

Podívejte se na diskuse, statistiky a profily autorů této publikace na adrese: <https://www.researchgate.net/publication/235375792>.

# Genomický podpis domestikace psa odhaluje adaptaci na stravu bohatou na škrob

Článek v časopise Nature - leden 2013

DOI: 10.1038/nature11837 - Zdroj: PubMed

CITACE

863

ČTENÍ

25,432

10 autorů, včetně:



**Erik Axelsson**

Uppsala University

115 PUBLIKACÍ 6 287 CITACÍ

PODÍVEJTE SE  
NA PROFIL



**Maja-Louise Arendt**

Uppsala University

69 PUBLIKACÍ 1 469 CITACÍ

PODÍVEJTE SE  
NA PROFIL



**Matthew T Webster**

Uppsala University

247 PUBLIKACÍ 12 574 CITACÍ

PODÍVEJTE SE  
NA PROFIL

# Genomický podpis domestikace psa odhaluje adaptaci na stravu bohatou na škrob

Erik Axelsson<sup>1</sup>, Abhirami Ratnakumar<sup>1</sup>, Maja-Louise Arendt<sup>1</sup>, Khurram Maqbool<sup>1</sup>, Matthew T. Webster<sup>1</sup>, Michele Perloski<sup>2</sup>, Olof Liberg<sup>3</sup>, Jon M. Arnemo<sup>4,5</sup>, Åke Hedhammar<sup>6</sup> a Kerstin Lindblad-Toh<sup>1,2</sup>

Domestikace psů byla důležitou epizodou ve vývoji lidské civilizace. O přesném načasování a místě této události se vedou diskuse<sup>1-5</sup> a o genetických změnách, které provázely přeměnu dálných vlků v domácí psy, se ví jen málo. V této práci provádíme resekvenování celého genomu psů a vlků s cílem identifikovat 3,8 milionu genetických variant, které slouží k určení 36 genomických oblastí, které pravděpodobně představují cíle selekce během domestikace psa. Devatenáct z těchto oblastí obsahuje geny důležité pro funkci mozku, z nichž osm patří k vývojovým drahám nervové soustavy a potenciálně jsou základem změn chování, které jsou ústřední pro domestikaci psa<sup>6</sup>. Deset genů s klíčovou rolí v trávení škrobu a metabolismu tuků rovněž vykazuje signály selekce. Identifikujeme kandidátní mutace v klíčových genech a poskytujeme funkční podporu pro zvýšené trávení škrobu u psů ve srovnání s vlky. Naše výsledky naznačují, že nové adaptace umožňující raným předkům moderních psů prospívat na stravě bohaté na škrob v porovnání s masožravou stravou vlků představovaly klíčový krok v rané domestikaci psů.

Domácí zvířata mají pro moderní lidskou společnost zásadní význam a je pravděpodobné, že prvním domestikovaným zvířetem byl pes. Mezi tvrzení o prvních zkaamených pozůstatcích psů patří 33 000 let stará psovitá šelma z pohoří Altaj na Sibiři<sup>1</sup>, zatímco fosilie z doby před 12 000 až 11 000 lety př. n. l. nalezené spolu s lidmi v Izraeli<sup>2</sup> by mohly představovat nejstarší ověřené pozůstatky psa. Vzorce genomické variability naznačují, že domestikace psa začala nejméně 10 000 let BP<sup>3,4</sup> v jihovýchodní Asii<sup>4</sup> nebo na Blízkém východě<sup>5</sup>. Domestikace psa však mohla být složitější a zahrnovat více zdrojových populací a/nebo zpětné křížení s vlky.

Není jasné, proč a jak byli psi domestikováni. Je možné, že lidé odchytávali vlčí štěňata, aby je používali k hlídání nebo lovu, což vedlo k selekci vlastností důležitých pro tyto nové role. Případně, když lidé na úsvitu zemědělské revoluce přešli od kočovného k usedlému způsobu života, vlci mohli být sami přilákáni na skládky v blízkosti prvních lidských sídel, aby zde shromažďovali odpadky<sup>6</sup>. Přirozený výběr vlastností umožňujících efektivní využívání těchto nových zdrojů mohl vést k evoluci různých druhů vlků mrchožroutů, kteří se stali předky moderních psů. Bez ohledu na to, jak domestikace psů začala, několik znaků odlišujících moderní psy od vlků, včetně snížené agresivity a změněných schopností sociálního poznávání<sup>7</sup>, naznačuje, že změny chování byly raným cílem tohoto procesu<sup>6</sup>. Psi se od vlků liší také morfologicky, vykazují zmenšenou lebku, zuby a velikost mozku<sup>6</sup>. Umělá selekce na krotkost u stříbrných lišek naznačuje, že selekce na genetickou variabilitu vývojových genů může být základem behaviorálních i morfologických změn, což může představovat důležitý mechanismus v průběhu domestikace zvířat<sup>7,8</sup>.

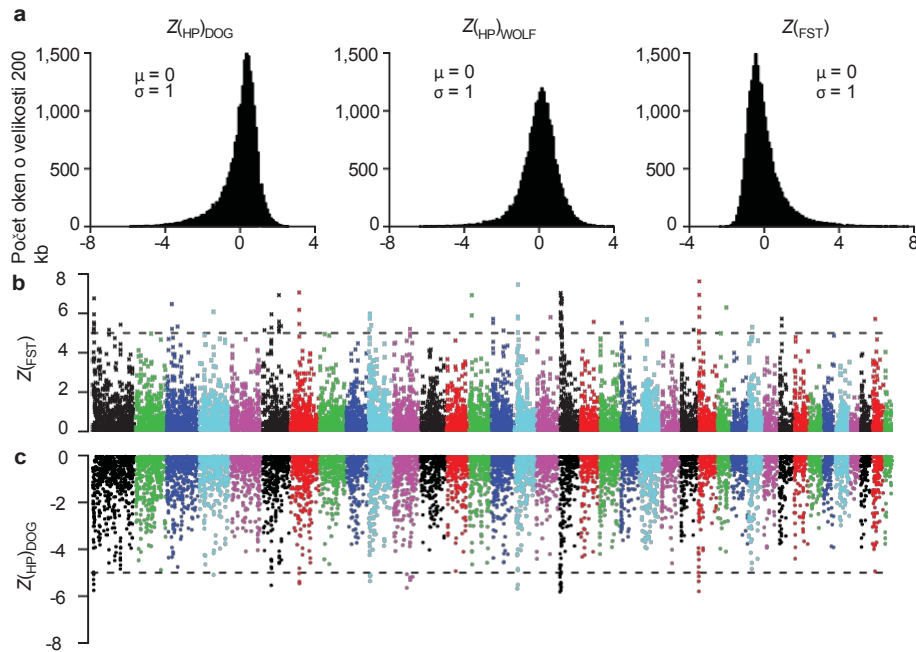
V současné době bylo u domácích zvířat identifikováno pouze několik genů, které oddělují divoké formy od domácích, včetně srsti.

barevné varianty v *MC1R* u prasat<sup>9</sup> a mutace v *TSHR*, která pravděpodobně ovlivňuje sezónní reprodukci u kuřat<sup>10</sup>, ale pokud je nám známo, u psů dosud nebylo provedeno žádné celogenomové sekvenční vyhledávání. Abychom identifikovali genomické oblasti podléhající selekci při domestikaci psů, provedli jsme sdružené resekvenování celého genomu psů a vlků s následnou funkční charakterizací kandidátních genů.

Unikátně umístěná sekvenční čtení ze sdružené DNA reprezentující 12 vlků s celosvětovým výskytem a 60 psů 14 různých plemen (doplňková tabulka 1) pokrývala 91,6 %, resp. 94,6 % z 2 385 megabází (Mb) autozomální sekvenční sestavy genomu CanFam 2.0<sup>11</sup>. Hloubka zarovnaného pokrytí byla 29,83 pro všechny skupiny psů dohromady a 6,23 pro jedinou skupinu vlků (Doplňková tabulka 1 a Doplňkový obr. 1). V kombinovaných datech psů a vlků jsme identifikovali 3 786 655 putativních jednonukleotidových polymorfismů (SNP), z nichž 1 770 909 (46,8 %) bylo segregančních pouze v poolu psů, zatímco 140 818 (3,7 %) bylo soukromých pro vlky (Doplňková tabulka 2). Podobně jsme zjistili 506 148 krátkých indelů a 26 619 změn v počtu kopií (CNV) (Doplňkové soubory 1 a 2). Experimentálně se nám podařilo ověřit 113 ze 114 testovaných SNP (Doplňková tabulka 3 a Doplňková diskuse, část 1).

Abychom odhalili signály silné nedávné selekce, hledali jsme v genomu psa oblasti se sníženou souhrnnou heterozygotností ( $H_p$ )<sup>10</sup> a/nebo zvýšenou genetickou vzdáleností od vlka ( $F_{ST}$ ). Jak je patrné ze zkresleného rozložení skóre heterozygotnosti u psa ve srovnání s vlkem (obr. 1a a doplňkový obr. 2), hlavní výzvou tohoto přístupu je oddělit skutečné signály selekce od signálů způsobených náhodnou fixací velkých genomických oblastí během formování psích plemen<sup>11</sup>. Tento problém zmiřujeme tím, že před analýzami selekce kombinujeme sekvenční data ze všech psích skupin a požadujeme, aby zjištěné signály pokrývaly alespoň 200 kilobází (kb; Metody a Doplňková diskuse, části 2 a 3). Vzhledem ke složité a částečně neznámé demografické historii psů je navíc obtížné přiřadit přísné prahové hodnoty, které by rozlišovaly selekci a drift. Navrhujeme, že nejlepším způsobem, jak ověřit zde zjištěné oblasti, je studovat genetické údaje od dalších jedinců a poskytnout důkazy o funkčních změnách spojených s domněle selektovanými oblastmi. Nakonec mohou náznaky, že se podobné cesty změnily během nezávislých domestikacích událostí, poskytnout přesvědčivé důkazy o selekci. Zde jsme Z-transformovali autozomální  $H_p$  ( $Z(H_p)$ ) a  $F_{ST}$  ( $Z(F_{ST})$ ) distribuce (pro analýzu chromozomu X viz Doplňková diskuse, oddíl 4) a zaměřili jsme náš popis domněle selektovaných oblastí na ty, které spadají alespoň pět směrodatných odchytek od průměru ( $Z(H_p) > 2,5$  a  $Z(F_{ST}) < -5$ ), protože představují krajní konce rozdělení. Při použití těchto prahových hodnot jsme v genomu psa identifikovali 14 oblastí s extrémně nízkou úrovní heterozygotnosti (průměrná délka 5 400 kb, průměrná  $H_p$  5 0,036 (rozmezí 0,015-0,056), průměrná autozomální  $H_p$  5 0,331) (Obr. 1c a Doplňková tabulka 4) a 35 oblastí se silně zvýšenými hodnotami  $F_{ST}$  (průměrná délka 5 340 kb, průměrná hodnota

Cambridge, Massachusetts 02139, USA. <sup>3</sup>Výzkumná stanice Grimsö Wildlife Research Station, Department of Ecology, Swedish University of Agricultural Sciences, 73091 Riddarhyttan, Švédsko. <sup>4</sup>Department of Forestry and Wildlife Management, Faculty of Applied Ecology and Agricultural Sciences, Hedmark University College, Campus Evenstad, NO-2418 Elverum, Norsko. <sup>5</sup>Katedra divoké zvěře, ryb a environmentálních studií, Fakulta lesnických věd, Švédská univerzita zemědělských věd, 901 83 Umeå, Švédsko. <sup>6</sup>Laboratoř vědy pro život, Katedra klinických věd, Švédská univerzita zemědělských věd, 75651 Uppsala, Švédsko.



Obrázek 1 | Seleční analýzy identifikovaly 36 kandidátních domestikáčních oblastí. a, Rozložení  $Z$ -transformované průměrné sdružené heterozygotnosti u psa ( $Z(H)_{PDOG}$ ) a vlka ( $Z(H)_{PWOLF}$ ), respektive průměrný index fixace ( $Z(F_{ST})$ ), pro autozomální 200 kb okna ( $s$ , směrodatná odchylka;  $m$ , průměr). b, Kladný konec rozdělení ( $Z(F_{ST})$ ) vyneseny podél psa

autosomy 1-38 (chromosomy jsou barevně odlišeny). Přerušovaná vodorovná čára označuje mezní hodnotu ( $Z = 5$ ) použitou pro vyčlenění odlehlých hodnot. c, Záporný konec rozdělení ( $Z(H_p)$ ) vyneseny podél psích autosomů 1-38. Přerušovaná vodorovná čára označuje mezní hodnotu ( $Z > 25$ ) použitou pro vyčlenění odlehlých hodnot.

$F_{ST} = 0,734$  (rozmezí 0,654-0,903), průměrná autozomální  $F_{ST} = 0,223$  (obr. 1b a doplňková tabulka 5). Všechny oblasti  $F_{ST}$  se vyznačují nízkou úrovní heterozygoty u psa nebo vlka (ačkoli všechny nepřekračují práh  $Z(H_p) > 25$ ), což naznačuje, že obě statistiky detekují stejné události (Metody a doplňková diskuse, části 2 a 3). Celkem bylo zjištěno 36 unikátních autozomálních kandidátních domestikací.

Oblasti (CDR) obsahující 122 genů byly identifikovány pomocí metody kombinace dvou přístupů (doplňková tabulka 6 a obr. 1b, c). Žádná z těchto oblastí se nepřekrývá s oblastmi z předchozí studie založené na genotypech<sup>5</sup> (Doplňková diskuse, oddíl 3), což zdůrazňuje důležitost identifikace domestikáčních oblastí přímo sekvenováním nebo komplexním zjišťováním SNP u divokých předků před genotypizací.

Hledali jsme významně nadreprezentované termíny genové ontologie mezi geny v autozomálních CDR a identifikovali jsme 25 kategorií, které představují několik skupin vzájemně souvisejících termínů (tabulka 1 a doplňková tabulka 7), z nichž žádná nebyla uvedena v samostatné analýze selekce u vlka (doplňková diskuse, oddíl 8). Nejvýraznější shluk (11 termínů) se týká termínu "vývoj nervové soustavy". Osm genů patřících do této kategorie (Doplňková tabulka 7 a 8) zahrnuje *MBP*, *VWC2*, *SMO*, *TLX3*, *CYFIP1* a *SH3GL2*, z nichž několik ovlivňuje vývojovou signalizaci a synaptickou sílu a plasticitu<sup>12-16</sup>. Prozkoumali jsme publikovanou literaturu a identifikovali jsme dalších 11 genů CDR s funkcí centrálního nervového systému (doplňková tabulka 9), čímž jsme doplnili celkový počet 19 CDR, které obsahují mozkové geny. Tato zjištění podporují hypotézu, že v průběhu domestikace psa byla důležitá selekce na změněné chování a že za těmito změnami mohou stát mutace ovlivňující vývojové geny<sup>7</sup>. Analýza genové ontologie také určila dva geny podílející se na vazbě spermií a vajíčka: *ZPBP* kóduje zona pellucida binding protein, který zprostředkovává vazbu spermií na glykoproteinovou vrstvu zona pellucida (ZP) vajíčka, a *ZP2* kóduje jeden z proteinů, které tvoří samotnou ZP. Kromě toho CDR na chromozomu 6 zahrnuje *PDILT*, který také ovlivňuje vazbu spermií na *ZP*<sup>17</sup>, což dohromady naznačuje, že konkurence spermií mohla být důležitým evolučním faktorem.

sílu při domestikaci psů<sup>18</sup>.

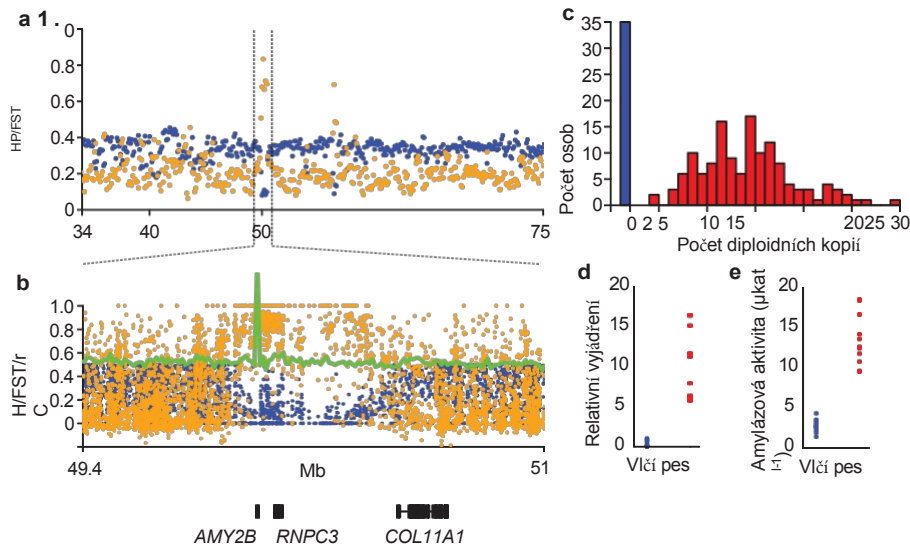
Nadměrně zastoupené termíny "metabolický proces škrobu", "trávení" a "metabolismus mastných kyselin" zahrnují geny zapojené do trávení škrobu (*MGAM*) a příjmu glukózy (*SGLT1*), jakož i kandidátský gen pro

Tabulka 1 | Obohacené termíny genové ontologie mezi geny CDR

Termín genové ontologie	Hodnota $p_{FDR}$	Počet genů
Regulace diferenciace neuronů	0.005	3 (26)
Vícebuněčný proces v organismu	0.005	21 (3,822)
Trávení	0.008	4 (95)
Diferenciace neuronů	0.010	5 (210)
Regulace molekulární funkce	0.011	8 (671)
Vývoj centrální nervové soustavy	0.013	5 (235)
Regulace vývojového procesu	0.013	5 (236)
Generování neuronů	0.013	5 (242)
Vývoj nervového systému	0.013	8 (716)
Vazba spermií na zona pellucida	0.015	2 (12)
Rozpoznávání spermií a vajíček	0.015	2 (12)
Neurogeneze	0.015	5 (262)
Rozpoznávání buněk	0.019	2 (14)
Regulace katalytické aktivity	0.020	7 (605)
Regulace aktivity hydrolázy	0.026	5 (307)
Metabolický proces mastných kyselin	0.031	4 (191)
Vývoj systému	0.034	11 (1,605)
Regulace aktivity GTPázy	0.039	4 (211)
Vývoj anatomické struktury	0.039	12 (2,005)
Intramembranózní osifikace	0.039	1 (1)
Metabolický proces chinolinátu	0.039	1 (1)
Metabolický proces škrobu	0.039	1 (1)
Katabolický proces škrobu	0.039	1 (1)
Katabolický proces glukokortikoidů	0.039	1 (1)
Vývoj buněk	0.039	9 (1,242)

Obohacené termíny jsou barevně označeny tak, aby odrážely příbuznost v ontologii nebo funkční blízkost. Modrá barva - vývoj nervové soustavy; zelená barva - rozpoznávání spermií a vajíček; šedá barva - regulace molekulární funkce; oranžová barva - trávení. U každého termínu počet genů ukazuje počet genů v CDR vzhledem k celkovému počtu anotovaných genů (v závorkách).





Obrázek 2 | Selektce na zvýšenou amylázovou aktivitu. a, Souhrnná heterozygotnost,  $H_p$  (modrá), a průměrný fixační index,  $F_{ST}$  (oranžová), vykreslené pro 200kb okna v oblasti chromozomu 6, kde se nachází *AMY2B*. b, Heterozygotnost,  $H$  (modrá), a fixační index,  $F_{ST}$  (oranžová), pro jednotlivé SNP ve vybrané oblasti. Pes v poměru k pokrytí vlkem, rC (zelená čára), označuje zvýšení počtu kopií *AMY2B*.

inzulínové rezistence (*ACSM2A*), která iniciuje metabolismus mastných kyselin<sup>19</sup>. Celkem 6 CDR ukrývá 10 genů s funkcemi souvisejícími s metabolismem škrobu a tuků (doplňková tabulka 10). Předpokládáme, že genové varianty v rámci těchto genů mohly být selektovány, aby napomohly adaptaci z převážně masožravé stravy na stravu bohatší na škrob během domestikace psa.

Odbourávání škrobu u psů probíhá ve třech fázích: (1) škrob je nejprve ve střevě rozštěpen alfa-amylázou na maltózu a další oligosacharidy; (2) oligosacharidy jsou následně hydrolyzovány maltázou-glukoamylázou<sup>20</sup>, sukrázou a isomaltázou za vzniku glukózy; a (3) nakonec je glukóza transportována přes plazmatickou membránu kartáčovým hraničním proteinem SGLT1<sup>21</sup>. Zde předkládáme důkazy o selekci na všechny tři fáze trávení škrobu během domestikace psa. Zatímco lidé získali aktivitu amylázy ve slinách<sup>22</sup> prostřednictvím starobylé duplikace genu pro pankreatickou amylázu, psi exprimují amylázu pouze ve slinivce<sup>23</sup>. U psů se gen *AMY2B*, kódující alfa-2B-amylázu, nachází v 600-kb CDR na chromozomu 6 se skóre  $Z(H_p)$  a  $Z(F_{ST})$  24,60, resp. 7,16 (obr. 1 a 2a).

Zajímavé je, že 8kb sekvence pokrývající lokus *AMY2B* vykazuje několikanásobný nárůst hloubky zarovnaných čtení u psa oproti vlkovi (obr. 2b), což naznačuje změnu počtu kopií. Formální porovnání regionálního a lokálního pokrytí poolů, respektive pokrytí vlka a psa (Metody), také naznačuje podstatné zvýšení počtu kopií ve všech poolech psa ve srovnání s vlkem v tomto lokusu (Doplňková diskuse,

oddíl 5).

Tuto CNV jsme potvrdili kvantifikací počtu kopií *AMY2B* u 136 psů a 35 vlků (doplňková tabulka 11) pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Zatímco všichni testovaní vlci nesli pouze 2 kopie ( $2N = 2$ ), počet diploidních kopií u psů se pohyboval od 4 do 30 ( $P > 0,001$ , Wilcoxon) (obr. 2c), což odpovídá pozoruhodnému 7,4násobnému průměrnému nárůstu počtu kopií *AMY2B* u psů. Abychom posoudili, zda tato změna odpovídá rozdílu v amylázové aktivitě, porovnali jsme nejprve expresi genu *AMY2B* ve slinivce břišní psa ( $n = 9$ ) a vlka ( $n = 12$ ) a zaznamenali jsme 28krát vyšší průměrnou expresi u psa ( $P > 0,001$ , Wilcoxon, obr. 2d). Poté jsme kvantifikovali aktivitu amylázy ve zmraženém séru (obr. 2e) a zjistili 4,7krát vyšší aktivitu u psa (9,6–18,4 mkat  $I^{21}$  ( $n = 12$ )) oproti vlkovi (1,4–4,3 mkat  $I^{21}$  ( $n = 13$ )) ( $P < 0,001$ , Wilcoxon). Podobné výsledky byly získány při porovnávání

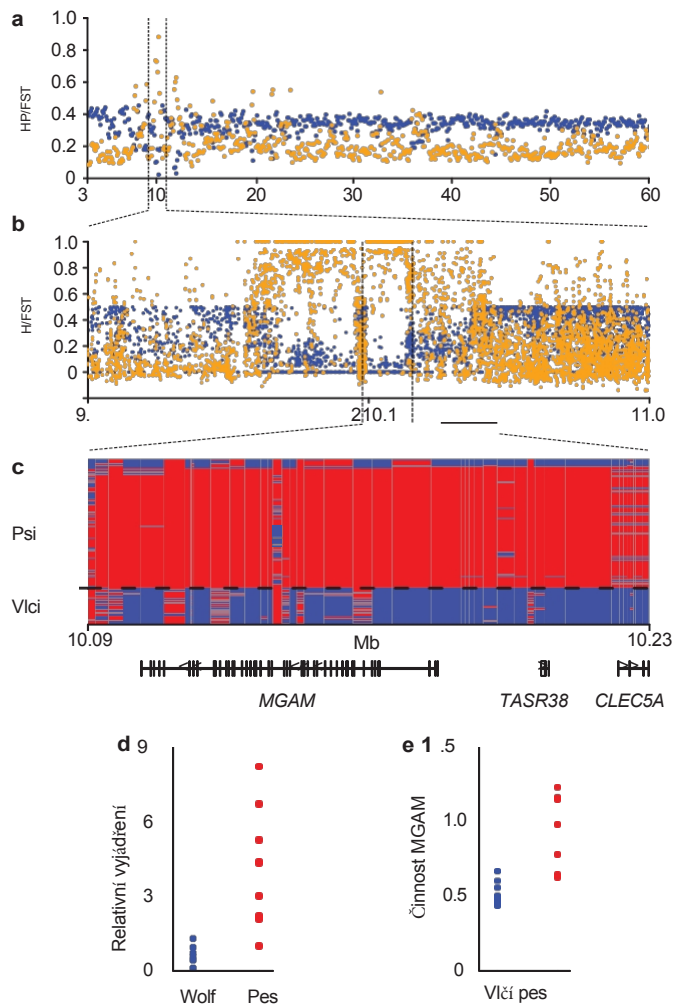
číslo u psa. Geny v této oblasti jsou uvedeny pod panelem b. c, Histogram znázorňující rozložení počtu diploidních kopií amylázy u vlka ( $n = 35$ ) (modře) a psa ( $n = 136$ ) (červeně). d, Úrovně exprese messengerové RNA amylázy v pankreatu vlka ( $n = 12$ ) a psa ( $n = 9$ ). e, Aktivita amylázy v séru vlka ( $n = 13$ ) a psa ( $n = 12$ ).

omezeného počtu čerstvých vzorků (doplňkové tabulky 12 a 13). Změna v kopii genu *AMY2B*

počet spolu s korelovaným zvýšením úrovně exprese ( $\rho = 0,84$ ,  $P = 0,0001$ , Spearman) (doplňkový obr. 3) a enzymové aktivity ( $\rho = 0,63$ ,  $P = 0,01$ , Spearman) (doplňkový obr. 4) naznačuje, že duplikace lokusu alfa-amylázy poskytla raným jedincům selekční výhodu tím, že způsobila zvýšení aktivity amylázy.

Maltáza-glukoamyláza je zodpovědná za druhý krok rozkladu škrobu, katalyzuje hydrolyzu maltózy na glukózu<sup>20</sup>. V lokusu *MGAM* nebyly pozorovány žádné změny počtu kopií, proto jsme se rozhodli studovat haplotypovou diverzitu v této oblasti, abychom usnadnili identifikaci kauzálních variant. Genotypizovali jsme 47 náhodně vybraných SNP u 71 psů reprezentujících 38 různých plemen a 19 vlků s celosvětovým výskytem (označovaných jako "referenční panel", doplňková tabulka 14). Šedesát osm z jednácti testovaných psů neslo alespoň jednu kopii 124 kb dlouhého haplotypu zahrnujícího celý *MGAM* a malý sousední lokus kódující receptor hořké chuti *medi-ating taste receptor 2 member 38* (*TASR38*) (obr. 3a-c). Zatímco žádný z vlků nebyl nositelem vybraného haplotypu, 55 psů pro něj bylo homozygotních, 13 heterozygotních a pouze tři psi jej postrádali (2 west highland white teriéři a 1 čínský chocholatý pes). Tento vysoký stupeň diferenciací haplotypů mezi psy a vlky (průměr  $F_{ST}$  pro genotypované SNP  $\approx 0,75$ ) naznačuje, že tento haplotyp může skrývat genetickou variabilitu, která je pro psy selekčně výhodná (Supplementary Discussion, oddíl 3 a 6).

Identifikovali jsme několik kandidátních mutací v rámci *MGAM*, které mohly být cílem selekce v této oblasti (doplňková tabulka 15). První je konzervativní záměna aminokyseliny v duplikované doméně trefoil *MGAM* (zbytek 1001), která je u vlka téměř fixována na isoleucin a u psa na valin. Jedenáct ze čtrnácti savců má na této pozici valin, zatímco všežravá krysa a hmyzožravý ježek a vačice krátkoocasá nesou stejně jako vlk isoleucin (doplňková tabulka 16). Za druhé, další konzervativní záměna, methionin za valin, umístěná v beta listu enzymu maltázy (zbytek 797), je u vlka segregací, ale u psa je fixována na methionin. Hmyzožravý ježek a střízlík obecný jsou jediní savci bez methioninu na této evolučně konzervované pozici (doplňková tabulka 17) a modelování *in silico* pomocí SDM-serveru naznačuje, že změna methioninu na valin na tomto zbytku je destabilizující<sup>24</sup>. Zatřetí, fixní delece dvou párů bází u psa narušuje stop kodon, čímž prodlužuje karboxy-terminální konec psa.



Obrázek 3 | Selektce je spojena se zvýšenou maltázovou aktivitou. a, Souhrnná heterozygotnost,  $H_p$  (modrá), a průměrný fixační index,  $F_{ST}$  (oranžová), vykreslené pro 200-kb okna v oblasti chromozomu 16, kde se nachází *MGAM*. b, Heterozygotnost,  $H$  (modrá), a index fixace,  $F_{ST}$  (oranžová), pro jednotlivé SNP ve vybrané oblasti. c, Haplotypy odvozené z genotypizace 47 SNP napříč lokusem *MGAM* u 71 psů a 19 vlků (červená a modrá barva jsou hlavní a vedlejší alela psa). Geny v genotypované oblasti jsou uvedeny pod panelem c. d, hladiny exprese mRNA *MGAM* v pankreatu vlka ( $n = 5$ ) a psa ( $n = 5$ ). e, aktivita *MGAM* v séru vlka ( $n = 5$ ) a psa ( $n = 5$ ).

*MGAM* dvěma aminokyselinami: asparaginem a fenylalaninem. U 32 studovaných savců mají pouze býložravci (králík, pika, alpaka a kráva) a všežravci (myši, lemura a potkan) podobné rozšíření jako u psa (doplňková tabulka 18). Čtvrtá kandidátská mutace v intronu 37 ovlivňuje předpokládané vazebné místo pro regulátor metabolismu glukózy NR4A2 proteinu<sup>25</sup> posunutím vlčí sekvence od kanonického vazebného motivu NR4A2. Tři ze čtyř savců s alelou vlka v tomto místě jsou ve velké míře závislí na hmyzu nebo rybách, pokud jde o jejich nutriční potřeby - menty (doplňková tabulka 19).

Abychom rozluštili, zda kandidátní mutace působí primárně na expresi nebo aktivitu proteinu, zkoumali jsme expresi *MGAM* v pankreatu a výslednou enzymatickou aktivitu v séru. Psi vykazovali 12krát vyšší expresi ( $P < 0,001$ , Wilcoxon,  $n_{DOG} = 5$ ,  $n_{WOLF} = 5$ ) (obr. 3d) a dvojnásobné zvýšení obrátu maltózy na glukózu ve srovnání s vlky (průměrná produkce glukózy u psů:  $0,94 DA_{570nm}$  (0,64-1,23,  $n = 5$ ) a u vlků:  $0,52 DA_{570nm}$  (0,44-0,66,  $n = 5$ ),  $P < 0,0012$ , Wilcoxon) (obr. 3e). I když nemůžeme vyloučit, že k tomuto rozdílu přispěla plasticita vyvolaná stravou<sup>26</sup>, naše výsledky naznačují, že mutace ovlivňující vazebné místo NR4A2 nebo jiná neznámá varianta pravděpodobně ovlivňují expresi *MGAM*. Selektce tak může mít zjevně

vedlo ke zvýšené expresi *MGAM*, ale nemůžeme vyloučit, že silná selektce ovlivňující tento lokus mohla podpořit akumulaci změn kódujících proteiny na stejném haplotypu. Podobný scénář byl pozorován u bílé barvy srsti u psů a prasat, kde opakovaná selektce dalších mutací vedla k alelické řadě bílých skvrn v lokusech *MITF*, respektive *KIT*<sup>27</sup>.

Jakmile je škrob stráven na glukózu, je absorbován přes lumenální plazmatickou membránu tenkého střeva pomocí sodíkového/glukózového kotransportéru 1 (*SGLT1*)<sup>21</sup>. Proto by se dalo očekávat, že psi budou mít prospěch ze zvýšené schopnosti trávit škrob a současně se u nich zvýší příjem glukózy. CDR na chromozomu 26 (doplňující obr. 5a, b) zahrnuje *SGLT1* a gen (*SGLT3*), který kóduje glukózu vnímající protein sodík/glukózový kotransportér<sup>328</sup>. Abychom charakterizovali haplotypovou diverzitu, genotypizovali jsme 48 náhodně vybraných SNP napříč tímto CDR v referenčním panelu a identifikovali jsme oblast o velikosti 50,5 kb, která pokrývá 39. úsek *SGLT1* i 39. konec *SGLT3* a která je vysoce divergentní mezi psem a vlkem (doplňkový obr. 5c). V této oblasti byli všichni testovaní psi nositeli určitého haplotypu, z nichž 63 bylo homozygotních a 8 heterozygotních. V porovnání s 19 vlky, u kterých byl jeden jedinec nositelem jedné kopie haplotypu, je to rozdíl. Na základě vysoké diferenciace haplotypů (průměr  $F_{ST}$  pro 18 SNP v 50,5-kb haplotypu  $0,81$ ) je pravděpodobné, že *SGLT1* a jeho 39 oblast představuje další lokus domestikace psa.

Oblast 50,5 kb zahrnuje konzervativní přechod izolocinu na valin. v *SGLT1* (zbytek 244), která ovlivňuje smyčku směřující na a extracelulární stranu lumenální membrány (doplňková tabulka 15). Analýza heterologní exprese<sup>29</sup> ukazuje, že glykosylace na blízkém místě (zbytek 248) ovlivňuje transport glukózy, což naznačuje, že je možné, že psi získali lepší příjem glukózy v důsledku pozorované substituce. Kromě toho vidíme pouze nesignifikanční rozdíly v expresi *SGLT1* ve slinivce břišní psa ( $n = 5$ ) a vlka ( $n = 4$ ) ( $P > 0,39$ , Wilcoxon) (doplňkový obr. 6), což naznačuje, že selektce se primárně zaměřila na strukturální, nikoli regulační mutaci v *SGLT1*.

Závěrem jsme předložili důkaz, že domestikace psa byla doprovázena selekcí na tři geny s klíčovými rolí v trávení škrobu: *AMY2B*, *MGAM* a *SGLT1*. Naše výsledky ukazují, že adaptace které umožnily raným předkům moderních psů prospívat na stravě bohaté na škrob v porovnání s masožravou stravou vlků, představovaly zásadní krok v rané domestikaci psů. To může naznačovat, že hnací silou procesu domestikace mohla být změna ekologické niky a že tuto novou niku mohlo představovat mrchožroutství na skládkách odpadu v blízkosti stále častěji se vyskytujících lidských sídel na úsvitu agrikulturní revoluce<sup>6</sup>. Ve světě předchozích výsledků popisujících načasování a místo domestikace psů mohou naše zjištění naznačovat, že rozvoj zemědělství byl katalyzátorem domestikace psů.

Zde prezentované výsledky ukazují pozoruhodný případ paralelní evoluce, kdy výhody spojené se zvládnutím stravy bohaté na škrob během zemědělské revoluce způsobily podobné adaptační reakce u psa a člověka<sup>30</sup>. To zdůrazňuje, jak mohou poznatky z domestikace psů prospět našemu chápání nedávné evoluce a nemoci člověka. A konečně, pochopením genetického základu adaptivních znaků u psů jsme se přiblížili k odhalení potenciálu při srovnávání psů a vlků k rozluštění genetiky chování.

## SHRNUTÍ METOD

Sekvenování. Před konstrukcí knihovny mate-páru a sekvenováním na systému AB SOLiD, verze 3, jsme použili standardních protokolů výrobce shromáždili genomovou DNA od 12 jedinců. Sekvenáční čtení byla zarovnána k referenční sekvenci CanFam 2.0 pomocí softwaru Bioscope 1.1.

Výběrové analýzy. V kombinovaných datech ze všech souborů jsme identifikovali variabilní místa a pro označení SNP jsme vyžadovali minimálně tři čtení podporující alternativní alelu. Použili jsme počty alel na variabilních místech k identifikaci signálů selektce v oknech o velikosti 200 kb pomocí dvou přístupů: pro každé okno jsme vypočítali (1) průměrnou sruženou heterozygotnost,  $H_p$  (ref. 10), a (2) průměrný index fixace,  $F_{ST}$ , mezi psem a vlkem. Domněle vybrané oblasti byly lokalizovány extrakcí



oken z krajních chvostů rozdělení  $H_p$  a  $F_{ST}$  transformovaných do  $Z$  pomocí s použitím prahové hodnoty 5 směrodatných odchylek.

Funkční testy. Ke kvantifikaci CNV a genové exprese jsme použili multiplexní testy TaqMan a SYBR Green PCR v reálném čase. Aktivita amylázy v séru byla analyzována pomocí přístroje Architect e400 a aktivita maltázy v séru byla kvantifikována na základě množství obratu maltázy na glukózu.

Úplné metodiky a související odkazy jsou k dispozici v online verzi článku.

Přijato 1. července; přijato 11. prosince 2012.

Zveřejněno online 23. ledna 2013.

- Ovodov, N. D. *et al.* 33 000 let starý pes z pohoří Altaj na Sibiři: důkaz nejstarší domestikace narušené posledním glaciálním maximem. *PLoS ONE* 6, e22821 (2011).
- Davis, S. J. M. & Valla, F. R. Důkazy domestikace psa před 12 000 lety v Natufianu v Izraeli. *Nature* 276, 608-610 (1978).
- Skoglund, P., Gotherstrom, A. & Jakobsson, M. Estimation of population divergence times from non-overlapping genomic sequences: examples from dogs and wolves. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1505-1517 (2011).
- Pang, J. F. *a kol.* mtDNA data ukazují na jediný původ psů jižně od řeky Jang-c'-tiang, před méně než 16 300 lety, z četných vlků. *Mol. Biol. Evol.* 26, 2849-2864 (2009).
- vonHoldt, B. M. *et al.* Analýzy SNP a haplotypů v celém genomu odhalují bohatou historii domestikace psa. *Nature* 464, 898-902 (2010).
- Coppinger, R. & Coppinger, L. *Dogs: a Startling New Understanding of Canine Origin, Behaviour and Evolution* (Scribner, 2001).
- Hare, B., Wobber, V. & Wrangham, R. The self-domestication hypothesis: evolution of bonobo psychology is due to selection against aggression. *Anim. Behav.* 83, 573-585 (2012).
- Belyaev, D. K. Destabilizující selekce jako faktor domestikace. *J. Hered.* 70, 301-308 (1979).
- Fang, M., Larson, G., Ribeiro, H. S., Li, N. & Andersson, L. Contrasting mode of evolution at a coat color locus in wild and domestic pigs. *PLoS Genet.* 5, e1000341 (2009).
- Rubin, C. J. *et al.* Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. *Nature* 464, 587-591 (2010).
- Lindblad-Toh, K. *et al.* Sekvence genomu, srovnávací analýza a haplotypová struktura psa domácího. *Nature* 438, 803-819 (2005).
- Koike, N. *a kol.* Brorin, nový antagonist vylučovaného kostního morfogenetického proteinu, podporuje neurogenезi v myších nervových prekurzorových buňkách. *J. Biol. Chem.* 282, 15843-15850 (2007).
- Cheng, L. *et al.* *Tlx3* a *Tlx1* jsou postmitotické selekční geny určující osud glutamatergických buněk před GABAergními. *Nature Neurosci.* 7, 510-517 (2004).
- Napoli, I. *et al.* Protein syndromu křehkého X potlačuje translaci závislou na aktivitě prostřednictvím CYFIP1, nového 4E-BP. *Cell* 134, 1042-1054 (2008).
- Weston, M. C., Nehring, R. B., Wojcik, S. M. & Rosenmund, C. Interakce mezi izoformami VGLUT a endofilinem A1 reguluje uvolňování neurotransmiterů a krátkodobou plasticitu. *Neuron* 69, 1147-1159 (2011).
- Varga, Z. M. *et al.* Funkce vyhlazených buněk zebříček při specifikaci ventrální neurální trubice a tvorbě axonových traktů. *Development* 128, 3497-3509 (2001).
- Tokuhiro, K., Ikawa, M., Benham, A. M. & Okabe, M. Protein disulfid isomerase homolog PDILT je nutný pro kontrolu kvality membránového proteinu spermií ADAM3 a mužskou plodnost. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 3850-3855 (2012).
- Gardner, A. J. & Evans, J. P. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 53-61 (2006).

- Boomgaarden, I., Vock, C., Klapper, M. & Doring, F. Srovnávací analýzy rizikových genů pro onemocnění patřících do rodiny acyl-CoA syntetázy se středním řetězcem (ACSM) v lidských játrech a buněčných liniích. *Biochem. Genet.* 47, 739-748 (2009).
- Nichols, B. L. *et al.* The maltase-glucoamylase gene: common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 1432-1437 (2003).
- Wright, E. M., Loo, D. D. F. & Hirayama, B. A. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol. Rev.* 91, 733-794 (2011).
- Meisler, M. H. & Ting, C. N. The remarkable evolutionary history of the human amylase genes. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 503-509 (1993).
- Simpson, J. W., Doxey, D. L. & Brown, R. Sérové hodnoty izoamylázy u normálních psů a psů s exokrinní pankreatickou insuficiencí. *Vet. Res. Commun.* 8, 303-308 (1984).
- Worth, C. L., Preissner, R. & Blundell, T. L. SDM - server pro předpovídání účinků mutací na stabilitu a poruchy proteinů. *Nucleic Acids Res.* 39, W215-W222 (2011).
- Pei, L. *et al.* Siroťčí jaderné receptory NR4A jsou transkripčními regulátory jaterního metabolismu glukózy. *Nature Med.* 12, 1048-1055 (2006).
- Mochizuki, K., Honma, K., Shimada, M. & Goda, T. Regulace jejunalní indukce genu pro maltázu-glukoamylázu dietou s vysokým obsahem škrobu a nízkým obsahem tuku u myši. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1445-1451 (2010).
- Andersson, L. Studium fenotypové evoluce u domácích zvířat: cesta po stopách Charlese Darwina. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 74, 319-325 (2009).
- Diez-Sampedro, A. *et al.* Senzor glukózy ukrytý v rodině transportérů. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 11753-11758 (2003).
- Hediger, M. A., Mendlein, J., Lee, H. S. & Wright, E. M. Biosyntéza klonovaného střevního Na<sup>+</sup> glukózového kotransportéru. *Biochim. Biophys. Acta* 1064, 360-364 (1991).
- Perry, G. H. *et al.* Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation (Strava a evoluce variability počtu kopií lidského amylázového genu). *Nature Genet.* 39, 1256-1260 (2007).

Doplňující informace jsou k dispozici v online verzi článku.

Poděkování Děkujeme společností Ja'rvzoo, Nordens ark a Canine Biobank na Uppsalcké univerzitě a Švédské univerzitě zemědělských věd za poskytnutí vzorků, Uppsala Genomics Platform v laboratoři SciLifeLab Uppsala za vytvoření dat pro resekvenování, platformě UPPNEX za pomoc s výpočetní infrastrukturou pro analýzu dat a Broad Institute Genomics Platform za validační genotypizaci. Projekt byl financován SSF, Švédskou výzkumnou radou, Švédskou výzkumnou radou Formas, Uppsalckou univerzitou a EURYL pro K.L.-T. financovaným ESF podporujícím také E.A.; K.M. byl financován Komisí pro vyšší vzdělávání v Pákistánu.

Autorský podíl K.L.-T. a A. H. navrhli studii. K.L.-T. a E.A. dohlíželi na studii. M.-L.A. koordinovala a provedla většinu sběru vzorků u O.L. a J.M.A. poskytli vzorky rozhodujícího významu. E.A. provedla detekci SNP a selekční analýzy; A.R. identifikovala kandidátní kauzální mutace a analyzovala haplotypy v CDR; K.M. detekovala CNV bioinformaticky; M.T.W. provedla fylogenetickou analýzu a analyzovala data Canine HD-array; A.R. provedla test aktivity maltázy; M.-L.A. validovala CNV a kvantifikovala expresi mRNA kandidátních genů; M.P. provedla validační genotypizaci SNP; E.A., A.R., M.-L.A. a K.L.-T. interpretovali data; E.A. a K.L.-T. napsali článek za přispění ostatních autorů.

Informace o autorovi Sekvenční čtení jsou k dispozici pod přístupovým číslem SRA061854 (NCBI Sequence Read Archive). Informace o přetiscích a povoleních jsou k dispozici na adrese [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints). Autoři nedeklarují žádné konkurenční finanční zájmy. Čtenáři se mohou vyjádřit k online verzi článku.

Korespondenci a žádosti o materiály zasílejte E.A. (Erik.Axelsson@imbim.uu.se) a K.L.-T. (kersli@broadinstitute.org).

## METODY

Extrakce DNA. DNA byla extrahována z tkání pomocí souprav Qiagen pro extrakci tkáňové DNA nebo z krve s EDTA buď pomocí ručního srážení solí, nebo soupravou QIASymphony DNA Midi (Qiagen) na robotu QIASymphony (Qiagen). Sekvenování. Před konstrukcí knihoven mate-párů a sekvenováním na systému AB SOLiD, verze 3, jsme použili standardních protokolů výrobce (Applied Biosystems) shromáždili DNA od 12 jedinců z každého souboru. Sekvenační čtení byla zarovnána k referenční sekvenci CanFam 2.0 pomocí softwaru Bioscope 1.1. Odstranili jsme duplicitní (<http://picard.sourceforge.net>) a špatně mapovaná čtení (kvalita mapování „20 v Samtools“)<sup>31</sup> a pro další analýzy jsme ponechali pouze jednoznačně mapovaná čtení.

Detekce SNP. Pro zvýšení citlivosti na vzácné alely jsme hledali variabilní místa v datech kombinovaných ze všech skupin (včetně vlčích). K vyvolání SNP jsme vyžadovali minimálně tři čtení podporující alternativní alelu a použili jsme další filtrační krok implementovaný v samtools.pl varFilter (nastavení: -Q25 -q10 -d3 -D120 -G25 -w10 -N2 -I30), abychom zajistili vysokou přesnost vyvolání, která není do značné míry ovlivněna například paralogními variantami sekvence. Genotypy pro všechny SNP ve všech skupinách psů a jediné skupině vlků jsme volali tak, že jsme spočítali sekvenační čtení podporující referenční a variantní alelu při minimální kvalitě báze 20, abychom odhadli frekvence alel v populacích psů a vlků. Do tohoto procesu byl zahrnut náhodný výběr představující 25 % sekvenačních čtení z bazénů 4 a 5, aby bylo možné dosáhnout nezkrácených odhadů frekvence alel.

Výběrové analýzy. Počty alel a frekvence alel u všech identifikovaných proměnných

místa byla použita k vyhledávání oblastí genomu psa, které mohly být ovlivněny selekcí v rané fázi domestikace psa pomocí dvou doplňujících se přístupů. Nejprve jsme vypočítali průměrnou sruženou heterozygotnost ( $H_p$ ) v oknech o velikosti 200 kb posouvajících po 100 kb pro všech pět skupin psů dohromady a v jediné skupině vlků zvlášť, podle metodiky popsané v ref. 10. Stručně řečeno, tato metoda počítá všechny počty minoritních, respektive majoritních alel na všech variabilních místech v rámci okna a odhaduje heterozygotnost na základě kombinovaných počtů alel pro celé okno. Výhodou této metody oproti výpočtu prostého aritmetického průměru všech odhadů heterozygotnosti jednotlivých míst je, že zohledňuje proměnlivé pokrytí sekvencí v celém okně. Abychom se vyhnuli falešným selekčním signálům, vyřadili jsme z této i následné  $F_{ST}$  analýzy 49 z 21 927 oken obsahujících méně než 10 informativních míst. Výsledné rozdělení skóre  $H_p$  jsme transformovali na  $Z$  a vyřadili jsme domněle vybraná okna v krajním chvostu rozdělení použitím mezní hodnoty  $Z(H_p)$ , 25.

Za druhé jsme vypočítali hodnoty  $F_{ST}$  mezi psem a vlkem pro jednotlivé SNP.

popomocí metody, která upravuje rozdíly ve velikosti vzorku<sup>32</sup>. Zprůměrovali jsme hodnoty  $F_{ST}$  v oknech o velikosti 200 kb, posouvajících se po 100 kb, a výsledné rozdělení jsme transformovali do  $Z$ . Předpokládané selekční cíle byly vyčleněny z krajního chvostu rozdělení použitím  $Z(F_{ST})$ . 5 a přiřazeny selekcí u psa, pokud odpovídá  $Z(H)_{P_{DOG}}$ ,  $Z(H)_{P_{WOLF}}$ , selekcí u vlka, pokud odpovídá  $Z(H)_{P_{WOLF}}$ ,  $Z(H)_{P_{DOG}}$  (tři oblasti), a selekcí u obou taxonů, pokud odpovídá  $Z(H)_{P_{WOLF}}$ , 24 a  $Z(H)_{P_{WOLF}}$  24.

Analýza genové ontologie. Použili jsme genové anotace Ensembl k identifikaci genů sídlících v oblastech sahajících 100 kb proti a po proudu CDR, abychom zahrnuli potenciální účinky regulačních změn na lokusy v určité vzdálenosti a snížili riziko vyloučení nejvzdálenějších částí vybraných haplotypů pomocí posuvných oken pevné velikosti. Testovali jsme obohacení termínů genové ontologie (GOa- human) přiřazených podskupině těchto genů CDR, pro které bylo možné stanovit lidskou ortologii (79 ze 122), pomocí programu GOstat<sup>33</sup>. Validace genotypů. Navrhli jsme test iPLEX zaměřený na 124 SNP umístěných v CDR, které vykazují vysoký stupeň homozygotnosti nebo populační diferenciace. Celkem bylo genotypováno 71 psů reprezentujících 38 různých plemen a 19 vlků (doplňková tabulka 14) podle standardních protokolů poskytnutých výrobcem (Sequenome). Haplotypy byly rozfázovány pomocí fastPHASE<sup>34</sup>.

detekce CNV pomocí qPCR. Kvantifikovali jsme variabilitu počtu kopií DNA pomocí testů Multi-plex TaqMan obsahujících primery a sondy (Doplňková tabulka 20).

odpovídající cílové i referenční sekvenci (housekeepingový gen *C7orf28b*) podle protokolu výrobce. Všechny reakce byly provedeny ve třech opakováních a data byla analyzována pomocí softwaru CopyCaller (Applied Biosystems). Počty kopií pro každý cíl byly normalizovány na stejného vlka, aby se zohlednila variabilita mezi deskami.

expresní analýzy qPCR. Vzorky pankreatické tkáně psů a vlků byly odebrány post mortem, uloženy do RNAlateru při teplotě 4 uC po dobu 24 hodin a následně zmrazeny při teplotě 280 uC. K izolaci RNA z těchto vzorků jsme použili TRIzol a následně jsme provedli syntézu komplementární DNA pomocí soupravy Advantage RT for PCR podle protokolů výrobců (Life Technologies, resp. Clontech). Navrhli jsme exonické primery (doplňková tabulka 21) a kvantifikovali množství cDNA pomocí SYBR Green real-time PCR (Applied bio- sciences) na systému 7900HT Fast real time PCR (Applied Biosystems) a analyzovali data pomocí softwaru qbasePLUS (Biogazelle) podle metody  $DDC_T$ . Všechny reakce byly provedeny ve třech opakováních a normalizovány porovnáním s housekeepingovými geny *RPL32* a *RPL13A*.

Aktivita amylázy. Vzorky periferní krve EDTA a séra byly odebrány psům a vlkům žijícím v zajetí i ve volné přírodě. Aktivita amylázy v séru byla analyzována na pracovišti klinické patologie (Švédská zemědělská univerzita) pomocí přístroje Architect e400 (Abott Laboratories), s výjimkou 8 vzorků séra (doplňková tabulka 13), které byly vyšetřeny na přístroji VetScan (Abaxis). Aktivita maltázy. Maltázová aktivita byla stanovena podle principu uvedeného v ref. 35, kdy se do séra přidá známé množství maltózoového substrátu a výsledná vzniklá glukóza se měří jako změna absorbance po pěti minutách ( $DA_{570nm}$ ). Použili jsme činidla ze soupravy ab83388 Maltose assay kit (Abcam) a vzorky séra odebrané podle výše uvedeného popisu. U každého jedince byla glukózová rezidua měřena ve dvou opakováních a maltázové testy byly provedeny ve třech opakováních.

Volání Indel. Pro volání malých inzerce a delece v každém souboru zvlášť jsme použili Bioscope 1.1. Poté jsme zkombinovali výsledky všech poolů a vybrali soubor indelů s vysokou jistotou, přičemž jsme požadovali, aby byly indely podpořeny alespoň třemi sekvenačními čteními.

Detekce CNV. K detekci strukturálních změn v genomu psa byly použity čtyři metody. Odchytky ve velikosti inzertu jsme hledali pomocí nástroje Large Indel, který je implementován v Bioscope1.1. Porovnali jsme hloubku pokrytí mezi sruženými vzorky pomocí CNVseq<sup>36</sup> a metody Fixed deletions<sup>10</sup> a nakonec jsme identifikovali oblasti, ve kterých se hloubka pokrytí odchylovala od průměru sružených vzorků pomocí CNVnator<sup>37</sup>. Metody spoléhající na porovnání pokrytí sekvencí mezi pooly vždy používaly jako referenční pool vlka.

Etika. Všechna zvířata, která poskytla vzorky tkání pro tuto studii, uhynula z jiných důvodů, než je účast v této studii. Všechny vzorky psů byly odebrány se souhlasem jejich majitelů. Odběr vzorků byl v souladu s rozhodnutím Švédské etické komise pro zvířata (č. C62/10) a Švédské agentury pro ochranu zvířat (č. 31-1711/10).

- Li, H. a kol. Formát pro zarovnání sekvencí/mapu a nástroje SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079 (2009).
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. Odhad F-statistik pro analýzu struktury populace. *Evolution* 38, 1358-1370 (1984).
- Beissbarth, T. & Speed, T. P. GOstat: vyhledání statisticky nadreprezentovaných genových ontologií v rámci skupiny genů. *Bioinformatics* 20, 1464-1465 (2004).
- Scheet, P. & Stephens, M. Rychlý a flexibilní statistický model pro rozsáhlá populační genotypová data: aplikace pro odvozování chybějících genotypů a haplotypové fáze. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 629-644 (2006).
- Dahlqvist, A. Metoda stanovení středních disacharidáz. *Anal. Biochem.* 7, 18-25 (1964).
- Xie, C. & Tammi, M. T. CNV-seq, nová metoda detekce variability počtu kopií pomocí vysokokapacitního sekvenování. *BMC Bioinformatics* 10, 80 (2009).
- Abyzov, A., Urban, A. E., Snyder, M. & Gerstein, M. CNVnator: M.: An approach to discover, genotype, and characterize typical and atypical CNVs from family and population genome sequencing. *Genome Res.* 21, 974-984 (2011).

[Zobrazit statistiky publikací](#)

©2013 Macmillan Publishers Limited. Všechna práva vyhrazena