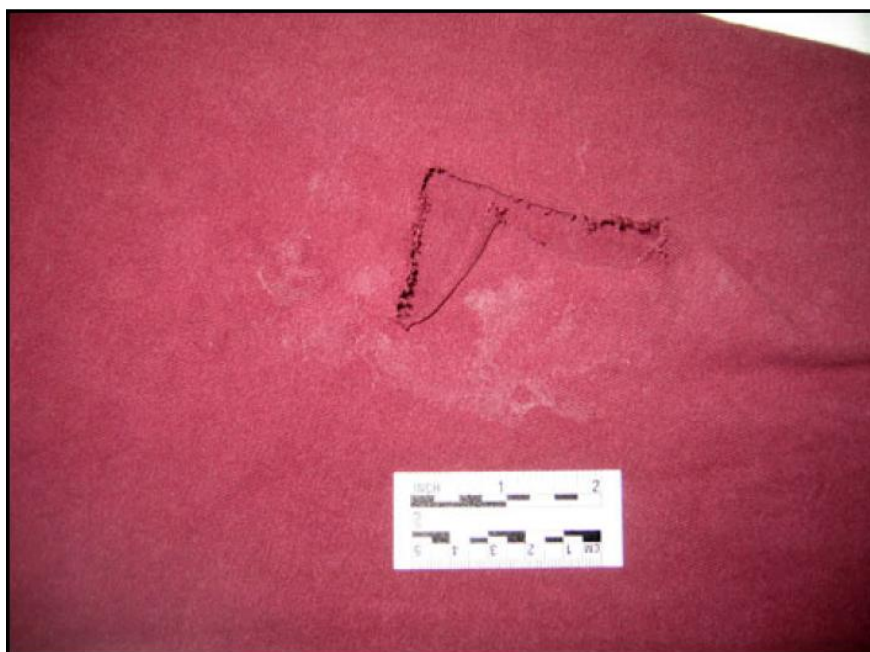
Posledních 30 let se stále častěji používá molekulární analýza DNA živočichů jako důkaz v systémech trestního soudnictví po celém světě. Tato analýza se využívá v situaci, když zvíře nebo pachatel napadne člověka, a také pro ochranu živočišných druhů, příkladem jsou: pytláctví chráněných vzácných zvířat, týrání zvířat a napadení zvířete jiným zvířetem (Wictum et al. 2013).

V případě trestných činů, kdy člověk ublíží jinému člověku, může být domácí zvíře využito k prokázání daného trestného činu (Asch & Pereira 2010). Může to být například DNA psa nebo kočky ve formě chlupů, slin, moči a výkalů, které jsou ve velkém množství v domácnosti každého majitele. Konkrétně bylo zjištěno, že srst domácích zvířat je snadno přenositelná, často se vyskytuje na oblečení, lůžkovinách a v autech majitelů a tím pádem může být jako přesvědčivým a nezvratným důkazem v místě zločinu (Lyons et al. 2014).

Poprvé byly mikrosatelitní markery u zvířat použity pro analýzu a vyšetřování vraždy na začátku 90. let minulého století. Příkladem toho je zabití psa a jeho majitele neznámou osobou v roce 1991. Při dalším vyšetřování byl nalezen podezřelý, na jehož oblečení byly krevní skvrny. Při pozdější extrakci a vyšetření vzorků DNA z krve bylo zjištěno, že krvavé skvrny patřily několika jedincům: psovi a dvou různými lidmi. Bohužel další vyšetřování nebylo možné, protože ve vzorcích byla přítomna látka inhibující PCR. Nicméně v roce 1996 se

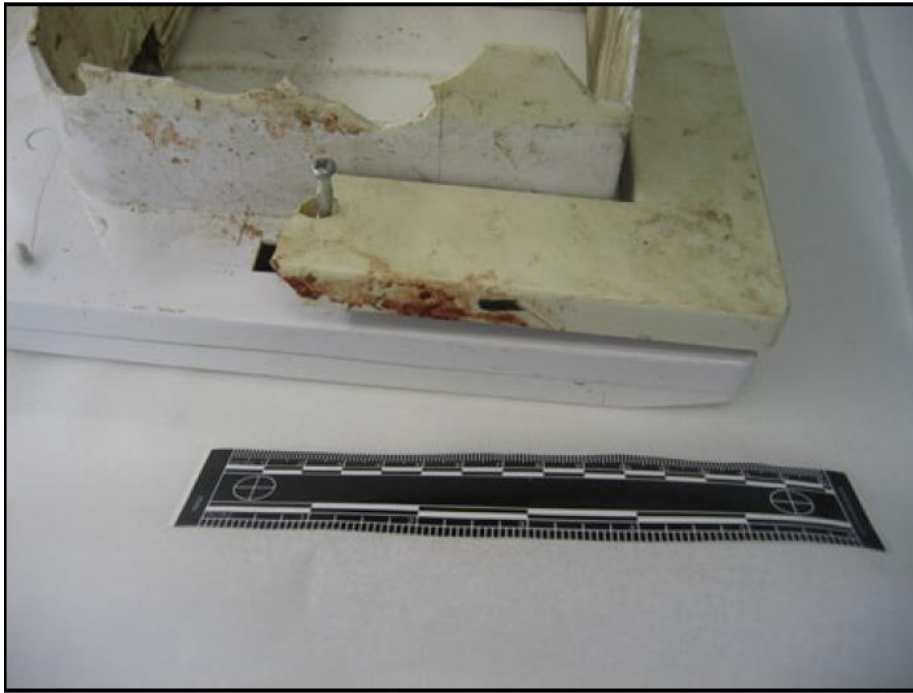
vědcům podařilo inhibitory odstranit a získat výsledky, které poukazovaly na to, že jeden vzorek DNA patřil psovi zavražděného, druhý patřil oběti a třetí podezřelému. Kombinace těchto důkazů se stala klíčovým faktorem při řešení tohoto případu po období pětiletého neúspěšného vyšetřování (Shutler et al. 1999).

V situacích jako je napadení člověka zvířetem jsou často používány STR markery pro analýzu a identifikaci útočícího zvířete. Například v Austrálii v roce 2008 byla žena napadena neznámým psem. Pro identifikaci útočícího psa bylo provedeno profilování DNA z uschlých slin, které zůstaly na tričce oběti po napadení. Bylo zjištěno, že útočící pes byl křížencem amerického stafordširského teriéra. Majitel i jeho pes tohoto incidentu byli identifikováni a potrestáni (Clarke & Vandenberg 2010).



Obr. 17: Část trička ženy, kterou napadl pes. Na foto jsou zřetelně vidět bílé uschlé skvrny slin, které zanechal pes při útoku. Z nichž byl získán psí profil DNA (Clarke & Vandenberg 2010)

Další situace, kdy může být použita forenzní analýza s využitím STR markerů, je při napadení zvířete jiným zvířetem. V jednom takovém případě byla zabita kočka přímo v domě majitele. Podezření padlo na dva psy, kteří bloudili po okolních ulicích. U jednoho z nich byly zjištěny krvavé rány na hlavě, které mohl pes obdržet při proniknutí do domu přes dvířka pro zvířata. Při odchycení byla u těchto psů provedena analýza DNA pomocí bukalního stěru a následně srovnávací analýza krve z ran psa a krvavých stop, které byly nalezeny na dvířkách. Výsledky ukázaly, že kočka byla zabita pouze jedním z podezřelých psů (Clarke & Vandenberg 2010).



Obr. 18: Část dvířek pro zvířata s viditelnými stopami krve, ze kterých byl získán profil DNA psa (Clarke & Vandenberg 2010).

Lokus	Vzorek krve z místa zločinu	Referenční vzorek od podezřelého psa č.1	Referenční vzorek od podezřelého psa č.2
PEZ1	119, 119	119, 119	123, 123
FHC2054	164, 168	164, 168	156, 172
FHC2010	233, 233	233, 233	233, 233
PEZ16	300, 304	300, 304	300, 304
PEZ5	111, 111	111, 111	107, 107
PEZ20	185, 189	185, 189	177, 181
PEZ12	275, 275	275, 275	279, 279
PEZ3	132, 138	132, 138	135, 138
PEZ6	191, 191	191, 191	190, 194
PEZ8	242, 246	242, 246	234, 238
FHC2079	275, 279	275, 279	283, 283

Obr. 19: Srovnávací analýza 11-ti lokusů STR markerů DNA extrahovaných ze vzorků krve (z místa zločinu a dvou podezřelých psů). Na obrázku je vidět, že alely podezřelého psa č.1 a alely ze vzorku krve z místa zločinu jsou identické, což svědčí o vniknutí psa č.1 do domu a zabití kočky (Clarke & Vandenberg 2010).

3.4.2 Populační genetika

Velký počet studií využívá genomickou informaci psů především pro posouzení rozmanitosti nebo historie a struktury populace u vlků, což umožňuje lépe studovat a kontrolovat ohrožené populace (Asch & Pereira 2010). Na druhou stranu má genetická podobnost vlka a psa i své nevýhody. Hlavní nevýhodou je možnost mezidruhového křížení a následné narození hybridů, což může negativně působit na čistotu genofondu u volně žijících vlků (Verardi et al. 2006). Touto problematikou se zabývá řada studií jako je například práce od Iacolina et al. (2010), která studovala stupeň introgrese v populaci italských vlků pomocí analýzy variability mikrosatelitů umístěných na Y chromozomu. Podobná práce byla provedena také v Iránu. Zde Rasoul Khosravi et al. (2013) provedl analýzu mikrosatelitů u jedinců vlka indického (*Canis lupus pallipes*) a zjistil, že v Iránu dochází k hybridizaci mezi vlky a psy stejně jako v jiných zemích pouze sporadicky, a může představovat nebezpečí pro populaci vlků.

Analýza STR markerů je také často používána v chovu hospodářských zvířat. V případě zabití hospodářských zvířat neznámým predátorem je možné provést analýzu slin z ran mrtvého živočicha a identifikovat druhovou příslušnost predátora. Chovatel může dostat náhradu škody, jestliže škody na stádu způsobila volně žijící šelma. Nicméně nejen vlk nebo rys může napadnout hospodářské zvíře. Proto je pro získání náhrady škody nezbytné identifikovat útočnicka. Genetická identifikace je vždy podporována výsledky veterinární pitvy, což umožňuje poskytnout důkazy, které napomáhají k správnému určení druhu, pohlaví a stanovení individuálního genetického profilu predátorů hospodářských zvířat. Tyto faktory usnadní zjištění dynamiky útoku a hodnocení vlivu volně žijících šelem na hospodářství. Například Caniglia et al. (2012) analyzoval 33 vzorků DNA slin, které získal z 13 mrtvých ovcí a koní v centrální části Itálie, jež byly pravděpodobně zabity vlky. Výsledky ukázaly, že pouze 8 zvířat bylo usmrceno vlky (1 samcem a 4 samicemi). Tyto metody identifikace jsou široce používány nejen v západní části Evropy, ale i v její severní části. Například Plumer et al. (2018) se ve své studii snažila zhodnotit podíl vlků a psů zapojených do zabíjení ovcí a vyvinout citlivou genetickou analýzu, která by mohla umožnit lepší odlišení vlků a domácích psů. V Estonsku bylo dokonce analyzováno celkem 183 vzorků slin predátorů, které byly získány z ran zabitých ovcí. Analýza určila druh predátora ve 143 případech (78 %). Ovce byly nejčastěji zabity vlky (81 %), avšak podíl zabíjení ze strany psů byl značný (15 %).

3.4.3 Chovatelství

Určení paternity a plemenné příslušnosti jedince je nezbytnou součástí v chovatelství domácích zvířat. Pro tyto účely jsou nejčastěji používány mikrosatelity. Důvodem je, že testy založené na těchto mikrosatelitech jsou snadněji interpretovány ve srovnání se složitějšími metodami (Zajc & Sampson 1996).

Existuje řada důvodů k testování DNA u domácích zvířat jako jsou například:

- identifikace – zodpovědní chovatelé se snaží vždy uvést skutečné rodiče v registrech, ale někdy vznikají otázky o důvěryhodnosti otce. DNA profilování umožňuje porovnávat lokusy STR markerů rodičů a potomků, a tím získat potvrzení o jejich příbuznosti. Také může nastat situace, kdy je vyžadována spolehlivá identifikace psa (například při ztrátě nebo krádeži psa). Mikročipy mohou být nahrazeny, tetování může být zničeno, takže jediný naprosto spolehlivý způsob, jak identifikovat psa, je získání DNA profilu pomocí analýzy mikrosatelitů (Binns et al. 1995);
- udržování genetické rozmanitosti – genetická rozmanitost znamená rozdíl genových forem v individuálním genomu. Čím více podobných genových forem pes zdědí, tím pravděpodobnější je, že bude trpět nemocemi a dalšími problémy způsobenými inbrídingem (Calboli et al. 2008);
- zodpovědný chov psů – zárukou toho, že pes bude zdravý, je pořízení štěněte u zodpovědného chovatele, který bere v úvahu zdraví jedinců budoucích generací. Pokud má pes dědičné choroby, musí být vyloučen z dalšího chovu;

4 Závěr

V této bakalářské práci byla sestavena literární rešerše o využití STR markerů DNA u zástupců čeledi psovitých šelem. Tematicky se práce zabývala následujícími okruhy:

- Charakterizací taxonu psovitých šelem a některých jejich zástupců.
- Popisem vhodných metod a postupů odběru vzorků a izolaci DNA pro domácí a volně žijící druhy živočichů.
- Genetickou charakterizací mikrosatelitů.
- Popisem molekulárně genetických technik, které jsou nejčastěji používány pro analýzu mikrosatelitů.
- Příklady využití mikrosatelitních markerů ve forenzní analýze, populační genetice a chovatelství.

5 Literatura

- ARDALAN, Arman, et al. Comprehensive study of mtDNA among Southwest Asian dogs contradicts independent domestication of wolf, but implies dog–wolf hybridization. *Ecology and evolution*, 2011, 1.3: 373-385.
- AUKENOV N. E., MASABAEVA M. R., CHASANOVA U. U. 2014. ISOLATION AND PURIFICATION OF NUCLEIC ACIDS. STATE OF THE PROBLEM AT THE PRESENT STAGE. Semey State Medical University. Semey.
- AXELSSON, Erik, et al. The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature*, 2013, 495.7441: 360-364.
- BARTLETT, John MS; STIRLING, David (ed.). PCR protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2003.
- BEISIEGEL, B. de M.; ZUERCHER, Gerald L. *Speothos venaticus*. *Mammalian Species*, 2005, 783.1: 1-6.
- BHARGAVA, Atul; FUENTES, F. F. Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular biotechnology*, 2010, 44.3: 250-266.
- BINNS, M. M., et al. Dog parentage testing using canine microsatellites. *Journal of Small Animal Practice*, 1995, 36.11: 493-497.
- BOYKO, Adam R., et al. Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106.33: 13903-13908.
- BREEN, Matthew. Canine cytogenetics—from band to basepair. *Cytogenetic and genome research*, 2008, 120.1-2: 50-60.
- BREEN, Matthew; BULLERDIEK, Joern; LANGFORD, Cordelia F. The DAPI banded karyotype of the domestic dog (*Canis familiaris*) generated using chromosome-specific paint probes. *Chromosome Research*, 1999, 7.5: 401-406.
- BUSCHIAZZO, Emmanuel; GEMMELL, Neil J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays*, 2006, 28.10: 1040-1050.
- BYČKOV V.S. 2017. Клинико-морфологическое обоснование репаративных процессов при дентальной имплантации у собак. Московский государственный университет пищевых производств. Moskva.
- CALBOLI, Federico CF, et al. Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. *Genetics*, 2008, 179.1: 593-601.
- CANIGLIA, Romolo, et al. Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches. *Forensic Science International: Genetics*, 2013, 7.3: 397-404.
- CARRANO, Matthew T. Morphological indicators of foot posture in mammals: a statistical and biomechanical analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1997, 121.1: 77-104.
- CIUCCI, Paolo, et al. Dewclaws in wolves as evidence of admixed ancestry with dogs. *Canadian Journal of Zoology*, 2003, 81.12: 2077-2081.
- CLARK, Howard O. *Otocyon megalotis*. *Mammalian Species*, 2005, 2005.766: 1-5.
- CLARKE, Melanie; VANDENBERG, Nicholas. Dog attack: the application of canine DNA profiling in forensic casework. *Forensic science, medicine, and pathology*, 2010, 6.3: 151-157.

- COPE, Edward Drinker. On the genera of Felidae and Canidae. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1879, 168-194.
- DAHM, Ralf. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human genetics*, 2008, 122.6: 565-581.
- DOSTÁL J. 2007. *Genetika a šlechtění plemen psů*. Praha.
- EDWARDS, Mary C.; GIBBS, Richard A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research*, 1994, 3.4: S65-S75.
- EICHMANN, Cordula, et al. Estimating the probability of identity in a random dog population using 15 highly polymorphic canine STR markers. *Forensic science international*, 2005, 151.1: 37-44.
- ELLEGREN, Hans. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, 2004, 5.6: 435-445.
- FINARELLI, John A. Testing hypotheses of the evolution of encephalization in the Canidae (Carnivora, Mammalia). *Paleobiology*, 2008, 34.1: 35-45.
- FONDON, John W.; GARNER, Harold R. Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101.52: 18058-18063.
- GALINSKAJA T. V., SCHEPETOVA D. M., LYSENKOVE S. N. 2019. Prejudices Against Microsatellite Studies and How to Resist Them. Department of Entomology, Lomonosov Moscow State University. Moscow
- GILMIJAROVA F. N., KOLOTJEVA N. A., GUSJAKOVA O.A., SIDOROVA I. F. 2017. Полимеразная цепная реакция. История открытия. Новый этап развития. ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет. Samara.
- GLIK B. 2002. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Москва.
- GRAPHODATSKY, A. S.; BEKLEMISHEVA, V. R.; DOLF, G. High-resolution GTG-banding patterns of dog and silver fox chromosomes: description and comparative analysis. *Cytogenetic and Genome Research*, 1995, 69.3-4: 226-231.
- GYMREK, Melissa, et al. Abundant contribution of short tandem repeats to gene expression variation in humans. *Nature genetics*, 2016, 48.1: 22-29.
- HEARN, R. P.; ARBLASTER, K. E. DNA extraction techniques for use in education. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2010, 38.3: 161-166.
- HEID, Christian A., et al. Real time quantitative PCR. *Genome research*, 1996, 6.10: 986-994.
- HEIGER D. 2000. High performance capillary electrophoresis. Germany.
- HEINRICH, Ronald E.; STRAIT, Suzanne G.; HOUDE, Peter. Earliest Eocene Miacidae (Mammalia: Carnivora) from northwestern Wyoming. *Journal of Paleontology*, 2008, 82.1: 154-162.
- HELLMANN, Andreas P., et al. A proposal for standardization in forensic canine DNA typing: allele nomenclature of six canine-specific STR loci. *Journal of forensic sciences*, 2006, 51.2: 274-281.
- HOSHI, Osamu; USHIKI, Tatsuo. Three-dimensional structure of G-banded human metaphase chromosomes observed by atomic force microscopy. *Archives of histology and cytology*, 2001, 64.5: 475-482.

- HOUGH, Jean Ringier. The auditory region in some members of the Procyonidae, Canidae and Ursidae: its significance in the phylogeny of the Carnivora. *Bulletin of the AMNH*; v. 92, article 2. 1948.
- CHAMBERS, Geoffrey K.; MACAVOY, Elizabeth S. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 126.4: 455-476.
- CHIEN, Alice; EDGAR, David B.; TRELA, John M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of bacteriology*, 1976, 127.3: 1550-1557.
- CHISTIYAKOV, Dimitry A.; HELLEMANS, Bart; VOLCKAERT, Filip AM. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 2006, 255.1-4: 1-29.
- CHRAMBACH, Andreas; RODBARD, Dt. Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science*, 1971, 172.3982: 440-451.
- IACOLINA, Laura, et al. Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves: a contribution to the study of wolf-dog hybridization patterns. *Mammalian Biology*, 2010, 75.4: 341-347.
- IANNUZZI, L. G-and R-banded prometaphase karyotypes in cattle (*Bos taurus* L.). *Chromosome Research*, 1996, 4.6: 448-456.
- Ignateva A. A. 2007. PCR diagnostics: advantages and disadvantages. The Bashkir State Agrarian University. Ufa, Russia.
- INNIS, Michael A.; GELFAND, David H. Optimization of pers. PCR protocols: A guide to methods and applications, 1990, 3: 12.
- JIMÉNEZ, J. E. Ecology of a coastal population of the critically endangered Darwin's fox (*Pseudalopex fulvipes*) on Chiloé Island, southern Chile. *Journal of Zoology*, 2007, 271.1: 63-77.
- JOSHI, Mohini; DESHPANDE, J. D. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2010, 2.1: 81-97.
- KHOSRAVI, Rasoul; REZAEI, Hamid Reza; KABOLI, Mohammad. Detecting hybridization between Iranian wild wolf (*Canis lupus pallipes*) and free-ranging domestic dog (*Canis familiaris*) by analysis of microsatellite markers. *Zoological Science*, 2013, 30.1: 27-34.
- KIRKNESS, Ewen F., et al. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science*, 2003, 301.5641: 1898-1903.
- KIT, Saul. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *Journal of molecular biology*, 1961, 3.6: 711-IN2.
- KODÍČEK M., VALENTOVÁ O., HYNEK R. 2015. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha.
- KOHLHEYER, Dietrich, et al. Miniaturizing free- flow electrophoresis—a critical review. *Electrophoresis*, 2008, 29.5: 977-993.
- КОМАРОВА N.V., КАМЕНТСЕВ J.S. 2008. ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ СИСТЕМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА «КАПЕЛЬ». СПб.: ООО «Веда». Sankt-Peterburg.

- LARSON, Greger, et al. Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109.23: 8878-8883.
- LEVINSON, Gene; GUTMAN, George A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular biology and evolution*, 1987, 4.3: 203-221.
- LI, You- Chun, et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*, 2002, 11.12: 2453-2465.
- LIN, Jin-Ming, et al. Separation and determination of some stereoisomers by capillary gel electrophoresis with cyclodextrin incorporated in polyacrylamide gel. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 1996, 354.4: 451-454.
- LINDBLAD-TOH, Kerstin, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 2005, 438.7069: 803-819.
- LIPINSKI, M. J., et al. An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*). *Animal genetics*, 2007, 38.4: 371-377.
- LITT, Michael; LUTY, Jeffrey A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 1989, 44.3: 397.
- LYONS, Leslie A., et al. Acceptance of domestic cat mitochondrial DNA in a criminal proceeding. *Forensic Science International: Genetics*, 2014, 13: 61-67.
- LYRAS, George A.; VAN DER GEER, Alexandra AE. External brain anatomy in relation to the phylogeny of Caninae (Carnivora: Canidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2003, 138.4: 505-522.
- CLARK, Howard O. *Otocyon megalotis*. *Mammalian Species*, 2005, 2005.766: 1-5.
- Macherey-Nagel GmbH & Co. 2014. User manual NucleoSpin® Tissue. Neumann-Neander-Str. 6–8 · 52355 Düren. Germany.
- MELLERSH, Cathryn S., et al. A linkage map of the canine genome. *Genomics*, 1997, 46.3: 326-336.
- MICHAEL, Todd P., et al. Simple sequence repeats provide a substrate for phenotypic variation in the *Neurospora crassa* circadian clock. *Plos one*, 2007, 2.8: e795.
- MOXON, E. Richard, et al. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *reproduction*, 1998, 10: 14.
- MULLIS, Kary B. The polymerase chain reaction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1994, 33.12: 1209-1213.
- MULLIS, Kary B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 1990, 262.4: 56-65.
- NANOVA O. G. 2009. СТРУКТУРА МОРФОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРИЗНАКОВ ЧЕРЕПА И ЗУБОВ ТРЁХ ВИДОВ ХИЩНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (МАММАЛИА: САРНИВОРА). Московский государственный университет. Moskva.
- National institute of standards and technology. HEADQUARTERS 100 Bureau Drive Gaithersburg, MD 20899 301-975-2000. Available from <https://strbase.nist.gov/dogSTRs.htm>
- OLIVEIRA, Eder Jorge, et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 2006, 29.2: 294-307.

- PARK, Kiyun, et al. Linkage of the locus for canine dewclaw to chromosome 16. *Genomics*, 2004, 83.2: 216-224.
- PEARSON, Christopher E.; EDAMURA, Kerrie Nichol; CLEARY, John D. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6.10: 729-742.
- PLUMER, Liivi, et al. Assessing the roles of wolves and dogs in livestock predation with suggestions for mitigating human–wildlife conflict and conservation of wolves. *Conservation Genetics*, 2018, 19.3: 665-672.
- RÅDSTRÖM, Peter, et al. Pre-PCR processing. *Molecular biotechnology*, 2004, 26.2: 133-146.
- RICHARD, Guy-Franck; KERREST, Alix; DUJON, Bernard. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2008, 72.4: 686-727.
- RICHARD, Guy- Franck; PÂQUES, Frédéric. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO reports*, 2000, 1.2: 122-126.
- RICHARD, Murielle; THORPE, Roger S. Can microsatellites be used to infer phylogenies? Evidence from population affinities of the Western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 20.3: 351-360.
- SAVOLAINEN, Peter, et al. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 2002, 298.5598: 1610-1613.
- SHUTLER, Gary G., et al. Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. *Journal of Forensic Science*, 1999, 44.3: 623-626.
- STRUČKOVA I.V., KALJASOVA E.A. 2012. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА БЕЛКОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. Национальный исследовательский университет. Nižnij Novgorod.
- SUCHLÝ I. 2015. Velká ilustrovaná kynologická encyklopedie. Praha.
- ŠMARDÁ, J., DOŠKAR, J., PANTŮČEK, R., RUŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. 2005. *Metody molekulární biologie*, 1. vydání, Vydavatelství MU, Brno - Kraví Hora.
- TABERLET, Pierre; WAITS, Lissette P.; LUIKART, Gordon. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in ecology & evolution*, 1999, 14.8: 323-327.
- TOM, Bradley K., et al. Development of a nomenclature system for a canine STR multiplex reagent kit. *Journal of forensic sciences*, 2010, 55.3: 597-604.
- TÓTH, Gábor; GÁSPÁRI, Zoltán; JURKA, Jerzy. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research*, 2000, 10.7: 967-981.
- TRUT L.N. 2007. DOMESTICATION OF ANIMALS AS THE HISTORICAL PROCESS AND AS THE EXPERIMENT. Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk
- VAN ASCH, Barbara, et al. A new autosomal STR nineplex for canine identification and parentage testing. *Electrophoresis*, 2009, 30.2: 417-423.
- VAN ASCH, Barbara; PEREIRA, Filipe. State-of-the-art and future prospects of canine STR-based genotyping. *The Open Forensic Science Journal*, 2010, 3.1.
- VAN DE GOOR, L. H. P.; PANNEMAN, H.; VAN HAERINGEN, W. A. A proposal for standardization in forensic bovine DNA typing: allele nomenclature of 16 cattle- specific short tandem repeat loci. *Animal genetics*, 2009, 40.5: 630-636.

- VAN DE GOOR, L. H. P.; PANNEMAN, H.; VAN HAERINGEN, W. A. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci. *Animal Genetics*, 2010, 41.2: 122-127.
- VANGUILDER, Heather D.; VRANA, Kent E.; FREEMAN, Willard M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 2008, 44.5: 619-626.
- VAYSSE, Amaury, et al. Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. *PLoS Genet*, 2011, 7.10: e1002316.
- VERARDI, Andrea; LUCCHINI, Vittorio; RANDI, Ettore. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular ecology*, 2006, 15.10: 2845-2855.
- WAITS, Lissette P.; PAETKAU, David. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *The Journal of Wildlife Management*, 2005, 69.4: 1419-1433.
- WANG, Xiaoming; TEDFORD, Richard H. *Dogs: their fossil relatives and evolutionary history*. Columbia University Press, 2008.
- WAYNE, Robert K., et al. Molecular systematics of the Canidae. *Systematic biology*, 1997, 46.4: 622-653.
- WELLER, Peter, et al. Organization of the human myoglobin gene. *The EMBO journal*, 1984, 3.2: 439-446.
- WICTUM, Elizabeth, et al. Developmental validation of DogFiler, a novel multiplex for canine DNA profiling in forensic casework. *Forensic Science International: Genetics*, 2013, 7.1: 82-91.
- WILKINS, Adam S.; WRANGHAM, Richard W.; FITCH, W. Tecumseh. The “domestication syndrome” in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics*, 2014, 197.3: 795-808.
- ZAJC, Irena; SAMPSON, Jeff. DNA microsatellites in domesticated dogs: application in paternity disputes. *Pflügers Archiv*, 1996, 431.6: R201-R202.
- ZÁRUBA K. a kol. 2016. *Analytická chemie 2. díl*. Praha.

