

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Biologie

Katedra antropologie a genetiky člověka



Bc. Lucie Šmídková

Diplomová práce

**LAKTÁZOVÁ PERZISTENCE U TUAREŽSKÝCH PASTEVCŮ**  
**LACTASE PERSISTENCE IN THE TUAREG PASTORALISTS**

Vedoucí diplomové práce: doc. Mgr. Viktor Černý, Dr.

PRAHA 2016

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Laktázová perzistence u tuarežských pastevců“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze .....

Podpis .....

## **Poděkování**

Nejprve bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. Mgr. Viktorovi Černému, Dr. za trpělivou pomoc a důležité rady během psaní mé diplomové práce. Dále pak mé velké díky patří především Mgr. Editě Priehodové, za její nikdy nekončící pomoc a také všem členům archeogenetické laboratoře Archeologického ústavu AVČR, Praha, v. v. i., kteří mi poskytli přátelské zázemí a možnost realizace tohoto výzkumu. V neposlední řadě i Dr. Frédéricovi Austerlitzovi za pomoc s datováním.

Nakonec bych chtěla velmi poděkovat své rodině a svému příteli za jejich dokonalou podporu během mého studia.

## **ABSTRAKT**

Laktázová perzistence (LP) je geneticky determinovaný znak, způsobený expresí laktázy v dospělosti. Laktáza je střevní enzym odpovědný za trávení mléčného cukru, laktózy. Jeho produkce v tenkém střevě klesá během dětského období, tento fyziologický stav se nazývá laktózová intolerance. Nicméně u některých jedinců produkce tohoto enzymu zastavena není. Přetrvávání činnosti laktázy je nedávný jev, který vznikl nezávisle v několika částech světa za posledních zhruba 10 000 let v souvislosti se vznikem zemědělství, konkrétně mléčné produkce a je (patrně) dosud pod silným selekčním tlakem. LP byla prvně pozorována v Evropě, kde je asociovaná s mutací -13910\*T, jejíž frekvence koreluje se zeměpisnou šířkou. V Africe je výskyt LP spojen naopak s pastevectvím a spadá pod hypotézu geneticko-kulturní koevoluce související s chovem dobytka a využíváním sekundárních potravních zdrojů. Pastevecké populace žijící na různých územích Afriky mají odlišné LP mutace, které se odvíjejí od jejich původu. Ačkoliv bylo na LP prováděno již velké množství populačních studií, ještě nikdo se nezabýval touto problematikou z molekulárně genetického hlediska u Tuaregů. Tato práce se zaměřila na analýzu LP mutací u 93 vzorků Tuaregů z Burkiny Faso, Mali a Nigeru. LP mutace byly potvrzena u 57 z 93 (61,3%) vzorků a nejvíc frekventovanou variantou je „evropská“ - 13910\*T s alelickou frekvencí 41%, k jejíž expanzi u tuarežských předků došlo před méně než dvěma tisíci lety. Tyto výsledky jsou diskutovány ve světle současných poznatků o populační historii afrického sahelu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Laktázová perzistence, laktóza, jednonukleotidové polymorfizmy, Tuaregové, pastevectví

## **ABSTRACT**

Lactase persistence (LP) is a genetically determined trait caused by the expression of lactase in adulthood. Lactase is the intestinal enzyme responsible for digestion of milk sugar, lactose. Its production in the small intestine decreases during the childhood, this physiological condition is called lactose intolerance. However, in some individuals production of this enzyme is not stopped. The persistence of lactase activity is a recent phenomenon, which arose independently in several parts of the world over the past roughly 10,000 years, in connection with the emergence of agriculture, specifically milk production and is (likely) still under strong selection pressure. LP was first observed in Europe, where it is associated with a mutation -13 910\*T. Frequency of this mutation correlates with latitude. In Africa, the presence of LP is conversely associated with herding and falls under the hypothesis of genetic and cultural co-evolution associated with cattle and the use of secondary food sources. Pastoral populations living in different areas of Africa have different LP mutations that are linked to their origin. Although many investigations on LP have already been carried out, neither analysed the Tuareg populations. This study is focused on the analysis LP mutations in 93 samples of Tuaregs from Burkina Faso, Mali and Niger. LP was confirmed in 57 of 93 samples (61,3%), and most frequent variant is "European" mutation -13 910\*T with allelic frequency of 41%. The expansion at Tuaregs ancestors were less than two thousand years ago. These results are discussed in light of the current knowledge about the population history of the African Sahel.

## **KEY WORDS**

Lactase persistence, lactose, single-nucleotide polymorphism, Tuareg, pastoralism

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2. CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>10</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. DOMESTIKACE ZVÍŘAT.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. PASTEVECTVÍ .....</b>	<b>11</b>
3.2.1. Historie pastevevství v Africe.....	12
3.2.2. Afrika .....	14
3.2.2.1. Vývoj klimatu v Africe.....	14
3.2.2.2. Přírodní prostředí pouští a polopouští .....	16
3.2.3. Dnešní pastevecké společnosti .....	17
3.2.3.1. Počet a rozšíření pasteveckých populací .....	18
3.2.4. Africké pastevevství .....	18
<b>3.3. TUAREGOVÉ .....</b>	<b>19</b>
3.3.1. Historie Tuaregů.....	20
3.3.2. Jazyk .....	21
3.3.2.1. Berberská větev .....	22
3.3.3. Zdroje obživy .....	22
3.3.3.1. Chov zvířat .....	23
3.3.4. Společenské a kulturní zvláštnosti .....	24
<b>3.4. LAKTÁZOVÁ PERZISTENCE .....</b>	<b>25</b>
3.4.1. Laktóza .....	26
3.4.2. Laktáza .....	26
3.4.3. Hypotézy vzniku laktázové perzistence.....	27
3.4.3.1. Kulturně-historická hypotéza .....	27
3.4.3.2. Nedostatek vitamínu D.....	28
3.4.3.3. Aridní klima .....	28
3.4.3.4. Malárie .....	29
3.4.4. Testování hypotéz .....	29
3.4.5. Světové rozšíření LP .....	30
<b>3.5. GENETICKÁ PODSTATA LP .....</b>	<b>32</b>
3.5.1. Gen LCT .....	32
3.5.2. Gen MCM6 .....	33
3.5.3. Mutace genu MCM6 a jejich distribuce .....	33
3.5.3.1. -13910*T.....	35
3.5.3.2. -13915*G .....	35
3.5.3.3. -13913*C .....	36
3.5.3.4. -22018*A .....	36
3.5.3.5. -13907*G .....	37
3.5.3.6. -14010*C .....	37
3.5.3.7. -14009*G .....	37
3.5.4. Rozšíření LP mutací v Africe .....	38
3.5.5. Migrace afrických pastevců.....	39
3.5.5.1. Pozitivní selekce LP.....	40
3.5.5.2. LP u Tuaregů.....	41
<b>4. MATERIÁL.....</b>	<b>43</b>

<b>5. METODY</b> .....	<b>44</b>
<b>5.1. IZOLACE DNA</b> .....	<b>44</b>
<b>5.2. MĚŘENÍ KONCENTRACE IZOLOVANÉ DNA</b> .....	<b>44</b>
<b>5.3. PCR AMPLIFIKACE ÚSEKU GENU MCM6</b> .....	<b>44</b>
<b>5.4. GELOVÁ ELEKTROFORÉZA</b> .....	<b>45</b>
<b>5.5. SEKVENACE</b> .....	<b>46</b>
<b>5.6. VYSOKOROZLIŠOVACÍ ANALÝZA KŘIVEK TÁNÍ</b> .....	<b>47</b>
<b>5.7. VYHODNOCENÍ DAT</b> .....	<b>48</b>
5.7.1. Intrapopulační analýza .....	49
5.7.2. Okolí SNP polymorfismů.....	49
5.7.3. Haplotypové sítě .....	50
5.7.4. Populační růst mutace -13910*T .....	50
<b>6. VÝSLEDKY</b> .....	<b>52</b>
<b>6.1. ČETNOST LP</b> .....	<b>52</b>
<b>6.2. MUTACE LP A JEJICH FREKVENCE</b> .....	<b>53</b>
6.2.1. Frekvence jednotlivých mutací .....	55
<b>6.3. INTRA-POPULAČNÍ ANALÝZA</b> .....	<b>56</b>
<b>6.4. HAPLOTYPOVÉ POZADÍ</b> .....	<b>57</b>
<b>6.5. HAPLOTYPOVÉ SÍTĚ</b> .....	<b>57</b>
<b>6.6. DATOVÁNÍ DEMOGRAFICKÉHO RŮSTU -13910*T</b> .....	<b>59</b>
<b>7. DISKUZE</b> .....	<b>60</b>
<b>7.1. LAKTÁZOVÁ PERZISTENCE</b> .....	<b>60</b>
<b>7.2. LAKTÁZOVÁ PERZISTENCE U TUAREGŮ</b> .....	<b>61</b>
<b>7.3. LP MUTACE U TUAREGŮ</b> .....	<b>61</b>
<b>7.4. PŮVOD MUTACE -13910*T V AFRICE</b> .....	<b>63</b>
<b>7.5. DATOVÁNÍ MUTACÍ A MÍSTA VZNIKU</b> .....	<b>64</b>
<b>7.6. SELEKČNÍ TLAK</b> .....	<b>65</b>
<b>7.7. BUDOUCÍ VÝZKUMY</b> .....	<b>65</b>
<b>8. ZÁVĚR</b> .....	<b>67</b>
<b>9. SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>68</b>
<b>10. LITERATURA</b> .....	<b>69</b>
<b>11. PŘÍLOHY</b> .....	<b>82</b>
<b>11.1. POSTUP IZOLACE</b> .....	<b>82</b>
<b>11.2. PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU</b> .....	<b>82</b>
<b>11.3. SEZNAM POUŽITÝCH VZORKŮ</b> .....	<b>83</b>

# 1. ÚVOD

Schopnost bezproblémového trávení mléka, respektive mléčného cukru, kterou si s sebou někteří z nás nesou od kojeneckého období po celý život je dnes velmi diskutované téma. U populací, které mléko v dospělosti trávit nemohou, klesá aktivita laktázy přibližně kolem 5. roku života. Díky četným studiím víme, kdy přibližně k této prospěšné změně u lidí došlo a z jakého důvodu jsou právě lidé, jako jediní ze savců, schopni této východy využívat. Mezníkem byla domestikace zvířat a využívání sekundárních zdrojů, které nám zvířata poskytují.

Laktázová perzistence (LP) je celosvětově rozšířená, ale její frekvence je značně odlišná. Víme, že se ve značné četnosti vyskytuje v severní Evropě a na Blízkém východě a u některých populací ji nalezneme i v Africe. Moje práce se zabývá africkými Tuaregy a to z toho důvodu, že v jejich populaci je LP poměrně častá, ale na molekulární úrovni doposud zkoumána nebyla.

Tuaregové svým původem patří mezi Berbery a v místech, kde dnes žijí, se oproti ostatním populacím vyznačují světlejší barvou kůže. Často jsou ale také označováni jako „modří lidé“, jelikož se oblékají do šatů vyrobených z látky obarvené indigem, které na jejich kůži zanechává modrý odstín. Z našeho hlediska je však důležité to, že patří mezi pastevece, kteří žijí v polosuchém sahelu a vyprahlé saharské oblasti na území pěti afrických států. Pastervecké skupiny Tuaregů obývají převážně Alžírsko, Mali, Niger a v menší míře i Libyi a Burkinu Faso a specializují se na chov velbloudů, skotu, koz a ovcí. Tuaregové jsou již z historických dob známí jako válečníci a obchodníci.

Diplomovou práci jsem rozdělila do několika částí; pozornost jsem věnovala nejen genetickým analýzám, ale i předmětu mého antropologického výzkumu - tedy lidem afrického sahelu. První kapitola literárního přehledu se zabývá domestikací zvířat, na kterou volně navazuje pastervectví jako subsistenční strategie popisovaná zde převážně z území subsaharské Afriky a sní spojené pastervecké společnosti. Následující kapitola se zabývá Tuaregy, jejich původem, místy, která obývají, zvířaty, která chovají a jejich zvyky. Čtvrtá kapitola pojednává o LP a poslední kapitola zkoumá její genetickou podstatu. Zbylé kapitoly se pak zabývají mojí vlastní laboratorní prací a jsou řazeny tak, jak je ve vědecké práci obvyklé.

Pro tuto diplomovou práci jsem formulovala několik pracovních hypotéz:

1. Předpokládám, že u zkoumaných jedinců bude na molekulární úrovni potvrzena LP ve větší míře, tak jako tomu odpovídají testy fenotypové, byť byly provedeny v jiné zeměpisné oblasti výskytu Tuaregů (Flatz et al., 1986).
2. Na základě předpokládaného berberského (severoafrického) původu Tuaregů, bude mít největší frekvenci mutace -13910\*T. Vycházím z předpokladu, že např. u etnicky spřízněné populace Berberů ze severní Afriky, byla tato mutace rovněž detekována (Myles, 2005).
3. Je-li mutace pro LP pod selekčním tlakem, budou mít jedinci s mutantní formou genu pro LP podobné haplotypové pozadí
4. Rozšíření mutací pro LP by měla odpovídat době, kdy jejich nositelé (Tuaregové) pronikli pod Saharu.

## 2. CÍLE PRÁCE

Mléčná produkce je společným rysem všech pasteveckých skupin. U různých skupin pastevců vznikly nebo se rozšířily různé mutace umožňující štěpit mléčný cukr i v dospělosti. Tento jev se nazývá laktázová perzistence (dále jen LP). Její frekvence je více či méně známá, ale u afrických Tuaregů tomu doposud tak není.

V této diplomové práci jsem si stanovila několik základních cílů, které souvisí s ještě neprozkoumanou situací u této sahelské populace. Prvním bylo zjištění, zda Tuaregové mají přítomné mutace způsobující LP a pokud ano, tak určit o jaké varianty se jedná. V případě detekce známých mutací pro LP bylo následujícím cílem určit jejich frekvenci. Za tímto účelem jsem u 93 vzorků třech tuarežských skupin pocházejících z Burkiny Faso, Nigeru a Mali sekvenovala část intronu 13 genu *MCM6*, kde se nachází většina dnes známých mutací umožňujících LP. Třetím cílem bylo odhadnout dobu šíření mutace. Pro tento účel jsem zvolila metodu publikovanou francouzským genetikem F. Austerlitzem (Austerlitz et al., 2002). Dále jsem u vybraných vzorků reprezentujících jedince s LP mutacemi i bez mutací detekovala jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) v okolí mutace pro LP. Následně jsem rekonstruovala haplotypy a odhadla stáří její expanze výše uvedenou metodou. Tyto výsledky jsem diskutovala ve světle současných poznatků populačních dějin afrického sahelu, zejména pak pasteveckých skupin.

## **3. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

### **3.1. Domestikace zvířat**

Domestikace zvířat začala probíhat s menšími či většími časovými rozestupy na více místech nezávisle na sobě. Nejstarší záznamy o domestikaci pocházejí z Předního východu a datují se do doby před 11 000 – 8 000 lety (Loftus et al., 1994). Mezi prvními většími domestikovanými zvířaty byl skot, jehož domestikace započala před více než 10 000 lety na Předním východě. V nilském údolí a v Číně začala domestikace skotu zhruba o 500 let později. Do doby před 8 000 lety se též datuje i počátek domestikace prasat v Číně (Vigne, 2011). Domestikace ovcí a koz probíhala na Předním východě přibližně před 11 000 lety, domestikace prasat před 10 500 lety. Velbloud jednohrbý (dromedár) byl domestikován přibližně před 5 000 lety v Arábii a velbloud dvouhrbý (drabař) před 4 600 lety ve východním Íránu (Driscoll et al., 2009).

Na samém počátku zemědělské produkce se skot využíval pouze pro produkci masa a košárování. Až během eneolitu (doby měděné) se ho lidé naučili využívat i druhotně, a to jako tažné zvíře k orbě a na produkci mléka (Sherratt, 1981). Produkce mléka je od té doby obzvláště vyvinutá, jelikož chovatelům umožňovala a nadále umožňuje využívat zvířata, aniž by museli snižovat jejich počty (Richerson, 2001).

### **3.2. Pasterectví**

Pasterectví je subsistenční strategie využívající pastviny jako ekologické niky, kde domácí zvířata maximalizují svoji produktivitu (Smith, 2005). Pasterectví žijí převážně v sušších oblastech méně vhodných pro pěstování plodin a jejich živobytí závisí na jejich znalostech přírodního prostředí (Rota et Sperandini, 2009; Schwartz, 1993). Základním znakem pasterectvé subsistence je silná vazba na domácí zvířata (Homewood, 2008; Richerson, 2001). Pasterectví se o svá stáda řádně starají a potřeby zvířat jsou u nich na prvním místě. Získávají tak produkty, které jsou pro ně životně důležité, jako je mléko a v některých případech i maso a krev. Ve většině případů však tvoří základní složku stravy pasterectvů mléko a mléčné výrobky. Kromě živin, které jsou v mléku obsaženy, tu hraje významnou roli i vysoký obsah vody, který je pro člověka v oblastech s nedostatkem pitné vody rovněž velmi důležitý (Nicholson, 1984).

Druhy chovaných zvířat se liší v závislosti na klimatu, přírodním prostředí a dostupnosti vodních zdrojů, ale v podstatě lze říci, že mezi nejčastěji chovaná zvířata patří ovce, kozy, skot a velbloudi (Smith, 2005).

### **3.2.1. Historie pastevectví v Africe**

Vznik pastevectví v Africe se datuje do doby před 9 500 – 9 000 lety (Bates, 2004) a podle archeologických dokladů má kolébku na Sahaře. Malville et al., (1998) se domnívá, že centrum pravěkého pastevectví se nacházelo na egyptské lokalitě Nabta Playa. Badatelé tam našli pozůstatky ohnišť, artefaktů a velké množství kostí skotu. O vztahu člověka a tehdy ještě asi polodivokého skotu uvažují také s ohledem na ekologii tamního prostředí. Pavectví se objevilo vlastně jako prostředek k zajištění potravních zdrojů na místech, které jinými zdroji obživy příliš neoplývaly (Nicholson, 1984).

Tento předpoklad byl potvrzen i na základě velkého množství prehistorických maleb a rytin znázorňující pastevece a domácí zvířata (skot, ovce a kozy), které byly nalezeny ve skalních masivech střední Sahary, která měla ve starším holocénu ještě podobu polopouště (Brooks, 2006; Lhote, 1962, 1982). Dále na jih se dobytek pravděpodobně rozšířil s postupující desertifikací před 7 000 – 6 000 lety. V období před 5 000 lety se pasteveci dostali i do sahelu a odtud se následně rozšířili po celé Africe (Brooks, 2006).

Radiokarbonové datování archeologických lokalit naznačuje, že jednotlivé epizody migrací probíhaly v kratších dobách, což by znamenalo, že se jednalo o relativně menší pastevecké skupiny, které hledaly nová prostředí (Brooks, 2006).

Přibližně před 2 500 lety začali pasteveci, kvůli pokračujícímu vysušování Sahary, toto území opouštět a přesunovali se více na jih (Gifford-Gonzalez et Hanotte, 2011). Archeozoologické doklady z afrického sahelu, přesněji ze severu Burkina Faso a nigerijských břehů Čadského jezera, dokládají nástup specializovaného kočovného pastevectví v době přibližně před 2 000 – 1 000 lety (Linseele, 2010). Nejstarší domácí zvířata na africkém kontinentě byla nalezena v jeho severovýchodní části, odkud se šířila po celé Africe (Linseele, 2010).

Kromě sahelu se dnes s pasteveci setkáváme i v jižní Africe, kam se pastevectví rozšířilo tzv. bantuskou expanzí. Bantuská expanze je jednou z nejvýznamnějších

populačně-historických událostí, které se v Africe odehrály. Během expanze docházelo k šíření bantuských jazyků, které patří do nigerokonžské jazykové rodiny - jedné ze čtyř hlavních jazykových skupin v Africe (Huffman, 1982). Bantuské jazyky reprezentují největší africkou jazykovou rodinu zahrnující přibližně 500 různých více či méně podobných jazyků rozkládajících se na území o rozloze 9 miliónů km<sup>2</sup> (Diamond et Bellwood, 2003).

Dle nejrozšířenější teorie vznikly bantuské společnosti jihozápadně od Čadského jezera na pomezí dnešní Nigérie a Kamerunu, patrně v povodí Benue ve 3. tisíciletí př. n. l. jiné teorie uvažují o poněkud jižnějším území (Záhořík, 2006). Archeologické i lingvistické doklady naznačují, že šíření Bantuů začalo asi před 4 000 – 5 000 lety a zahrnovalo velké pohyby zemědělců či spíše pastevců, kteří s sebou v prostředí lovecko-sběračských skupin nesli specifickou kulturu a tradice, a kteří byli uzpůsobeni na klimatické podmínky přetrvávající v rovníkové Africe (Coelho et al., 2009).

Většina studií týkajících se bantuské expanze je založena na lingvistických, etnografických a archeologických datech, dnes už ale existuje i řada genetických studií; např. Li et al., (2014) ve své studii analyzoval STR polymorfismy bantuských skupin. Tato data byla použita pro lepší pochopení šíření západoafrické genetické komponenty na jih kontinentu. S ohledem na výsledky shlukové analýzy byl západoafrický původ dobře patrný po celé subsaharské Africe. Snížení západoafrické komponenty je pozorováno v regionech, kde bantuské jazyky koexistovaly s jinými africkými jazykovými rodinami např. afroasijskými v severní Africe a nilosaharskými a khoisanskými ve východní Africe (Li et al., 2014).

Oproti tomu de Filippo et al., (2012) se zabýval výzkumem mtDNA a Y chromozomu. Prostřednictvím těchto uniparentálně děděných genetických systémů chtěl zjistit, zda se během expanze Bantu jednalo spíše o kulturní difuzi (se kterou se současně šířil i jejich jazyk) nebo zda se při expanzi pohybovali lidé, kteří již společný jazyk a kulturu měli, tedy demickou difuzi. Do studie byly zahrnuty jedinci z 5 jazykových skupin (bantuská, afroasijská, nilosaharská, khoisané a pygmejové). Výsledkem bylo zjištění, že genetické vzdálenosti mezi všemi populacemi Bantu jsou podstatně nižší než mezi Bantu a ostatními populacemi jiných jazykových skupin. Tento fakt se tedy naklání k teorii o demické difuzi.

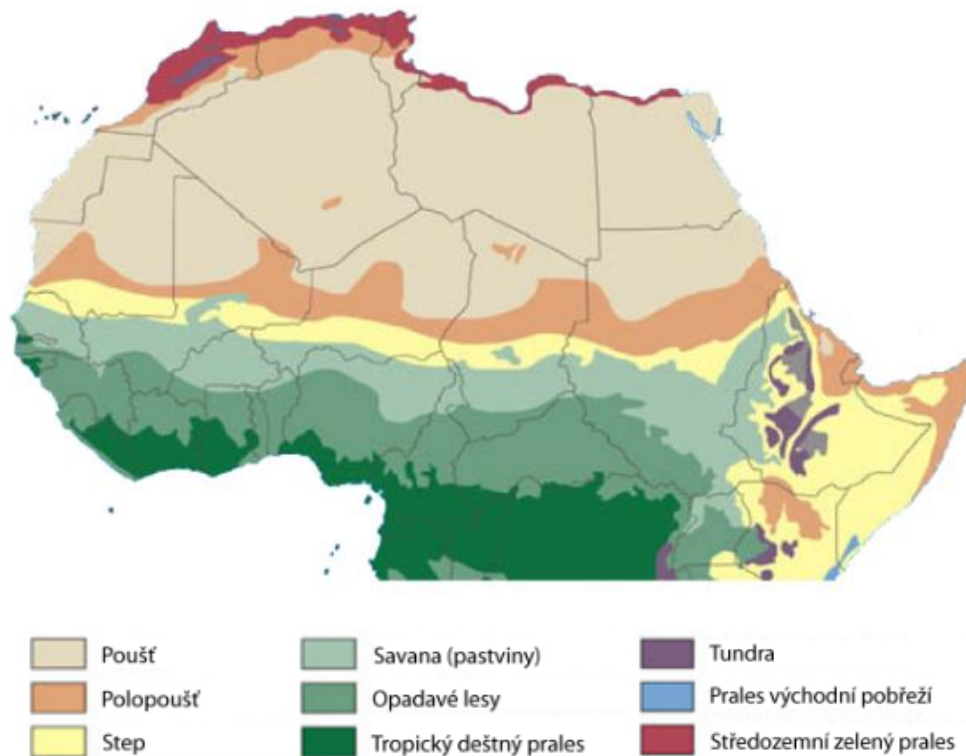
### **3.2.2. Afrika**

Afrika je se svou rozlohou (více než 30 miliónů km<sup>2</sup>) po Asii a Americe třetím největším kontinentem. Žije zde přes 850 miliónů obyvatel. Geologicky se jedná o kompaktní kontinent, který narušuje pouze Velká příkopová propadlina táhnoucí se od Etiopie až do jižní Tanzanie, respektive Malawi (Šerý, 2014; Záhořík, 2006). Dle výškových poloh Afriku dělíme na nízkou a vysokou, kde do území s nižší nadmořskou výškou (v průměru od 200 do 500 metrů) spadá především sever a západ kontinentu. Jižně a východně ležící území dosahuje průměrných nadmořských výšek v rozmezí od 1 500 – 2 000 metrů n. m. (Votrubec, 1973; Šerý, 2014). Dnešní hranice kontinentu se začaly utvářet zhruba před 50 milióny let a až do třetihor byly spojeny širokými pásmy horstev (Votrubec, 1973; Záhořík, 2006).

#### **3.2.2.1. Vývoj klimatu v Africe**

Během posledního maxima doby ledové (zhruba před 23 000 – 18 000 lety) byla oblast severní Afriky převážně aridní. Před 18 000 – 13 500 lety zažívala Afrika stále aridní podmínky, které s největší pravděpodobností přetrvaly až do počátku holocénu (Gasse 2000). Pozdní pleistocén a holocén (přibližně před 11 000 – 8 000 lety) byl převážně vlhký (Drake et al., 2011). Tato vlhká období dodnes dokládá např. přítomnost krokodýlů nilských přežívajících v izolovaných oázách na Sahaře (Brito et al., 2011).

V dnešní době aridní území pokrývá přibližně 60% Afriky. Mezi velké pouště patří kromě Sahary ještě Namib a Kalahari. Denní teploty mohou být velmi vysoké a dosahovat až 42°C. Dešťové srážky jsou nedostatečné a dosahují přibližně jen 100 mm za rok (Unep).



**Obr. 1.** Vegetační zóny v Africe severně od rovníku

(Převzato a upraveno z [http://www.catsg.org/cheetah/07\\_map-centre/7\\_4\\_North-African-region/basic-maps/north\\_african\\_region\\_vegetation.jpg](http://www.catsg.org/cheetah/07_map-centre/7_4_North-African-region/basic-maps/north_african_region_vegetation.jpg))

V následujícím textu dále rozvedu jen prostředí, ze kterého pochází lidé, jejichž vzorky jsem v této diplomové práci analyzovala. Jedná se o Saharu a sahel, tedy oblasti, které zahrnují ve výše uvedeném obrázku vegetačních zón pásma pouští až savan.

Sahara, největší poušť světa, leží v severní části Afriky. Její rozloha přesahuje 9 000 000 km<sup>2</sup> a je známa jako nejsušší místo na světě (Krejčí, 1960). V historii Sahary došlo k mnoha výrazným klimatickým změnám.

Dle datování z jezerních sedimentů byla před 125 000 lety, v době eemského interglaciálu, Sahara porostlá vegetací (Drake et al., 2011). Mezi léty 120 000 – 90 000 před současností bylo na Sahaře období pluviálů, po nichž se klima opět vysušilo. Nástup dešťů v raném holocénu před zhruba 12 000 lety znamenal velké změny nejen na Sahaře. Jeho dopad na krajinu, ale také na lidské osídlení a kulturu lze nejlépe pozorovat v porovnání s klimatem ve starších čtvrtohorách (Nicoll, 2001).

V průběhu pleistocénu se saharské klima cyklicky měnilo a střídala se zde období pluviálů a interpluviálů. V době před 23 000 – 18 000 lety nastalo poslední glaciální

maximum, které se vyznačovalo extrémní aridifikací. Poslední výraznou suchou fází před začátkem holocénu byl mladší dryas přes 12 800 – 11 500 lety (Swezey, 2001). Na počátku holocénu, díky celoročnímu přirozenému zavlažování, se poušť začala pokrývat vegetací a společně s ní se začala objevovat i lidská sídliště. Díky mohutným a častým deštům začala vznikat trvalá plochá jezera a říční toky. Vodní hladiny dosáhly své maximální výšky zhruba před 8 500 lety (Kindermann et al., 2006). Tato vlhčí fáze skončila přibližně před 6 000 lety, kdy začalo docházet k desertifikaci Sahary a zmenšování jezerních ploch (Bouchette et al., 2010).

Sahel je podobně jako Sahara obýván jak pastevci, tak i usedlými zemědělci. Ve stádech pastevců, zde na rozdíl od Sahary, dominuje hovězí dobytek, zemědělci pěstují obiloviny, především proso a čirok. Na pomezí Sahary a sahelu leží Čadské jezero, které se stalo křižovatkou migračních pohybů mezi západní a východní Afrikou a lze jej považovat za jakési pulzující srdce Afriky (Černý, 2006)

### **3.2.2.2. Přírodní prostředí pouští a polopouští**

Na Sahaře rozlišujeme dva typy pastvy: trvalý růst žlutavé trávy, malých dřevnatých a trnitých keřů, které se nacházejí podél suchých říčních údolí a malé svěží trsy zelené trávy, které vyrůstají po dešti (Briggs, 1960). Krom pastevců velbloudů, ovcí a koz, kteří se zároveň zabývají trans-saharským obchodem, zde v oázách žijí i usedlí zemědělci pěstující datlové palmy a v jejich stínu také zeleninu.

Izohyeta 200 mm udává limit pro Saharu (Drake et al., 2011). Pod ní je již sahel coby 5 400 km dlouhý pás táhnoucí se mezi vlhčí savanou na jihu a Saharou na severu. Označení „sahel“ pochází z arabského slova „sáheli“, což znamená břeh, myšleno okraj pouště (Šerý, 2014). Tento pás vede od Atlantiku přes Mauretánii, Senegal, Mali, Burkínu Faso, Niger, Čad, Súdán a Eritreu až k Rudému moři. Jedná se o území, potencionálně bohaté na přírodní zdroje jako je: sůl, zlato, ropa, plyn a kovy. V sahelské oblasti spadne přibližně 250 – 550 mm srážek za rok, deště přicházejí v květnu a končí v říjnu. Průměrné roční teploty dosahují 26 - 29°C. Před letními dešti dosahují maximální teploty až 45°C (Unep).

### 3.2.3. Dnešní pastevecké společnosti

Jednotlivé pastevecké skupiny, obývající Afriku, se mezi sebou liší (Briggs, 1960; Homewood, 2008). Podíl na rozrůzněnosti může mít přírodní prostředí, společenské poměry, politické a ekonomické vlivy i vzájemná izolace (Rota et Sperandini, 2009). Nalezneme zde celé spektrum migračních aktivit vedoucí od neustále se přemísťujících kočovných skupin až po usedlé osadníky vesnic (Bates, 2004; Rota et Sperandini, 2009; Smith, 2005). Toto migrační kontinuum obsahuje dva hlavní body. Prvním bodem je nomádství – neboli kočovné pastevectví. V tomto případě je pro pastevece typická vysoká mobilita, která probíhá v nepravidelných intervalech. Druhým bodem je transhumace, jejíž význam spočívá v pravidelné migraci se zvířaty podle sezónní dostupnosti pastvin. Při transhumaci doprovází stádo jen část skupiny, která během svých cest také obchoduje s usedlými obyvateli. Druhá část skupiny zůstává v domovských vesnicích (Rota et Sperandini, 2009).

Společným rysem pastevců je jejich mobilita, která jim umožňuje vést produktivní život v oblastech, které mají jinak jen velmi malé využití (Anonym, 2008; Richerson, 2001; Rota et Sperandini 2009). Díky mobilitě mohou nejen naplňovat základní potřeby svých stád, ale jejich sezónní pohyb jim umožňuje vyhýbat se ohniskům nemocí (Rota et Sperandini, 2009). Schopnost přežít v takovýchto podmínkách mají i díky obchodním vztahům se sousedícími zemědělci, kteří na rozdíl od pastevců vedou usedlý život (Liseele, 2010). Kooperace mezi pastevcí a zemědělci, zahrnující převážně výměnu zboží, probíhá již od začátku jejich společného soužití (Beneš, 1994; Homewood, 2008; Richerson, 2001).

Pedersen et Benjamensen (2008) se ve své studii zabývali porovnáváním pasteveckých a zemědělských skupin obývajících Gourmu v Mali (území jižně od řeky Niger, severně od hranic Burkina Faso a západně od Gao). Mezi hlavní dvě zkoumané etnické skupiny patřili Tuaregové (pastevci) a Songhaiové (zemědělci). V severním sahelu je to především počasí co určuje, zda budou pastviny v průběhu roku vyhovující či ne. Nomádi jsou závislí na pohybu z místa na místo a i v dobrých letech se může stát, že nemohou najít vodu ani pastvu. Pastevci se krom chovu zvířat zabývají také lovem, sběrem a obchodováním. Zemědělci spíše používají strategii uschovávání potravy od jedné sklizně ke druhé. Pro kočovníky je tento způsob přísunu potravy vzhledem k jejich mobilitě nevýhodný. Nošení velkého množství potravin je pro ně nemožné. Hospodářská zvířata musí mít také přístup k minerálním půdám, aby měla dostatek soli, a minerální půdy nejsou

všude dostupné. Na území, kde pastevci žijí, je to ovšem produktivnější strategie než zemědělství. Autoři výše uvedeného výzkumu také zjistili, že nejlépe živěné děti na tomto území, jsou právě děti pastevců. Na základě tohoto zjištění vyvozují, že usedlí zemědělci se hůře adaptovali na suché prostředí (v tomto případě prostředí severního sahelu) než nomádští pastevci. Důvodem lepší adaptace pastevců může být právě fakt, že se u nich na rozdíl od zemědělců vyvinula schopnost štěpit mléčný cukr v průběhu celého jejich života. Tato schopnost jim umožnila využívat živiny přítomné v mléce i v dospělosti a tím zvyšovat i svou reprodukční zdatnost.

### **3.2.3.1. Počet a rozšíření pasteveckých populací**

V roce 2009 se počet pastevců odhadoval na 200 miliónů (Rota et Sperandini, 2009).

Geograficky jsou pastevci rozšířeni především na území Afriky (zejména Keňa, Etiopie, Súdán, Čad, Nigérie, Niger, Burkina Faso, Mali a Mauretánie), Blízkém (Írán, Turecko, Sýrie) a Dálném (Mongolsko a Čína) východě a také ve východní Evropě (Krätli, 2001). Pokud bych měla vyjmenovat alespoň některé pastevce z Afriky, tak v západní Africe jsou to Fulbové a Maurové, v severní a střední Africe Tuaregové a Tubuové, na severovýchodě Arabové a Bedžové, ve východní Africe Dinkové, Nuerové, Masajové a Turkanové, poblíž Velkých jezer Tutsiové a Hutové a na jihovýchodě pak Damarové, Hererové a Khojové (Homewood, 2008).

### **3.2.4. Africké pastevectví**

Dnešní afričtí pastevci jsou jedni z mála tradičně žijících pastevců na světě. Obývají obvykle místa, která jsou kvůli nízkým srážkovým podmínkám a extrémním teplotám nevhodné pro celoroční pěstování rostlin (Rota et Sperandini, 2009; Smith, 2005). Jedná se zejména o pásmo sahelu, kde během léta dosahují srážky přibližně jen 250 mm a v zimě je kraj bez srážek (Richerson 2001). Vyvinuly se zde úspěšné mechanismy adaptace pro udržení ekologické rovnováhy mezi pastevci a přírodním prostředím (Rota et Sperandini, 2009). Pastevectví je tedy ekonomicko-sociální systém dobře uzpůsobený sušším podmínkám a vyznačující se komplexním souborem zkušeností a znalostí, které uchovávají rovnováhu mezi pastvinami, hospodářskými zvířaty a lidmi (Rota et Sperandini, 2009).

Všichni kočovní pastevci jsou primárně živi z chovu zvířat a zvířata jsou zase živa z pastvy (Briggs, 1960). Úspěch každé pastevecké rodiny sídlící v Africe je založen na množství mléka, které jejich stádo vyprodukuje. Zvířata chovaná pastevci, jsou stejně jako pastevci, přizpůsobena k drsnějšímu prostředí, ve kterém je důležitější odolnost a schopnost přežít, než co největší doживosti. Doживost samotná je ostatně velmi citlivá na sezónní vlivy a během období sucha může docházet k výraznému poklesu produkce mléka (Nicholson, 1984).

### 3.3. Tuaregové

Fyzicky se Tuaregové řadí k nejvyšším lidem Sahary a obecně by se dalo říci, že i mezi nejvyšší lidi vůbec (Danubio et al., 2011). Jsou štíhlé, ale svalnaté postavy a jejich vlasy jsou většinou tmavé barvy (Briggs, 1960). Krevní skupiny Tuaregů ze Sahary mají stejnou distribuci jako berberské skupiny, které jsou kupodivu podobné Baskům žijícím v oblasti západních Pyrenejí (Briggs, 1960).

V minulosti byli Tuaregové označováni za „rytíře pouště“. Dokázali se totiž prosadit jako obávaní válečníci a to především proti francouzským kolonistům. Obživu a bohatství čerpali jak z karavanního obchodu přes Saharu, tak i chovem domácích zvířat (Kratochvílová, 2010).

Svým původem spadají do široké etnické skupiny Berberů (Briggs, 1960), kteří jsou považováni za původní obyvatelé severní Afriky (Brett et Fentress, 1997). Termín Berberů slouží jako souhrnné označení pro mnoho skupin hovořících vzájemně více či méně srozumitelnými berberskými jazyky, jež tvoří samostatnou skupinu v rámci afroasijské jazykové rodiny. Mezi Berbery patří kromě Tuaregů například Rífové, Berabeři, Šluhové, Mzabové a Kabylové. Tuaregové se však svým způsobem života a materiální kulturou od ostatních Berberů odlišují (Jiroušková, 2007). Mimo jiné si právě Tuaregové jako jediní zachovali až do dnešního dne původní berberské písmo *tifinar* (Kratochvílová, 2010).

Celosvětově používané označení „Tuareg“ bylo převzato francouzskými kolonisty z arabštiny. Zřejmě se jedná o odvození od plurálu slova *targi*, což znamená obyvatel oblasti Targa, což je tuarežský název pro libyjský Fezzán, odkud údajně Tuaregové na jih Sahary přišli (Kratochvílová, 2010). Samotní Tuaregové se však s tímto označením nikdy neztotožnili a své skupiny pojmenovávají názvy obsahující slovo *kel* (tj. člověk)

(Jiroušková, 2007). K tomuto označení přidružují buď název území, ze kterého pocházejí (např. alžírští Tuaregové obývající pohoří Ahagar si říkají *Kel Ahaggar*, *Tassili-n-Ažžer*, *Kel Ažer*, malijští Tuaregové obývající oblast Adrar des Iforas *Kel Adrar*, nigerští Tuaregové obývající pohoří Air *Kel Air* atd. Nebo si jednotně říkají *Kel Tamašek*, tedy lidé, mluvící jazykem *tamašek* (Keenan, 2004; Lhote, 1962).

Tuaregové obývají rozsáhlé území (asi 2 miliony km<sup>2</sup>), které zahrnuje většinu centrální Sahary (Briggs, 1960). Jedná se převážně o horské masivy s přítomností spodních vod a přiléhající část sahelu. Jejich území je rozděleno mezi pět států Afriky: pouštní oblasti jižního Alžírsko (Ahaggar a Tassili-n-Ažžer) a Libye (Fezzán) a severní pouštní oblasti Nigeru a Mali a sever Burkiny Faso (Homewood, 2008).

Celkový počet Tuaregů se odhaduje na přibližně 1,5 milionu. Nejpočetnější skupiny žijí v Nigeru (720 000) a Mali (568 000). V Alžírsku jich žije přibližně 40 000, v Libyi 17 000 a nejmenší počet Tuaregů žije na území Burkiny Faso (Lewis et al., 2016).

### 3.3.1. Historie Tuaregů

Přítomnost Berberů na Sahaře můžeme přibližně datovat do doby před 6 000 lety. Datování bylo prováděno na základě prehistorických kreseb, které znázorňují jak lidské postavy (lovce a bojovníky), tak i nejrůznější druhy divokých a domácích zvířat (např. žirafy, slony a krávy).



**Obr. 2.** Ukázka maleb z pohoří Tassili-n-Ažžer v Alžírsku

(převzato z <http://whc.unesco.org/en/list/179>)

Např. v pohoří Tassili-n-Ažžer bylo nalezeno okolo 15 000 jednotlivých kreseb, které se datují až do doby před 12 000 lety (Coulson et Campbell, 2010).

V průběhu 7. stol. n. l. kvůli nájezdům arabských beduinů se předci Tuaregů stahovali hlouběji do jižních oblastí Sahary. Tento ústup jim umožnil zachovat si vlastní kulturu, jazyk i písmo a zároveň začal naplno podporovat jejich kočovný způsob života (Homewood, 2008; Záhořík, 2006). Plně kočovný život jim zůstal až do konce 19. století, kdy byla saharská území kolonizována francouzskými vojsky (Keenan, 2004). K velkému střetu mezi Francouzi a Tuaregy došlo v roce 1917, kde si francouzská vojska sice Tuaregy podrobila, ale utrpěla přitom značné ztráty (Anonym, 2011).

Během následujících let bylo území obývané Tuaregy začleněno do Francouzské Západní Afriky a po pádu kolonialismu v Africe v 60. letech do jednotlivých států západní Afriky. Tehdy se z dříve obávaného lidu stala národnostní menšina. Po založení samostatného Alžírsku přišli Tuaregové o většinu svých práv. Stejná situace nastala posléze i v dalších státech zabírající tuarežská území (v Nigeru, Mali a Libyi) a vyústila v řadu rebelií, se kterými se setkáváme prakticky dodnes (např. v severním Mali v roce 2012 vedená Národním hnutím za osvobození Azavadu založeným tamními Tuaregy).

S nedávnou historií Tuaregů je úzce spjat plukovník Kaddáfí, který je v 90. letech podporoval v jejich bojích proti nigerské vládě a v bojích v Mali. Později Kaddáfí asistoval při uzavření mírových dohod a poskytl azyl ozbrojeným rebelům poté, co boje skončili. Díky jeho dřívější podpoře mohl počítat s pomocí Tuaregů, které za peníze verboval do boje proti Libyi.

### **3.3.2. Jazyk**

Tuaregové mluví jazykem tamašek, který řadíme do berberské větve afroasijské rodiny. Afroasijská jazyková rodina vznikla s největší pravděpodobností v subsaharské Africe. Udává se, že centrem vzniku byla jihozápadní Etiopie, kde se dodnes hovoří nejstarším jazykem z afroasijské jazykové rodiny - tzv. jazykem omotským (Blench, 2006). Podle jiných názorů se ale pravlast afroasijských jazyků nachází někde mezi středním Nilem a pobřežím Rudého moře (Ehret, 2002).

Kromě větve berberské patří do afroasijské rodiny i větve omotská, čadská, kušitská, semitská a stará egyptština. Těchto šest jazykových skupin zahrnuje dohromady přibližně 400 jazyků (Heine et Nurse, 2000; Blench, 2006). K rozdělení jednotlivých větví došlo patrně ještě před vznikem zemědělství, některé se ale rozrůznily až v souvislosti s

pastevectvím. Afroasijská jazyková rodina sahá až do severní Afriky a odtud na Přední východ a Arabský poloostrov (Blench, 2006).

### **3.3.2.1. Berberská větev**

Berberská větev afroasijských jazyků je převážně rozšířena na západě severní Afriky, můžeme ji však nalézt i v Nigeru a Mali, kam byla rozšířena kočovnými Tuaregy. Berberské jazyky mimo jiné zastupují i extrémně izolované jazykové skupiny pocházející např. z izolovaných skupin v Mauretánii a dnes již vymřelý jazyk obyvatel Kanárských ostrovů guanštinu.

Tato rozmanitá jazyková větev se dále dělí do čtyř skupin a to na východní skupinu, severní skupinu, tamašek a zenagu. Každá ze skupin zahrnuje určitý počet jazyků, z nichž mezi nejrozšířenější patří např. arabská berberština, kabylišťina, rif, tidiket a tamašek .

Tamašek se dále dělí do čtyř dialektů: tahaggart tamašek, tawallammat tamašek, tajart tamašek a tamašek. (Lewis et al., 2016).

### **3.3.3. Zdroje obživy**

Potravní zdroje Tuaregů, jakožto obyvatelů pouště, jsou spjaté s jejich přírodním prostředím, tedy pouští a polopouští a jsou tudíž poměrně omezené.

Základním zdrojem obživy je mléko a mléčné produkty získávané z domácích zvířat (Briggs, 1960). Nejčastěji se konzumuje kozí mléko a to z důvodu malé náročnosti koz na kvalitní pastviny, dále pak mléko velbloudí. Velbloudí mléko je velmi ceněné jak pro značnou výživnost, tak i pro vysoký obsah vitamínu C a antibakteriální účinky. Za antibakteriální účinky velbloudího mléka je zodpovědná mléčná bílkovina laktoferin, jejíž koncentrace je u velbloudího mléka desetkrát větší než u mléka kravského (González-Chávez et al., 2009; Lukášová, 1999). Maso Tuaregové příliš nekonzumují, jedí jej v podstatě jen při zvláštních příležitostech, jako jsou oslavy a festivaly nebo při přijímání důležitých návštěv. A právě konzumace mléka je jejich alternativou pro příjem živočišných bílkovin, které nepocházejí z masa. V sezóně hojně konzumují datle a melouny. Obilniny získávají od zemědělců výměnou za mléčné produkty. V zimě je skladba jídla složená převážně ze sýrů a velbloudího mléka. Tuto stravu mohou ještě doplňovat semena

divokých rostlin (Briggs, 1960). Nutriční a kalorické hodnoty jednotlivých potravních položek udává tab. 1.

**Tabulka č. 1.** Nutriční a kalorické hodnoty stravy pastevců

	Mléko	Maso	Tuk	Krev	Obiloviny
Kcal/100g	60-80*	100-150	900	33	350
% protein	4*	15-20		10	5
% tuk	5*	5	100	+	+
% cukr	5*	<5		+	9
Vitamín A	+		+		
Vitamín B	+	+			
Vitamín C	+				
Železo		+		+	
Vápník	+				

\* sezónní variabilita

(Převzato a upraveno z Homewood, 2008; str. 181).

### 3.3.3.1. Chov zvířat

Mezi nejdůležitější chovaná zvířata na Sahaře patří velbloudi, ovce a kozy (Briggs, 1960).

Tuaregové chovají dva typy velbloudů. Jedni jsou chováni za účelem převážení nákladů v karavanách a ti druzí za účelem jízdy. Mimo těchto jízdních vlastností se velbloudi chovají i za potravními účely. Významný užitek mají velbloudi, jak již bylo řečeno, stran mléčné produkce. Za příznivých podmínek velbloudí samice vyprodukuje mezi 6 – 10 litry mléka za den. Kromě velbloudů chovají Tuaregové i ovce a kozy a v jižněji položených oblastech i krávy (Briggs, 1960).

Zvířata se dojí převážně večer a mléko se pije nejčastěji druhý den, kdy je mírně nakyslé. Z mléka se vyrábí také sýr a máslo vytloukáním mléka v koženém vaku. Gwin (2011) cituje ve svém článku jednoho tuarežského pastevice: „Zvířata jsou pro Tuaregy vším. Pijeme jejich mléko, jíme jejich maso, používáme jejich kůže, obchodujeme s nimi. Když zahynou zvířata, zahynou i Tuaregové.“

### 3.3.4. Společenské a kulturní zvláštnosti

Tuaregové se rozdělují do tří konfederací: Tassili-n-Ažžer, Ahaggar, Adrar Iforas (Briggs 1960) a vytvářejí velké rodové skupiny, které se sdružují do několika kmenů (Briggs 1960; Jiroušková, 2007). Jejich společnost je mimořádně hierarchická (Randall, 2005).

Tradiční společenské uspořádání dělilo Tuaregy na „aristokraty“ (válečníky a obchodníky) a „podřízené“ (pastevence) s přidruženou vrstvou kovářů, marabutů (svatých mužů) a otroků, jež bývali převážně černošského původu (Briggs 1960; Keenan, 2004). Tato uspořádání dnes již neplatí a jeho zbytky z vědomí lidí pomalu mizí. V přítomnosti je ve všech státech, kde žijí, zaveden společenský systém založený na demokratických principech a Tuaregové se s ním postupně sžívají (Kratochvílová, 2010).

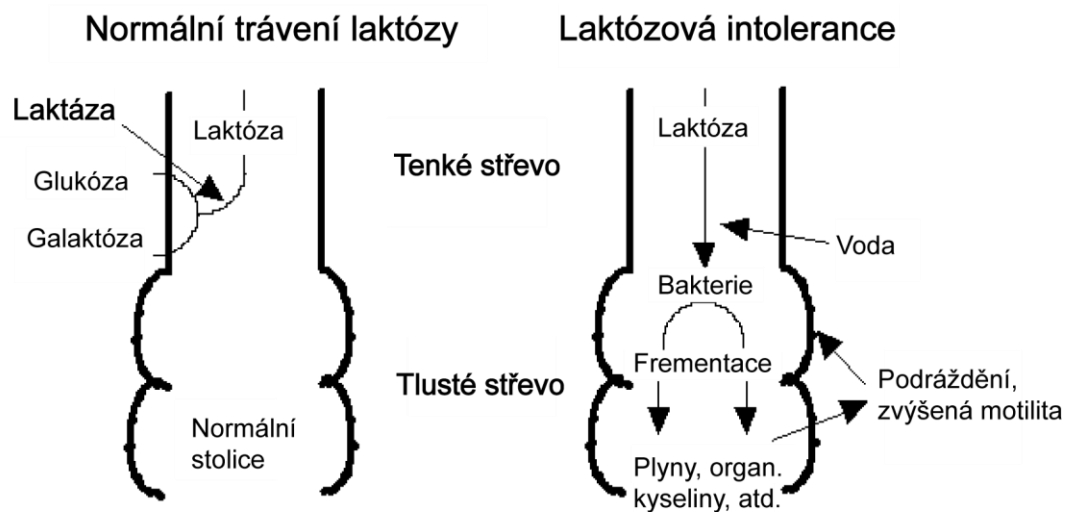
Společnost Tuaregů je převážně monogamní a ženy jsou zde ve velké úctě. V případě výběru partnerů si žena může vybrat sama a partnerství je rovnoprávné (Kratochvílová, 2010).

Zjistit soupis majetku Tuaregů bylo vždy velmi těžké a to zejména kvůli tomu, že vlastnictví jednotlivých rodin záleží na způsobu života, který vedou (Keenan, 2004). V obecné míře se však dá říct, že plně kočovní Tuaregové mají vybavení nejskromnější. Kvůli jejich časté mobilitě je pro ně důležité, aby měli co nejméně zátěže. Stěžejní pro každou nomádskou rodinu je stan vyrobený z kůže, která dokonale chrání jak před sluncem, tak i větrem a deštěm. V případě transhumace se majetek rozrůstá i o domek, postavený na určitém místě po celý rok (Kratochvílová, 2010).

Kvůli postupné urbanizaci a dlouhodobému období sucha, při němž zahynula velká množství zvířat, byla řada Tuaregů donucena přehodnotit dosavadní způsob života a uchýlit se alespoň k částečnému životu ve vesnicích či městech (Záhořík, 2006). Nejvíce z nich se usazuje na území jižně položeného sahelu, kde se věnují částečně i zemědělství (Kratochvílová, 2010).

### 3.4. Laktázová perzistence

Značné množství lidí není v dospělosti schopno přijímat větší množství čerstvého mléka, aniž by se poté nepotýkali se střevními obtížemi. Tento stav je globálně nazýván jako laktózová intolerance. Obtíže po konzumaci mléka jsou způsobeny neschopností trávit mléčný cukr vlivem ukončení produkce laktázy v tenkém střevě (Scrimshaw et Murray, 1988). Nestrávená laktóza se tak dostává do tlustého střeva, kde je trávena střevní flórou, což způsobuje zažívací obtíže.



**Obr. 3.** Rozdíly v případech laktózové tolerance a intolerance u dospělých

(Upraveno a převzato z <http://www.4-lactose-intolerance.com/images/lactase-failure.gif>)

Během posledních 40 let bylo zjištěno, že u různých populací a u určitého počtu jedinců, schopnost trávení laktózy v dětství nemizí a zachovává až do dospělosti, jakožto selekční výhoda založená na dodatečné výživě z mléka (Bersaglieri et al., 2004; Fang et al., 2012; Swallow, 2003; Tishkoff et al., 2007). Tento jev, založený na expresi laktázy v dospělosti, se označuje jako laktázová perzistence (LP) (Ingram et al., 2009; Fang et al., 2012).

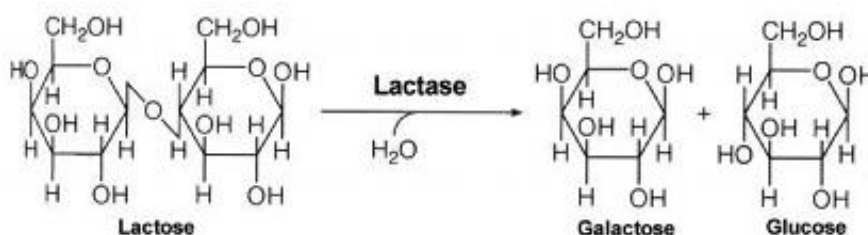
LP je tedy genetická adaptace vázaná na kulturní změnu související s mléčnou produkcí. Je jedním z příkladů tzv. geneticko-kulturní ko-evoluce (Laland et al., 2010), i jedním z nejlepších příkladů na selekci založených evolučních změn u lidských populací pijících mléko (Sajantila, 2014). Aby se tyto vazby prokázaly, zkoumali teoretici

biologové genetické modely populací v souvislosti s tím, zda kulturní procesy mohou mít vliv na lidskou evoluci. Výsledkem bylo potvrzení, že přirozený výběr může vést ke změně genomu a byly odhaleny řady genů, které korespondují s kulturními praktikami a které v poslední době prošly pozitivní selekcí (Laland et al., 2010).

### 3.4.1. Laktóza

Laktóza - neboli mléčný cukr patří svým chemickým složením mezi disacharidy a skládá se z jednodušších monosacharidů glukózy a galaktózy, které jsou navzájem spojeny  $\beta$ -1,4 glykosidovou vazbou. Je obsažena v mléce většiny savců, kde se vyskytuje jako jediný zástupce sacharidů (Swallow, 2003). Laktóza je významným zdrojem energie, která je nezbytně nutná pro správný vývoj a růst novorozenců. V lidském mateřském mléku nalezneme přibližně 7,2g/100 ml mléka, oproti tomu v kravském mléce je ve 100 ml mléka pouze 4,7 g laktózy (Lomer et al., 2008).

Aby mohla být laktóza v tenkém střevě vstřebána a následně využita, musí být nejprve hydrolyzována specifickým enzymem laktázou (Fojík et al., 2013).



Obr. 4. Hydrolýza laktózy

(Převzato z <http://bcrc.bio.umass.edu/intro/manual/images/1/18/Lactase1.png>)

### 3.4.2. Laktáza

Laktáza, celým názvem laktáza-phlorizin hydroláza je enzym ( $\beta$ -galaktosidáza) vytvářený buňkami epitelu tenkého střeva (Fang et al., 2012; Fojík et al., 2013; Grand et al., 2015; Swallow 2003). Jedná se o glykoprotein, který je zodpovědný za štěpení laktózy na jednotlivé lépe vstřebatelné monosacharidy – glukózu a galaktózu. Monosacharidy vzniklé touto hydrolýzou jsou poté volně absorbovány střevními enterocyty do krevního oběhu. Glukóza je využita jako zdroj energie a galaktóza se stává součástí glykolipidů a glykoproteinů (Fang et al., 2012; Fojík et al., 2013).

Laktáza má zásadní význam pro všechny novorozence savců, jelikož jediným zdrojem jejich výživy je právě mléko, které jak již bylo řečeno, obsahuje laktózu. Produkce laktázy je tedy společná pro všechny savce (Beneš, 1994; Ingram et al., 2009; Fojík et al., 2013). Jedinou výjimkou jsou ploutvonožci, jelikož jejich mléko laktózu neobsahuje (Ranciaro et al., 2014).

Expres laktázy je na rozdíl od ostatních enzymů poněkud odlišná, začíná v prenatalním období avšak do 24. týdne je aktivita laktázy nízká. Aktivita laktázy se začíná zvyšovat během 3. trimestru (Grand et al., 2015). Její nejintenzivnější produkce je přirozeně v kojeneckém věku, bez ohledu na to, zda se jedná o člověka, který bude v dospělém věku laktázově perzistentní či laktázově intolerantní. Syntéza laktázy začíná po odstavení dramaticky klesat. Snižování exprese laktázy je fyziologický jev a pro všechny savce je naprosto přirozený (Fang et al., 2009; Jobling et al., 2014; Ranciaro et al., 2014).

Absence laktázy v dospělosti vede k laktázové intoleranci a je tedy příčinou, proč není většina světové populace schopna konzumovat větší množství čerstvého mléka bez vystavení se střevním potížím, jako jsou křeče, plynatost nebo průjem (Lomer et al., 2008).

Fermentované výrobky, jako je např. jogurt, tvaroh nebo sýr snášejí bez potíží i jedinci, u nichž perzistence laktázy není doložena (Beneš, 1994). Důvodem proč tomu tak je, je snížení koncentrace laktózy ke kterému dochází během procesu fermentace. Tento pokles je způsoben mléčnými bakteriemi (Mnontalto et al., 2006).

### **3.4.3. Hypotézy vzniku laktázové perzistence**

Genetické mutace způsobující LP vznikly nejspíše nezávisle na sobě nejméně u tří různých populací (Tellam, 2012). Následující hypotézy se snaží vysvětlit příčiny, které k tomu vedly.

#### **3.4.3.1. Kulturně-historická hypotéza**

Tuto hypotézu nezávisle na sobě formulovali dva badatelé a sice Simoons (1969,1970) a McCracken (1971). Podle této teze je LP spojena s domestikací skotu a mléčnou produkcí. Je založena na přirozeném výběru v novém kulturním prostředí s pastevci a jejich stády dobytka či jiných domácích zvířat, která poskytují nadbytek mléka. Pastevci chovající zvířata si postupem času začali uvědomovat pozitiva, která přinášela konzumace mléka,

a začali ho častěji zařazovat do svého jídelníčku. Jedinci, kteří díky mutaci způsobující LP mohli trávit laktózu i v dospělosti, mohli tak využívat nutriční hodnoty získávané z mléka, na rozdíl od jedinců, kteří laktózu trávit nemohli (Simoons, 1970). Laktázově perzistentní jedinci navíc netrpěli žádnými zažívajícími obtížemi a jejich strava byla proto bohatší o výživné složky (Swallow, 2003).

#### **3.4.3.2. Nedostatek vitamínu D**

Hypotéza o nedostatku vitamínu D byla formulována pro populaci obývající severní Evropu, která je známá svým nedostatkem slunečního záření. Hypotéza odůvodňuje vysoký výskyt LP v severní Evropě a její snižující četnost směrem ke Středozeří. Se snižující se četností LP přímo úměrně klesá i konzumace čerstvého mléka ku prospěchu fermentovaných mléčných produktů, které laktózu obsahují v mnohem menším množství (Flatz and Rotthauwe, 1973). Již zmíněný nedostatek slunečního záření vede ke snížené tvorbě vitamínu D, který řídí hladinu vápníku v krvi (Gerbault et al., 2009). Deficit tohoto vitamínu má tak za následek onemocnění zvané křivice (rachitis), které je způsobeno právě nedostatkem vápníku, jenž je absorbován ve střevním epitelu právě díky vitamínu D. LP u severských populací jim umožňuje přijímat vyšší množství mléka a tím tedy i vyšší příjem vápníku, který je v mléce rovněž přítomen. Konzumace mléka tak napomáhá organismu vyrovnávat se s nepříznivými environmentálními vlivy (Gerbault et al., 2009; Holden and Mace, 1997).

#### **3.4.3.3. Aridní klima**

Hypotéza aridního klima byla, jak již název napovídá, formulována pro území, kde je úhrn srážek nižší než vsak a výpar. Ve velmi suchém prostředí zvyšuje vysoký obsah vody v mléce šance na přežití jedincům, kteří jsou schopni trávit laktózu. Jedná se například o pastevece, pro které se pohyb v prostoru s nedostatkem pitné vody stal standardem. Tato hypotéza počítá s tím, že trávení mléčného cukru je zbavilo nežádoucích střevních potíží, které je vystavovaly nadměrným ztrátám vody a vyčerpání (Cook et al-Torki, 1975; Cook, 1978). Hypotéza je podporována vysokou frekvencí LP u pasteveckých skupin v aridních oblastech jako je např. na Střední východ nebo severní Afrika, kde se vyskytuje např. u beduínů, Fulbů a v neposlední řadě také Tuaregů (Holden and Mace, 1997). Na druhé straně je třeba poznamenat, že testování LP u pasteveckých Fulbů v Burkině Faso proběhlo bez zdravotních komplikací i u jedinců, kteří laktózu netrávili (Černý, osobní sdělení).

#### 3.4.3.4. Malárie

Malárie je závažné tropické infekční onemocnění způsobené parazity rodu *Plasmodium*, které jsou přenášeny komáry rodu *Anopheles*. Touto chorobou se ročně nakazí desítky miliónů lidí (Scholte et al., 2003). V 80. – 90. letech se začala zkoumat domněnka, že by mléko mohlo souviset s odolností proti malárii. Byl např. zjištěn fakt, že během prvních tří měsíců novorozence je dítě chráněno proti malárii přijímáním protilátek z mateřského mléka. S rostoucím věkem dětí však riziko ohrožená malárií stoupá (Anderson et Vullo, 1994).

Existují však i studie, které mají na problematiku LP a odolnosti vůči malárii odlišný názor. Mléko je bohaté na riboflavin (vitamín B2) a právě lidé s nedostatkem riboflavinu mohou být do určité míry chráněni proti malárii (Anderson et Vullo, 1994). Deficit riboflavinu v červených krvinkách totiž inhibuje růst parazitů způsobujících malárii (Dutta, 1991). Mechanismus této obrany je významný, avšak stále nejistý. Např. studie Anderson et al., (1994) se zabývala výzkumem vysoké prevalence familiárního poklesu flavinů v červených krvinkách u lidí z oblasti Ferrara (Itálie). Pokles flavinů nebyl však z důvodu jeho nedostatku ve stravě (flavin se dále nachází i v játrech, ledvinách či ořechách), ale kvůli pomalé aktivitě metabolismu riboflavinu.

Hypotézu o prospěšnosti mléka zkoumal i Lokki et al., (2011), který studoval populaci Fulbů. Fulbové jsou známi svojí nižší náchylností k malárii a vyšší četností jedinců s LP, oproti sympatrickým populacím. Na základech jeho výzkumu nepodpořil teorii, že jedinci s ponechanou možností trávení laktózy jsou více odolní proti této parazitární. Avšak sami autoři poukazují na to, že tato teorie potřebuje další zkoumání.

#### 3.4.4. Testování hypotéz

První tři výše uvedené hypotézy testovali Holdenová a Maceová (Holden et Mace, 1997) na souboru 62 populací z celého světa. Mezi zkoumané populace patřili zástupci všech kontinentů. Z Afriky to byli např. Beduíni, Egyptané, Fulbové, Tuaregové a Tunisané. Z Ameriky se jednalo např. o Apače a Inuity. Z Asie to byli např. Číňané, Japonci, Mongolové a Turci. A mezi zkoumané populace z Evropy patřili např. Češi, Irové, Maďaři, Španělé, Rusové a Řekové. Pro otestování všech analýz využili srovnávací metodu, kdy porovnávali příslušnou environmentální proměnnou (úroveň pastevectví, intenzitu slunečního záření, stupeň vyprahlosti) k výskytu LP u dospělých v různých

populacích. Výsledkem jejich šetření byla podpora hypotézy, že LP je kulturně-historickou adaptací na pití čerstvého mléka. A zároveň zamítli tvrzení, že trávení laktózy je rozšířeno jen v aridním prostředí.

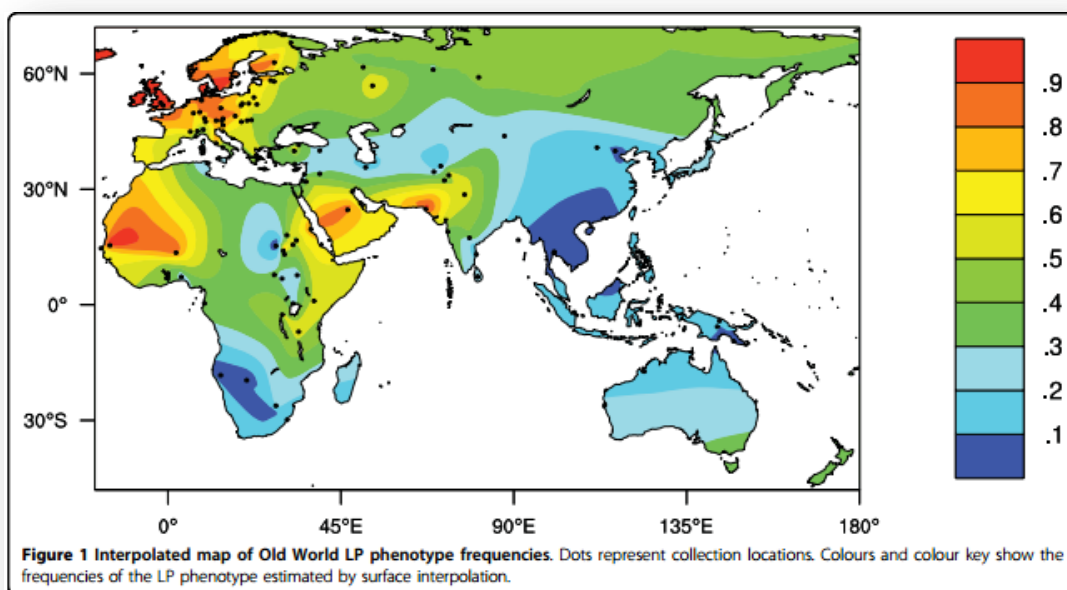
Na první dvě hypotézy se také zaměřili i Gerbault et al., (2009), kteří svým výzkumem distribuce LP potvrdili zvýšenou frekvenci LP v severozápadní Evropě a tím i platnost hypotézy nedostatku vitamínu D pouze pro severní Evropu. Výzkum prováděl u 115 populací z celého světa. Jejich metoda výzkumu byla založena nejprve na analýze distribuce LP na jednotlivých kontinentech ve vztahu k prostředí, úrovni pastevevství a genetiky. Poté pomocí počítačových simulací a velké archeologické databáze dat týkající se domestikace, určil frekvenci LP na odlišných místech.

Co se týče hypotézy o vztahu mezi LP a malárií, tak na tu se ve své studii zaměřil Lokki et al., (2011). Pro účely své studie použil krevní vzorky pocházející od 162 Fulbů a 79 Dogonů. Obě populace obývají stejné území sahelské části Mali. Pro vyhodnocení vztahu mezi LP a malárií nejprve sekvenovali region dlouhý 400 bp, obklopující hlavní evropskou variantu -13910\*T. Ze 79 Dogonů byl pouze jeden z nich heterozygot pro LP, ostatní byli homozygoti pro ancestrální alelu C. U Fulbů byl tento evropský polymorfismus nalezen ve frekvenci 37%. Dále byly nalezeny další tři mutace ve společné frekvenci 6,2%, mezi které patřila i nová varianta -13906\*C. Pro další zkoumání použili krevní nátěry, které byly zkoumány pod mikroskopem, a následně se zde vyhodnocoval počet parazitů zodpovědných za malárii. Výsledkem studie bylo zjištění, že u Fulbu bez LP byla malárie mikroskopicky detekována u 24%, u Fulbů s LP byla malárie prokázána pouze u 18%.

#### **3.4.5. Světové rozšíření LP**

Díky četným výzkumům zabývajícím se výskytem LP u různých lidských populací se pomalu začíná ukazovat reálná frekvence celosvětového rozšíření. Nadále však budou potřeba i další výzkumy v oblastech jako je západní a jižní Afrika, jihozápadní Evropa,

Přední východ a území střední a jižní Asie (Itan et al., 2010).



**Obr. 5.** Celosvětové rozšíření LP

(Převzato z Itan et al., 2010)

Jak ukazuje obr. 5 frekvence LP je celosvětově velmi nerovnoměrná (Itan et al., 2010). Vyšší četnost byla dokumentována u populací severní Evropy (Gerbault et al., 2009), Předního východu, východní Afriky (Ranciaro et al. 2014), západní Afriky (Lokki et al., 2011), střední Asie (Heyer et al., 2011) a Arabského poloostrova (Al-Abri et al., 2012; Priehodová et al., 2014).

Tellam (2012) uvádí, že v dnešní době je schopno trávit laktózu až 1/3 lidské populace. Nejvyšší frekvence LP je doložena v severozápadní Evropě - u Švédů a Dánů je frekvence vyšší než 90% (Enattah et al., 2008), klesající směrem na jih a východ (Ingram et al., 2009; Tishkoff et al., 2007). V Indii je nejvyšší frekvence na severozápadě (Gallego Romero et al., 2012), ale obecně vzato se výskyt LP v jižní Asii dá považovat za nízký (Ingram et al. 2009). V Africe je distribuce nerovnoměrná a to převážně díky kočovným pastevcům, kteří mají ve srovnání s okolními usedlými skupinami frekvenci LP relativně vysokou. Podobně jsou na tom i beduíni ve srovnání s okolními populacemi na Předním východě (Ingram et al., 2009). U západoafrických zemědělců se výskyt LP pohybuje od 5-20%, v Číně kolem 1% a pastevců z východní Afriky mohou mít četnost výskytu až 88% (Tishkoff et al., 2007).

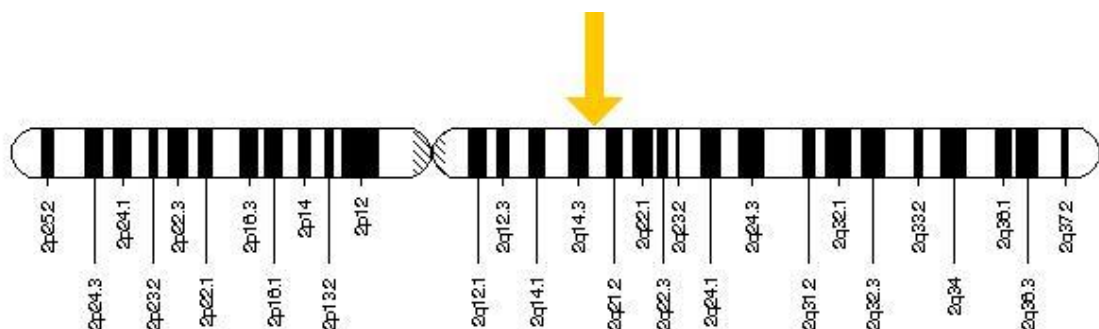
### 3.5. Genetická podstata LP

Původní pozorování v letech 1970 až 1980 vedla ke zjištění pozitivní korelace mezi LP a konzumací mléka (Holden and Mace, 1997). Na začátku se zvažovalo, že LP se projevuje důsledkem mutace v genu pro laktázu (*LCT*). Následně však bylo zjištěno, že za LP není zodpovědný samotný gen *LCT*, ale mutace nacházející se v intronech sousedního genu *MCM6* (Jensen et al., 2011; Swallow, 2003).

Genetickou podstatou LP jsou jednobodové mutace, které značně zvyšují transkripci v promotoru genu *LCT* (Tishkoff et al., 2007). Rodinné studie ukázaly, že se jedná o mendelovskou autozomálně dominantní dědičnost (Enattah et al., 2002). Jedinci tolerantní na laktózu jsou tedy buď heterozygoti (*LCT\*P/LCT\*R*) nebo homozygoti (*LCT\*P/LCT\*P*) pro dominantní alelu bránící normálnímu poklesu laktázové aktivity. Naproti tomu jedinci na laktózu intolerantní jsou homozygoti s autozomálně recesivní alelou (*LCT\*R/LCT\*R*), kde R znamená recesivní (Jobling et al., 2014) a P znamená perzistentní alela.

#### 3.5.1. Gen *LCT*

*LCT* je gen kódující enzym laktázu (Bersaglieri et al., 2004; Sajantila, 2014; Swallow, 2003), a to i během její exprese v dospělosti. Gen je velký přibližně 50 kb a je lokalizován na druhém chromosomu, přesnější lokace je 2q21 (obrázek č. 7). Obsahuje 17 exonů a kóduje mRNA transkript 6274 nukleotidů a preproteinů 192 aminokyselinových residuí (Swallow, 2003).



**Obr. 6.** Umístění genu *LCT* na 2. chromozomu

(Převzato z <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LCT>)

### 3.5.2. Gen *MCM6*

Gen *MCM6* neboli minichromozom kontrolující správný přepis komponent areálu 6 (*Minichromosome Maintenance Complex component 6*) je jedním z vysoce konzervativních proteinů, který společně s *MCM2,3,4,5* a 7 tvoří MCM komplex (Lee et Hurwitz, 2001; You et al., 2000). Tyto konzervativní proteiny jsou nezbytné pro zahájení replikace eukaryotického genomu.

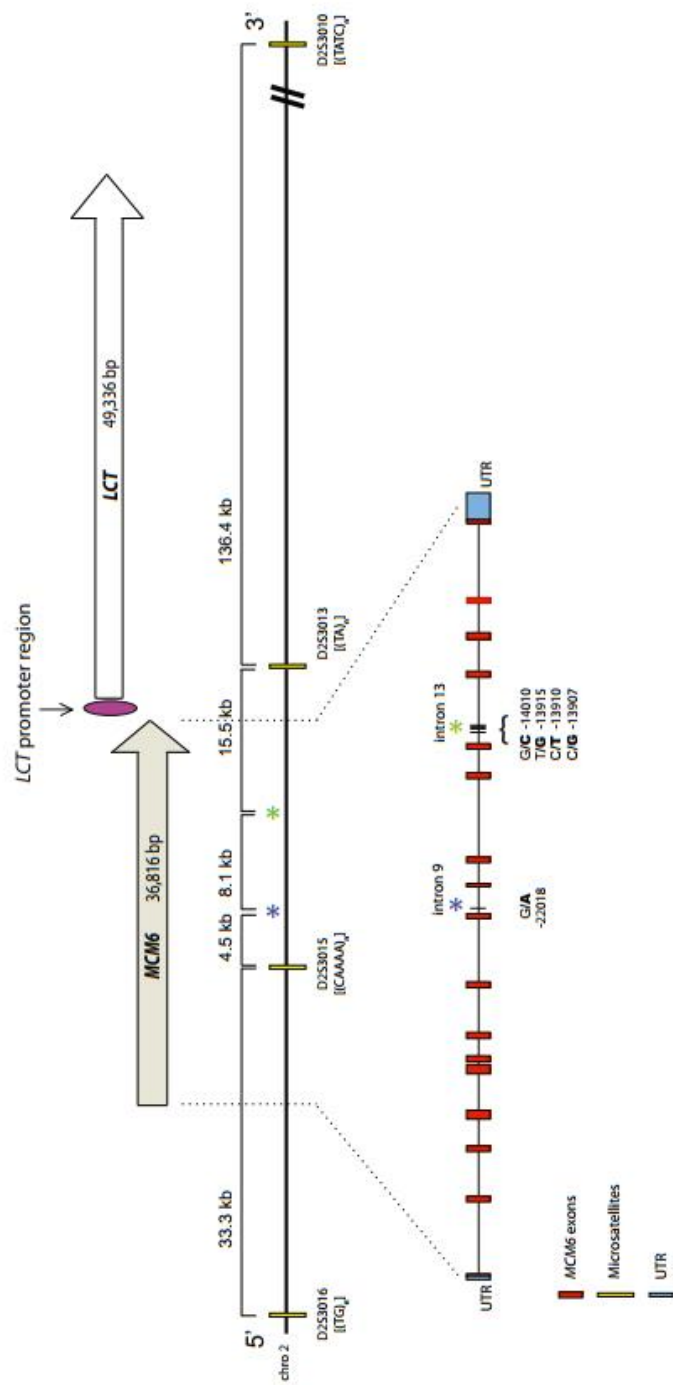
*MCM6* obsahuje 18 intronů. Mutace, které ovlivňují promotorovou aktivitu *LCT* a tím zapříčiňují LP se objevují v intronech 9 a 13.

### 3.5.3. Mutace genu *MCM6* a jejich distribuce

V genu *MCM6* se nachází několik mutací, které způsobují LP. Tyto mutace se vyskytují ve dvou intronech, a sice 9 a 13 (Bersaglieri et al., 2004; Lokki et al., 2011; Fang et al., 2012). V intronu 9 se nachází mutace -22018\*A, v intronu 13 větší počet mutací, které popíšu v následujícím textu.

Dle značného množství studií se tyto mutace u odlišných populací mohou různit. Např. u evropských populací se vyskytuje (Bersaglieri et al., 2004), další častou mutací je -22018\*G, která se však vyskytuje ve vazebné nerovnováze s mutací -13910\*T. Africké populace se na rozdíl od evropských vyznačují větší variabilitou. Mezi mutace nacházející se v okruhu 100 pb od alely -13910\*T prokazující souvislost s laktázovou perzistencí dále patří -13907\*C, -13915\*G, -14007\*A -14009\*G, -14010\*C a nově objevená -13906\*T. Na Arabském poloostrově se vyskytují čtyři varianty, které se též nachází v okruhu 100 pb od základní mutace -13910\*T a to -13907\*C, -13915\*G, -14009\*G a -14010\*C z nichž ovšem jednoznačně dominuje varianta -13915\*G. Ve střední a jižní Asii je LP dokumentována u skupin zemědělců a pastevců a objevuje se zde stejná mutace jako v Evropě, tedy -13910\*T (Heyer et al., 2011). Také v jižní Asii je LP spojena s variantou -13910\*T (Gallego Romero et al., 2012).

V níže vedených podkapitolách uvedu některé z hlavních či více diskutovaných mutací, které jsou zodpovědné za LP. Jejich lokalizace v genu *MCM6* je uvedena na obrázku č. 7. U každé mutace uvedu i její rs číslo, neboli tzv. přístupové číslo, které odkazuje na specifické SNP v dané databázi. V své práci pracuji s databází PubMed.



**Obr. 7. Geny *LCT* a *MCM6*** Na obrázku jsou vyznačené mutace v intronových oblastech *MCM6* genu; žlutou barvou jsou označeny STR polymorfismy (převzato z Ranciaro et al., 2014)

### **3.5.3.1. -13910\*T**

Varianta -13910\*T (rs4988235) je první objevenou mutací způsobující LP (Hollox et al., 2001) a je též i jednou z hlavních mutací (Enattah et al., 2008). Že právě tato alela je zodpovědná za štěpení mléčného cukru i během dospělosti, bylo zjištěno aktivitou enzymu u 196 finských jedinců (Enattah et al., 2002) a další studie tyto výsledky potvrdily (Ingram et al., 2009). Mutace je běžná pro Evropu (Ingram et al., 2009), přičemž v nejvyšších četnostech byla detekována na jejím severu. Např. studie Enattah et al., (2002) objevila tuto mutaci ve vysoké frekvenci u finské populace, dále byla vysoká frekvence pozorována i u Irů (Mulcare et al., 2004). Přes svůj evropský původ byla ale také identifikována u několika západoafrických pasteveckých populací (Tishkoff et al., 2007). Vyskytuje se např. u Fulbů z Malí ve frekvenci 37% (Lokki et al. 2011), Fulbů ze Súdánu ve frekvenci 48% (Enattah et al. 2008) a Fulbů z Kamerunu ve frekvenci 22,9% (Ranciaro et al., 2014). Detekována byla i studií Ranciaro et al. (2014) u arabských Baggarů (8%) a berberských Mozabitů z Alžírsko (27,3%).

Absence této varianty byla detekována v jižní Africe (Bersaglieri et al., 2004; Ingram et al 2009; Tishkoff et al., 2007) a vzácně byla pozorován u beduinů na Arabském poloostrově (Ingram et al., 2009; Priehodová et al., 2014), její výskyt byl potvrzen i v Indii (Gallego Romero et al., 2012) u zemědělců (Tádžikové), tak pastevců (Kazaši, Karakalpakové, Kyrgyzové, Turkmeni) žijících ve střední Asii (Heyer et al., 2011).

Na základě studia vazebné nerovnováhy se odhaduje, že alela -13910\*T vznikla u Evropanů přibližně v posledních 2 000 – 20 000 letech (Bersaglieri et al., 2004), pozdější studie situuje její vznik do oblasti mezi Balkánem a střední Evropou v období před 7 500 lety (Itan et al., 2009). Rozšíření mutace ve střední Asii se datuje do doby před 6 000 – 12 000 lety (Heyer et al., 2011). Výsledky z práce Bersaglieri et al. (2004) ukazují, že chromosomy nesoucí alelu -13910\*T mají kolem ní dlouhý haplotyp a proto nelze vyloučit, že LP mohou způsobovat i varianty, které jsou umístěny někde v této oblasti.

### **3.5.3.2. -13915\*G**

Varianta -13915\*G (rs41380347) zodpovídá za LP u populací Saúdské Arábie, Jemenu a Ománu (Al-Abri et al., 2012; Ingram et al., 2009) a byla též pozorována u arabsky mluvících skupin na území Afriky (Priehodová et al., 2014). U afrických Arabů se frekvence LP dělí do dvou skupin. Zatímco nomádské skupiny (Rašajdové a Baggarové)

mají frekvenci vysokou, polokočovní Šuwa z Nigérie a usedlí Arabové ze Súdánu a Egypta, mají frekvenci nízkou. Tyto výsledky korelují s jejich životním stylem a naznačují, že tato alela má původ v Arábii, odkud ji do Afriky rozšířili beduíni v 7 století n. l. (Priehodová et al., 2014). Dle výzkumu Ranciaro et al. (2014) se tento polymorfismus vyskytuje u afroasijských Bedžů ve frekvenci 12%, populací z Keni (9%), arabských Baggarů ze severního Kamerunu.

Počátky této mutace jsou odhadnuty do období před 4 000 lety a souvisejí patrně s domestikací velbloudů a konzumací velbloudího mléka (Enattah et al., 2008).

### **3.5.3.3. -13913\*C**

O mutaci -13913\*C (rs41456145) se toho doposud ví jen málo. Ačkoliv je tato mutace spojována s LP, nebyla prozatím zkoumána na fenotypové úrovni, a proto její spojení s LP nelze potvrdit, ovšem ani vyvrátit.

Alela byla např. nalezena v Etiopii, kde se její frekvence pohybovala okolo 7,5% (Jones et al., 2013). V malé míře byla nalezena i u Fulbů z Kamerunu, Somálců z Etiopie, Jaaliů ze Súdánu a Beduínů ze Saúdské Arábie (Ingram et al., 2007).

### **3.5.3.4. -22018\*A**

Mutace -22018\*A (rs182549) se nachází v lokusu 22 018 bp od 5' konce v genu pro LPH a jako jediná se nachází v 9. intronu genu *MCM6* (Kuokkanen et al., 2003). Výskyt této mutace byl prokázán v Evropě, severní Číně (Xu et al., 2010) a Africe. V Africe byla tato mutace nalezena u populací z Tanzanie (Tishkoff et al., 2007). Varianta byla prokázána i u některých Japonců a Brazilců (Mattar et al., 2010). Studie Ranciaro et al. (2014) však tuto mutaci v Číně nepotvrdila.

Mutace se vyskytuje v silné vazebné nerovnováze s mutací -13910\*T. Vazebná nerovnováha znamená, že se určitá kombinace alel na obou lokusech nachází v populaci častěji, než by tomu bylo, kdyby byly alely kombinovány náhodně. Prozatím jednou zjištěnou výjimkou je populace Hazárů z Pákistánu (Ranciaro et al., 2014).

### 3.5.3.5. -13907\*G

Mutace -13907\*G (rs41525747) se nachází ve 13 intronu genu *MCM6*. Tato alela se vyskytuje převážně u afroasijsky mluvících skupin, jedná se tedy populace ze severního Súdánu, severní Keni a Etiopie (Ranciaro et al., 2014). U afroasijských Bedžů je četnost 21% a v Keni se vyskytuje pouze s 5% četností (Tishkoff et al., 2007). Její absence je zaznamenána v Izraeli, Jordánsku, Súdské Arábii a Kamerunu (Ingram et al., 2007).

### 3.5.3.6. -14010\*C

Mutace -14010\*C (rs145946881) známa jako „východoafrická“ varianta (Breton et al., 2014) se nachází ve 13 intronu genu *MCM6* a poprvé byla nalezena ve studii Enattah et al. (2008). Tato alela se vyskytuje v jižním Súdánu (Ranciaro et al., 2014). Častá je u nilosaharských populací (Schlebusch et al., 2012) z Tanzanie (39%) a Keni (32%) a afroasijských populací z Tanzanie (46%), méně často se vyskytuje u Sandawů (13%), afroasijských populací z Keni (18%) (Tishkoff et al., 2007) a Masajů (58%) (Wang et al. 2012). Na druhou stranu absence byla pozorována u nilosaharských Sudánců a Hadzů (Tishkoff et al., 2007) stejně tak jako u Afričanů mluvících bantuskými jazyky (Breton et al. 2014; Schlebusch et al., 2012). Později byla nalezena i u Khoisanů, obývajících jih Afriky (Torniainen et al., 2009). Její vyšší frekvence v jižní Africe, např. u Xhosů (Torniainen et al. 2009) může potvrzovat spojení mezi populacemi z jižní a východní Afriky prostřednictvím bantuské migrace (Schlebusch et al. 2012).

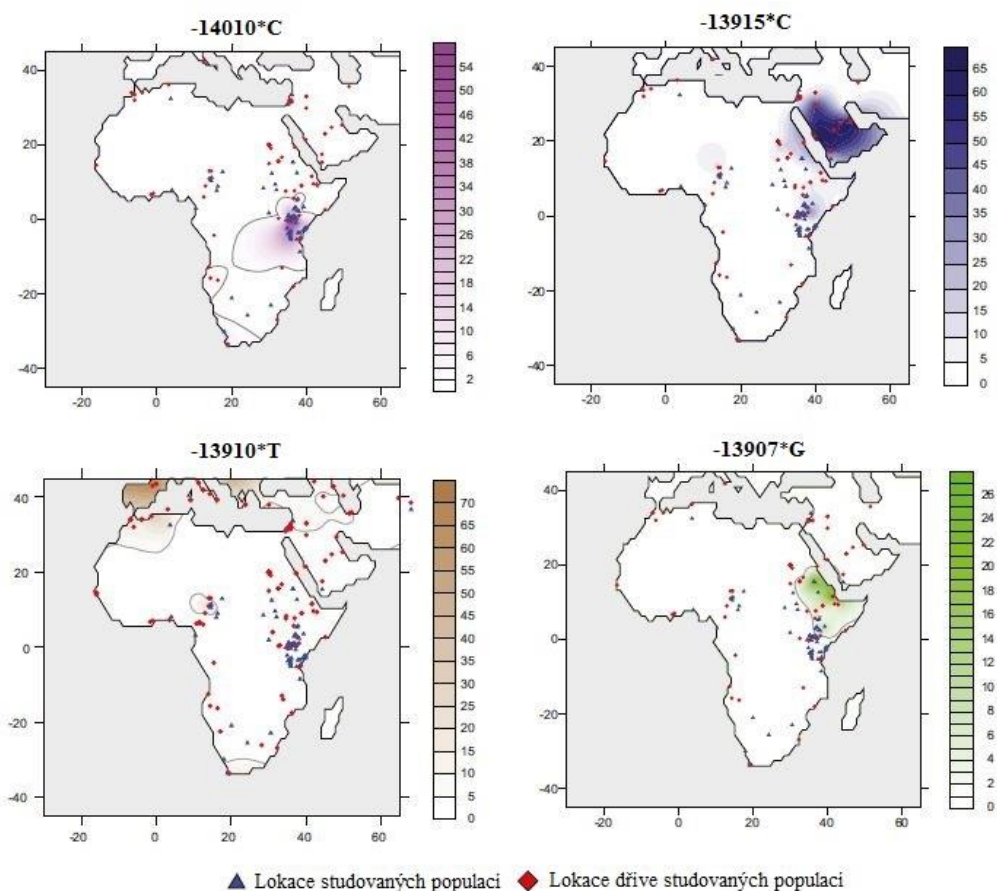
Tato mutace se v Africe objevila přibližně před 3 000 – 7 000 lety a její vysoká frekvence naznačuje, že je pod silnou pozitivní selekcí (Schlebusch et al., 2012; Tishkoff et al., 2007). Že na mutaci působí pozitivní selekce, dokazuje i fakt, že v jejím okolí jsou ostatní polymorfismy ve vazebné nerovnováze (Ranciaro et al., 2014).

### 3.5.3.7. -14009\*G

Jones et al. (2013) ve své studii potvrdil pomocí testů *In vitro*, že mutace -14099\* G (ss820486563) zvyšuje expresi *LCT* promotoru a tím je tedy významně spojena s LP.

### 3.5.4. Rozšíření LP mutací v Africe

Distribuce LP mutací v Africe je oproti Evropě velmi různorodá a je spojena s několika variantami. A spíše než s prostředím je vázána na určitou subsistenční strategii, a sice pastevectví. Celá řada studií ukázala, že pastevci mají vyšší frekvenci LP oproti jejich sousedům, kteří se pastevectvím nezabývají (Mulcare et al., 2004). Hlavní mutace vyskytující se v Africe jsou -14010\*C, -13910\*T (Enattah et al., 2008; Tishkoff et al., 2007; Ranciaro et al., 2014), -13915\*G (Imtiaz et al., 2007; Ingram et al., 2007), -13907\*G (Ingram et al., 2007; Tishkoff et al., 2007). Nově byla roku 2013 v Etiopii detekována varianta -14009\*G (Jones et al., 2013).



**Obr. 8. Distribuce mutací v Africe** (obrázek znázorňuje distribuci 4 různých mutací způsobující LP v Africe: -14010\*C, -13915\*G, -13910\*T a -13907\*G)

(Převzato z Ranciaro et al., 2014)

Pro severní (ale díky Fulbům také západní) Afriku je typická mutace -13910\*T. V menší míře se zde vyskytuje i -14010\*C, která je však více zastoupena v Africe východní

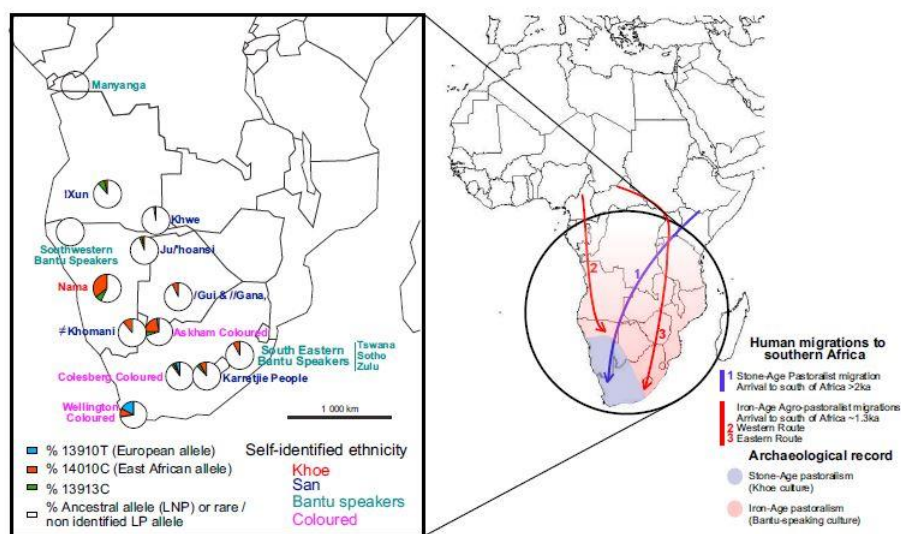
(Tishkoff et al., 2007; Enattah et al., 2002; Jensen et al., 2011; Lewinsky et al., 2005), kde se též vyskytuje mutace -13915\*G a -13907\*G. Později byla varianta -14010\*C nalezena i na jihu Afriky. Vysoká frekvence alely -14910\*C v jižní Africe může potvrzovat propojení mezi populacemi z jižní a východní Afriky.

Během zkoumání populací z Etiopie byla objevena i nová mutace -13913\*C (Jones et al., 2013). Avšak vzhledem k její malé celosvětové četnosti zde doposud nebyly prováděny testy na fenotypové úrovni a proto se její výskyt s laktázovou perzistencí nemůže zcela potvrdit.

### **3.5.5. Migrace afrických pastevců**

Na základě haplotypového pozadí spojeného s LP můžeme získávat zajímavé poznatky ohledně migrací u afrických pastevců. Např. haplotypová analýza ukazuje, že polymorfismus -14010\*C, který byl dříve výhradně spojen s pastevcí pocházejícími z východní Afriky (Keňa, Tanzánie), se dnes nachází i v jižní Africe (Sajantila, 2014). Rovněž přítomnost alely středovýchodního původu -13915\*G u populací v sahelu naznačuje, že mezi těmito regiony docházelo k migraci (Priehodová et al., 2014). Důležité je zmínit, že tyto výsledky podporují i známé historické interakce mezi těmito regiony.

Breton et al., (2014) zkoumal 267 jedinců ze 13 populací jižní Afriky zahrnující potomky lovců-sběračů, pastevců a zemědělců. Tzv. „východoafrickou“ mutaci -14010\*C našel u striktně pastevecké populace Khoisanů Nama z Namibie ve frekvenci 20%. Tyto výsledky naznačují spojení s východní Afrikou. „Evropská“ mutace -13910\*T byla naopak nalezena u populací se smíšeným původem. Tato mutace byla do jižní Afriky pravděpodobně zavedena evropskými kolonisty, zatímco data ohledně varianty -14010\*C podporují model migrace východoafrických pasteveckých skupin na jih Afriky, kde se následně začali sbližovat s tamními lovci- sběrači (Breton et al., 2014).



**Obr. 9.** Genotypová frekvence ukazující tři hlavní varianty LP a migrace spojená s rozšiřováním pastevečtví v jižní Africe

(Převzato z Breton et al., 2014)

### 3.5.5.1. Pozitivní selekce LP

Pozitivní selekce výhodné alely je velmi účinným mechanismem jak její frekvenci zvýšit. Vyskytuje se v případech, kdy mutace poskytuje dostatečně velký přínos pro jejího nositele (zvyšuje jeho reprodukční zdatnost) a může vést až k její fixaci. Pozitivní selekcí se frekvence dané mutace zvyšuje (Flégr, 2009; Smith et Haigh, 1974), ale genetická variabilita jejího okolí se naopak snižuje. Uplatňuje se zde tzv. selekční vymetení „*selective sweep*“. V případě LP se pozitivní selekce týká schopnosti zachování trávení mléčného cukru během celého života s výhodami, které jsem uvedla výše. Tato pozitivní selekce v podobě genově-kulturní koevoluce začala pozvolna probíhat po konzumaci mléka již od neolitu. (Beja-Pereira et al., 2003).

Gen *LCT* se velmi často navrhuje jako gen, který nedávno prošel pozitivní selekcí (Scrimshaw et Murray, 1988). Data svědčící ve prospěch pozitivní selekce jsou poměrně silné. Bersaglieri et al. (2004) prokázala pozitivní selekci na základě tří analytických metod. Tato selekce nastala po oddělení evropských populací od asijských a afrických populací po kolonizaci Evropy. Vysoká frekvence a mladý věk těchto haplotypů, vysoký odhadnutý koeficient selekce, velmi vysoké hodnoty REHH („*Relative Extended Haplotype Homozygosity*“), to vše naznačuje, že LTC představuje jeden z nejsilnějších signálů nedávné pozitivní selekce doposud dokumentované v lidském genomu. Výsledky

podporují hypotézu, že dodatečná výživa v podobě mléka zvyšovala zdatnost jedinců s LP, v nedávné historii Evropy a pravděpodobně nejen v tam (Bersaglieri et al., 2004).

Pozitivní selekce LP byla také potvrzena studií Coelho et al. (2005), která se zabývala analýzou okolních mikrosatelitů mutací -13910\*T a -22018\*A u Italů, Portugalců, Fulbů a populací z Guinejského zálivu a Mozambiku. Cílem této studie bylo zjištění, zda tyto mutace vznikly v Evropě a v Africe nezávisle. Pro výzkum byl použit test neutrality. Výsledným zjištěním jejich studie bylo nalezení odchylky od neutrality u varianty -13910\*T mezi evropskými a africkými populacemi, což vedlo k závěru, že mutace pravděpodobně vznikly u evropských a afrických populací nezávisle na sobě.

Podobnou problematikou se zabývala i Tishkoff et al., (2007), která prováděla výzkum u populací z Tanzanie, Keni a Súdánu, zaměřený na mutace -14010\*C, -13915G\* a -13907\*C u kterých bylo in vitro testy zjištěno, že zvyšují transkripci LCT promotoru. Všechny z těchto tří mutací mají odlišně haplotypové pozadí než má mutace -13910\*T. Zjištěná data naznačují, že se jednalo o konvergentní evoluci způsobenou silným selektivním tlakem.

Pozitivní selekci můžeme potvrdit i na základě výzkumu, který prováděl např. Plantinga et al., (2012). Ve své studii analyzoval celkem 46 vzorků aDNA získaných z kosterních pozůstatků (zubů), pocházejících ze dvou hrobů ležících v severní části Pyrenejského poloostrova a datovaných do doby před 5 000 – 4 500 lety. Z celkového množství 46 vzorků byla LP detekována u 26 jedinců. Průměrná alelická frekvence byla u těchto populací z období neolitu přibližně 27%, což je mnohem menší frekvence než je detekována u moderní baskické populace (66%). Tyto výsledky jsou tak v souladu s konceptem, že během období neolitu a eneolitu začala působit pozitivní selekce, způsobená domestikací a následnou konzumací mléka a mléčných výrobků, která vedla ke zvýšení LP u evropských populací.

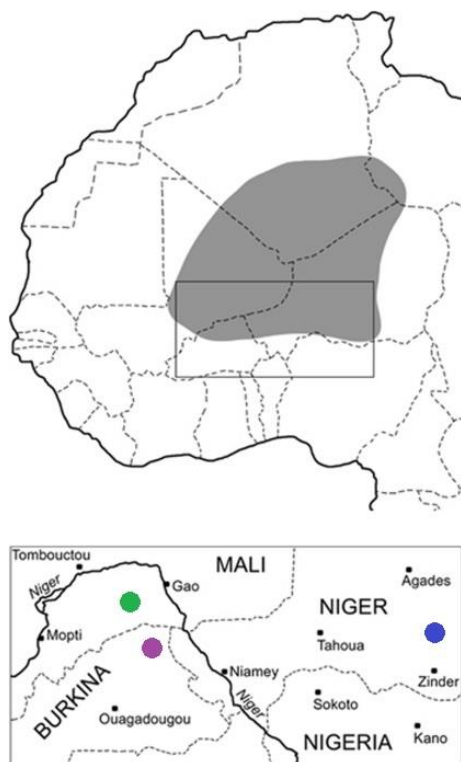
### **3.5.5.2. LP u Tuaregů**

Jak jsem výše zmiňovala, jedinou studii spojenou s LP u Tuaregů prováděl před 30 lety Flatz et al. (1986). Autoři zkoumali absorpci a malabsorpci laktózy u dospělých Tuaregů pocházejících ze skupiny Ullemeden z centrální Sahary (Nigeru). Pro své výzkumy použili fenotypový test na toleranci laktózy založený na určování vodíku ve vydechovaném

vzduchu. Z celkového počtu 118 jedinců, byla LP potvrzena u 103 jedinců (87,3%), zbylých 15 jedinců (12,7%) laktózu netrávilo. Takto nízký počet jedinců bez LP naznačuje, že i v případě Tuaregů by mohlo jít o hypotézu o pozitivní selekci genu pro LP. Získané výsledky ovšem nebyly zkoumány na molekulární úrovni.

## 4. MATERIÁL

Pro výzkum k této diplomové práci bylo použito 93 vzorků DNA Tuaregů. Vzorky byly získány mým školitelem ze tří různých lokalit při expedicích do Afriky konaných v letech 2004 – 2006. V roce 2004 proběhla expedice do Burkiny Faso konkrétně do oblasti Gorom- Gorom (Tgor) odkud pochází 36 vzorků tamních Tuaregů. O rok později probíhal sběr DNA v okolí města Tanut (Ttan) v Nigeru, odkud pochází 31 vzorků a posledních 26 vzorků bylo zajištěno okolo města Gossi (Tgos) v Mali z roku 2006. Zeměpisná poloha jednotlivých lokalit je znázorněna na obrázku č. 10.



**Obr. 10.** Výřez Afriky s označením oblastí obývaných Tuaregy a zahrnující výřez území vzorkovaných skupin z Nigeru (Ttan), Burkiny Faso (Tgor) a Mali (Tgos)  
(Převzato z Pereira et al., 2010)

DNA byla získána v podobě bukálních stěrů, které byly uloženy do lyžačního roztoku a převezeny do Prahy. Laboratorní práci jsem prováděla pod záštitou Archeologického ústavu AVČR, Praha, v. v. i. v laboratoři archeogenetiky pod dohledem Mgr. Edity Priehodové.

## 5. METODY

Pro získání výsledků k mé diplomové práci jsem použila následující laboratorních techniky a metody: izolace DNA, měření koncentrace izolované DNA, PCR amplifikace 359 pb úseku genu *MCM6*, gelová elektroforéza, sekvenace DNA a vysokorozlišovací analýza křivek tání (High Resolution Melting) pomocí RealTime PCR. Pro analýzu dat jsem následně použila tyto programy: SynGene, Bioedit, Chromas, GenAIEx, Phase a NETWORK.

### 5.1. Izolace DNA

Z bukálních stěrů bylo nejprve potřeba provést izolaci DNA. Izolaci jsem prováděla přes kolonky QIAquick PCR Purification Kit od firmy QIAGEN též za účelem vzorky přečistit a zbavit je tak příměsí, které by mohly negativně ovlivnit následující analýzy. Tento kit pracuje na principu izolace DNA přes membránu tvořenou silikagelem. Průchodem přes kolonku se zároveň snadno odstraní i nežádoucí nečistoty. Přesný postup izolace DNA uvádím v příloze 1.

DNA u 62 vzorků byla v laboratoři již izolována pro účely analýzy uniparentálních polymorfismů (Pereira et al., 2010). U 31 vzorků jsem izolaci prováděla sama. Přehled mnou izolovaných vzorků je uveden v příloze 3.

### 5.2. Měření koncentrace izolované DNA

Výtěžky DNA z bukálních stěrů jsou obecně menší než kupř. z kitů Oragene, v mém případě byly nižší i z důvodu stáří materiálu. Pro zjištění koncentrace DNA u vzorků jsem použila přístroj ACTGene UVS-99 a pro měření jsem použila 1  $\mu$ l vzorku. Průměrná koncentrace DNA ve vzorcích byla přibližně 10 ng/ $\mu$ l, což se ukázalo být pro účely mé studie postačující.

### 5.3. PCR amplifikace úseku genu *MCM6*

PCR, neboli polymerázová řetězová reakce z angl. *Polymerase Chain Reaction* je metoda, umožňující namnožit vybraný úsek DNA (Šťastná 2008). Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin. Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'  $\rightarrow$  3' prostřednictvím

DNA- polymerázy. Syntetizovaný úsek je vymezen připojením dvou primerů (tzv. *forward* a *reverse primer*), které se váží na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, např. Taq DNA - polymeráza z *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje (Šmarda et al., 2005). Základní tři kroky PCR jsou denaturace, hybridizace a elongace. Při denaturaci se DNA zahřívá na teplotu kolem 95°C, během hybridizace (45-65°C) se k vzniklým jednovláknovým molekulám DNA napojují primery a při elongaci dochází při 65-75°C k syntéze komplementárních vláken DNA.

V mé diplomové práci jsem amplifikovala úsek dlouhý 359 bp umístěný v intronu 13 genu *MCM6*. Na amplifikaci byly použity primery, jejichž sekvence DNA byly převzaty ze studie Coelho et al., (2009) (forward 5'-GCAGGGCTCAAAGAACAATC-3' a reverse 5'-TGTTGCATGTTTTTAATCTTTGG-3'), dále GoTaq® Green Master Mix, který je složen z Taq polymerázy, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> a modrého a žlutého barviva a v neposlední řadě voda a DNA. Elongace probíhala při teplotě 54,5°C.

Teplotní režim PCR:

1x 94°C (5 minut)

35x 94°C (1 minuta) → 54,5°C (1 minuta) → 72°C (1 minuta)

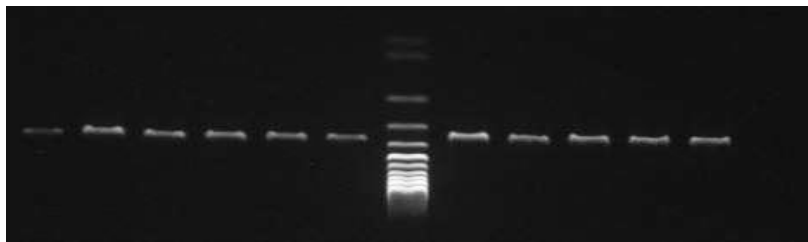
1x 72°C (20 minut)

#### **5.4. Gelová elektroforéza**

Principem gelové elektroforézy je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě. Pomocí této metody lze separovat molekuly DNA na základě rozdílných rychlostí pohybu různě dlouhých úseků. Provádí se v nosiči, kterým je v tomto případě gel tvořený agarózou. Jde vlastně o síť polymerních molekul s póry, jimiž se molekuly DNA pohybují různou rychlostí v závislosti na velikosti, menší fragmenty se pohybují rychleji než delší, tudíž za daný čas doputují dále (Bártová, 2011).

V případě mé diplomové práce byla gelová elektroforéza využita za účelem ověření namnožení zkoumaného úseku DNA a vyhodnocení negativní kontroly. Použit byl agarózový gel o koncentraci 1,5%, připravený z 0,6 gramů agarózy, 12 ml TBE (Tris-

borát-EDTA) a doplněn vodou do objemu 60 ml. Do ještě neztuhlého gelu byly přidány 3  $\mu$ l barviva GelRed, které slouží k následné vizualizaci DNA pod UV světlem. Do připraveného gelu jsem nanášela 1  $\mu$ l vzorků a pro ověření velikosti molekul 10  $\mu$ l žebříčku MassRuler LR™. Přesný postup přípravy agarózového gelu uvádím v příloze č. 2. Samotný běh reakce trval 45 minut. K následnému vyhodnocení gelové elektroforézy jsem dále použila transluminátor, kameru a softwar SynGene.



**Obr. 11.** Výsledek gelové elektroforézy z 10. 4. 2014

Jako příklad gelové elektroforézy zde uvádím obrázek č. 11, kde je zobrazeno 11 vzorků Tuaregů z oblasti Tanut (Ttan121, 122, 128, 129, 140, 142, 143, 144, 147, 148, 149) dále marker, který se nachází na 7 pozici zleva a negativní kontrola na poslední 13 pozici.

## 5.5. Sekvenace

Sekvenace DNA slouží ke stanovení pořadí (sekvence) nukleotidů v molekule DNA. Nejpoužívanější metodou je Sangerova metoda (též označována jako dideoxy metoda), která využívá modifikovanou tzv. asymetrickou PCR k syntéze kopií DNA. Tato modifikovaná PCR využívá na rozdíl od „klasické“ PCR pouze jeden primer. Amplifikace PCR produktu tedy probíhá pouze na jednom řetězci DNA, na který se tento primer specificky váže a kopie molekul DNA nepřibývají exponenciální řadou (Bártová, 2011). K jednořetězcové DNA přisedá 15-25 bp dlouhý radioaktivně značený primer, který je komplementární k začátku sekvenovaného místa. Následně od navázaného primenu začne probíhat syntéza DNA za přítomnosti čtyř dNTP a jednoho z dideoxynukleotidů. Po jejich začlenění dochází k zastavení syntézy z důvodu nepřítomnosti OH skupiny. Polymerace se ukončuje tam, kde se vyskytuje daný NT.

Sekvenace vzorků byla prováděna na zakázku ve firmě Macrogen. Naamplifikované úseky DNA jsem naředila na koncentraci 30 ng/μl a zadala sekvenování pomocí forward primeru. Výsledky sekvenace jsem obdržela v elektronické podobě ve formě chromatogramů.

## 5.6. Vysokorozlišovací analýza křivek tání

Vysokorozlišovací analýza křivek tání (*High Resolution Melting*, HRM) je vysoce citlivá a rychlá metoda, kterou lze využívat k detekci jedno- i vícenukleotidových záměn v DNA v heterozygotním i homozygotním stavu. Průběh qPCR je obdobný jako u konvenční PCR. Základem je cyklicky se opakující denaturace templátu, hybridizace primerů a syntéza nových řetězců cílového úseku DNA. Z důvodu monitorování produktu již během reakce obsahuje qPCR směs, kromě komponent pro konvenční PCR, navíc fluorescenční molekuly. Fluorescence je měřena v každém cyklu, přičemž intenzita fluorescenčního záření je přímo úměrná koncentraci produktu přítomného v reakční směsi. Měření fluorescenčního signálu odlišuje qPCR od konvenční PCR, kde je produkt detekován elektroforeticky až po ukončení reakce. Jak již bylo řečeno, průběh reakce je tedy kontinuálně zachycen optikou, která je schopna zaznamenat fluorescenční záření užitě fluorescenční barvy a tím, jak se ve dvoušroubovici DNA rozvolňují vazby mezi řetězci, dochází k uvolňování interkalačního činidla, což se projevuje následným poklesem snímané fluorescence.

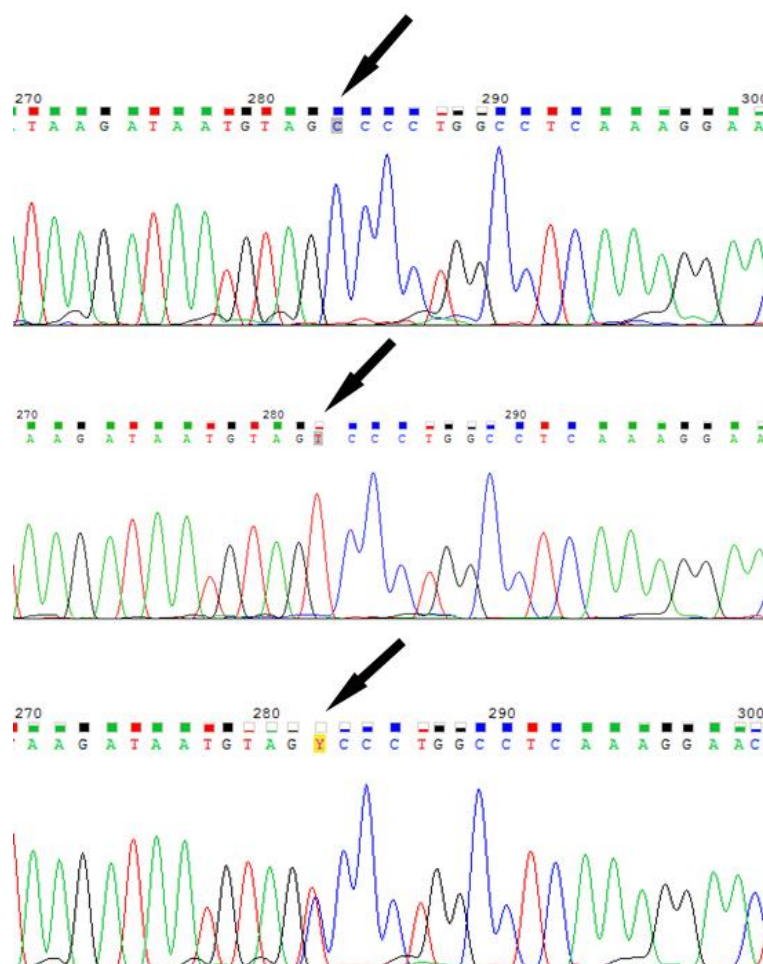
Vysokého rozlišení je dosahováno použitím tzv. DNA saturujících barviv pomocí přístrojů s vysoce přesnou a stabilní kontrolou časového teplotního gradientu. Během postupného zahřívání dochází k rozpadu dvoušroubovice DNA, čímž se z ní barvivo uvolňuje a dochází k poklesu fluorescence. Přítomnost heteroduplexu v analyzovaném amplikonu DNA mění tvar křivky tání, který je charakteristický pro konkrétní záměnu na konkrétní pozici daného amplikonu a při použití (neznačených) sond umožňuje dokonce zachycení homozygotní varianty mutace.

U této analýzy jsem kvůli časové a finanční náročnosti použila pouze polovinu ze všech sekvenovaných vzorků. Vzorky jsem vybrala dle následujících kritérií: nejprve jsem celý soubor 93 vzorků rozdělila na vzorky mutované (57) a nemutované (36). Každou z obou skupin jsem následně rozdělila dle populací na tři jednotlivé skupiny Tgos, Tgor a Ttan, kde byla vybrána vždy polovina vzorků s největší koncentrací DNA.

Metoda byla prováděna za pomoci Real-Time PCR na přístroji LightCycler®96System (Roche). SNP, která byla v této analýze zkoumána, uvedu v kapitole 5.7.4. Okolí SNP polymorfismů.

## 5.7. Vyhodnocení dat

Chromatogramy sekvencí 359 bp úseku v intronu 13 genu *MCM6* jsem vyhodnocovala v programu Chromas LITE 2.1.1 a seřadila v programu BioEdit Sequence Alignment Editor. Po úpravě jsem je porovnávala s referenční sekvencí a zjistila, zda daný vzorek mutaci obsahuje či nikoli.



**Obr. 12.** Ukázky z programu Chromas LITE 2.1.1. s vyznačenými polymorfismy na pozici 282 (První obrázek s nemutovanou alelou C, druhý obrázek s mutovanou alelou T a třetí obrázek s alelou v heterozygotním stavu Y)

### **5.7.1. Intrapopulační analýza**

Intrapopulační analýzu jsem prováděla pro všechny tři skupiny Tuaregů odděleně (tabulka č. 2) v programu GenAIEx (Peakall et Smouse, 2012). Za pomoci chí- kvadrát testu (statistická metoda, která ověřuje, zda se zkoumané znaky pohybují v určitém rozdělení pravděpodobnosti) jsem testovala Hardy-Weinbergovu rovnováhu, heterozygotitu a fixační index.

### **5.7.2. Okolí SNP polymorfismů**

Pro detekci okolních SNP jsem použila metodu vysokorozlišovací analýzy křivek tání. Tato metoda byla z časové a finanční náročnosti použita pouze u poloviny vzorků, tedy u 47 vzorků. Vzorky byly vybírány tak, aby ve zkoumaném souboru byly vzorky s LP mutací i bez mutace zastoupeny rovnoměrně. Vzorky uvnitř jednotlivých populačních skupin byly vybírány dle množství DNA v jednotlivých vzorcích.

U těchto 47 vzorků jsem celkem analyzovala 6 SNP, které uvádím v tab. 2. SNP jsem převzala z práce Heyer et al., (2011). Jednalo se tedy celkem o 282 analýz. Z důvodu nepřesného určení nukleotidu softwarem v LightCycler® 96 System jsem ovšem některé reakce musela opakovat. Ze souboru jsem následně vyřadila dva vzorky kvůli nejednoznačnému zařazení. Tyto chyby by mohly být způsobeny nízkou koncentrací DNA ve vzorcích. Získané genotypy jsem analyzovala v programu Phase, který odhadl zastoupení haplotypů. Tento program implementuje Bayesovu statistiku pro rekonstrukci haplotypů z genotypových dat. Algoritmus začíná dělením dat do segmentů. Poté se vypočítá seznam možných haplotypů v rámci každého segmentu. Program poskytne nejpravděpodobnější haplotyp pro každého jedince (Stephens et al. 2004).

Data, která byla programem spočítána, byla vytvořena dohromady pro všechny tři geografické skupiny Tuaregů.

**Tabulka č. 2. Analyzovaná SNP** (První sloupec označuje zpracovaná SNP, druhý rs-pozice a třetí udává počet kb před genem *LCT*).

SNP1	rs2011946	209 kb
SNP2	rs309137	157 kb
SNP3	rs309142	106 kb
SNP5	rs1057031	25 kb
SNP7	rs313528	163 kb
SNP8	rs12619365	211 kb

(Z práce Heyer et al., 2011 jsem pro účely své studie použila 6 SNP z původně zpracovaných 9 SNP).

### 5.7.3. Haplotypové sítě

Haplotypové sítě znázorňují evoluční vzdálenosti mezi haplotypy a v případě uniparentálních haploskupin umožňují určit i jejich přibližné stáří. Z haplotypů rekonstruovaných prostřednictvím programu Phase jsem vytvořila vstupní soubor, pomocí něhož jsem sestavila fylogenetickou síť v programu NETWORK 4.6.1.3. za použití algoritmu „Median Joining“ (Bandelt et al., 1999). Pro lepší znázornění sítě jsem upravila váhu u několika pravděpodobně rekurentních mutací, viz tabulka č. 3 (přednastavená váha programu pro všechny mutace je 10). Ze souboru sedmi polymorfismů (-13910 C/T + šesti okolních SNP) jsem váhu upravila u tří z nich.

**Tabulka č. 3. SNP a jejich váhy v programu NETWORK 4.6.1.3.**

Mutace	SNP8	SNP7	13910	SNP5	SNP3	SNP2	SNP1
Váha	10	5	10	10	7	1	10

### 5.7.4. Populační růst mutace -13910\*T

Datování počátku demografického růstu holotypů s mutací -13910\*T bylo provedeno v pařížské *Laboratoire d'Eco-anthropologie et Ethnobiologie, Muséum national d'Histoire naturelle* Dr. Frédéricem Austerlitzem dle jeho vlastní metody (Austerlitz et al., 2003).

Metoda nebyla zpracována mnou z důvodu nevlastnění programu, který je pro tuto analýzu potřebný.

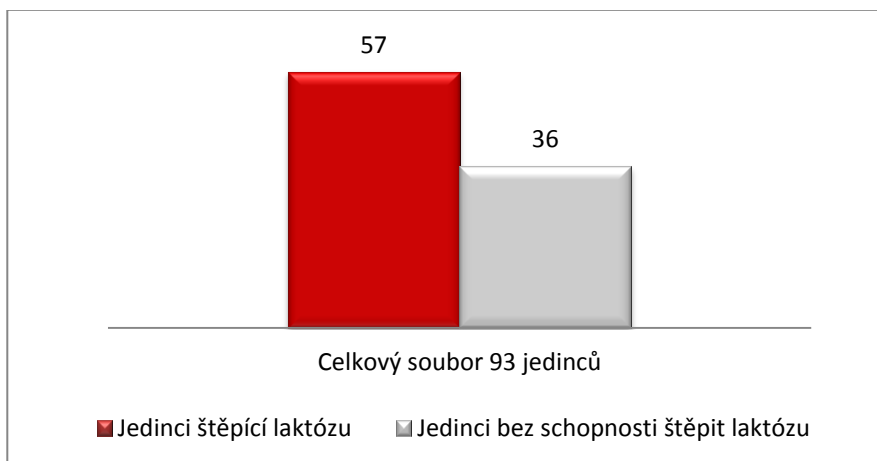
Pro samotnou analýzu jsem však musela připravit soubor, který obsahoval následující informace: název populace, její dnešní nominální velikost, zjištěná frekvence mutace (v případě mého výzkumu -13910\*T), počet nejfrekventovanějšího haplotypu s touto mutací a počet všech haplotypů s touto mutací.

Generační doba pro populaci o velikosti 1 300 000 jedinců byla stanovena na 25 let.

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. Četnost LP

Z celkového souboru 93 vzorků tuarežských pastevců jsem mutaci zodpovědnou za vznik LP detekovala u 57 z nich (obrázek 13). LP jsem tedy detekovala u 61,3% tuarežských pastevců

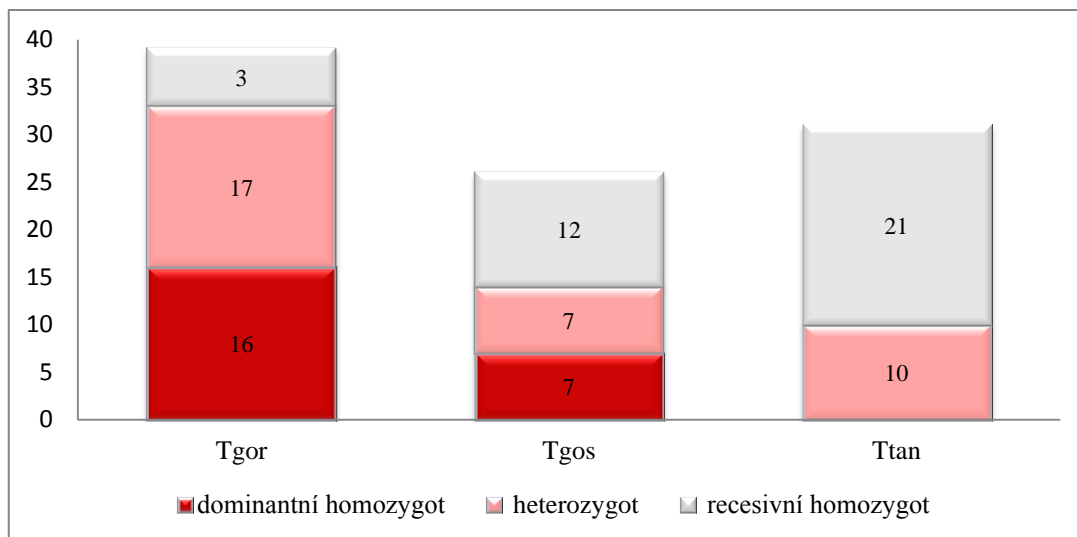


**Obr. 13. Četnost jedinců štěpících laktózu** (na obrázku je patrný početní rozdíl mezi jedinci štěpící laktózu a jedinci s laktózovou intolerancí)

První skupina Tgor, žijící na území Burkina Faso poblíž Gorom- Gorom, je zastoupena 36 vzorky, z nichž 33 obsahovalo LP mutaci (17 heterozygotů a 16 homozygotů); v této populaci jsem tedy identifikovala 91,7% jedinců schopných štěpit laktózu i v dospělosti. Druhá skupina Tgos, žijící na území Mali okolo Gossi, je zastoupena 26 vzorky, z nichž jsem LP prokázala u 14 jedinců (7 heterozygotů a 7 homozygotů), což odpovídá 53,8% jedincům schopných štěpit mléčný cukr i během dospělosti. Poslední skupina Ttan, žijící v Nigeru poblíž města Tanut, je zastoupena 31 vzorky, z nichž jsem LP mutaci objevila u 10 z nich (mutace se ve všech případech vyskytovala pouze ve formě heterozygotů), LP jsem detekovala u 32,3% jedinců. Poměr heterozygotů a homozygotů u jednotlivých populací je znázorněn na obrázku 14.

Jednotlivé skupiny Tuaregů jsem pomocí chí-kvadrát testu otestovala na test homogenity a zjistila jsem, že mezi populacemi jsou ve vztahu LP jedinci/intolerantními

jedinci statisticky signifikantní rozdíly. Očekávaná četnost LP jedinců by se v populacích měla pohybovat kolem 61%.

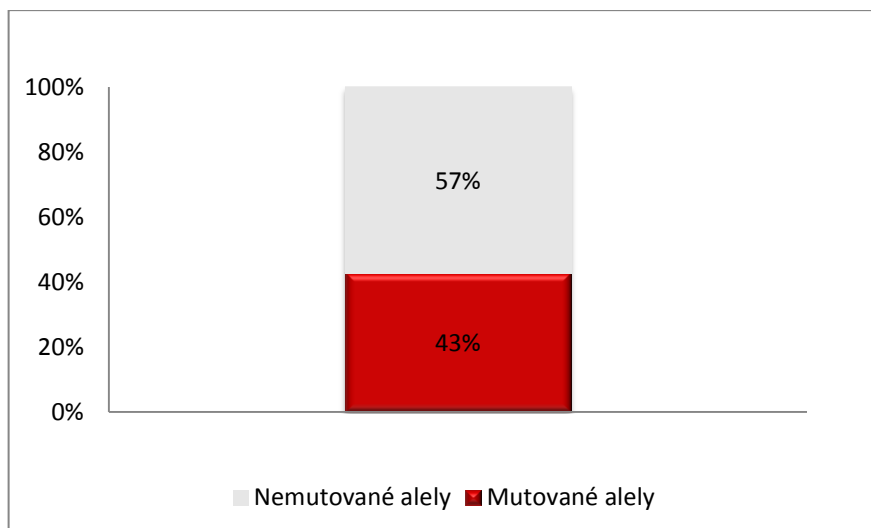


**Obr. 14. Četnost homozygotů a heterozygotů** (graf znázorňuje podíl homozygotů a heterozygotů u jednotlivých skupin Tuaregů. Dominantní homozygot a heterozygot reprezentují jedince s mutací pro LP)

## 6.2. Mutace LP a jejich frekvence

Po amplifikaci úseku dlouhého 359 bp a následné sekvenaci DNA jsem detekovala celkem tři mutace spojené s LP. Jednalo se o mutace -13910\*T a -13915\*G, které jsou úzce spjaty s LP, což bylo doloženo i studiem na fenotypové úrovni a dále pak mutaci -13913\*C, která je poměrně vzácná a její spojení s LP nebylo doposud potvrzeno, byť se předpokládá (Ingram et al., 2007; Ingram et al., 2009).

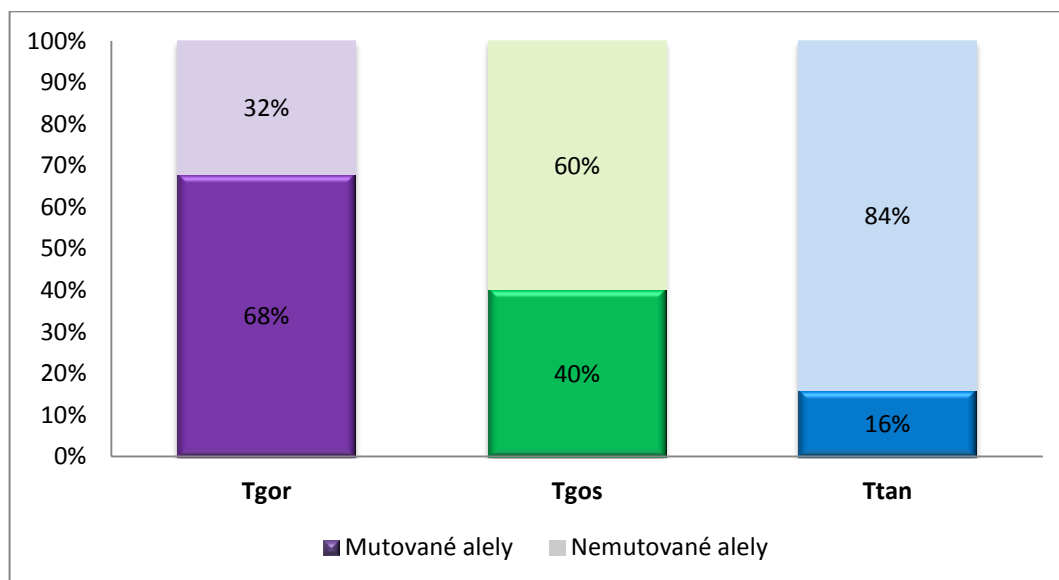
Frekvenci nemutovaných a mutovaných alel jsem nejprve analyzovala u celkového souboru 93 Tuaregů. Jednotlivé skupiny Tuaregů zde nebyly nijak zohledněné, stejně tak ani odlišné mutace způsobující LP.



**Obr. 15.** Graf znázorňující podíl nemutovaných a mutovaných alel (alel způsobující LP)

Na sloupcovém grafu (obrázek 15) je patrná frekvence původních nemutovaných alel, znázorněná šedou barvou, ve frekvenci 57% a tři mutovaných alel barvou červenou ve společné frekvenci 43%.

Následně jsem frekvenci nemutovaných a mutovaných alel počítala pro každou skupinu Tuaregů zvlášť. Tato analýza byla prováděna stále ještě bez ohledu na jednotlivé mutace pro LP (obrázek 16).



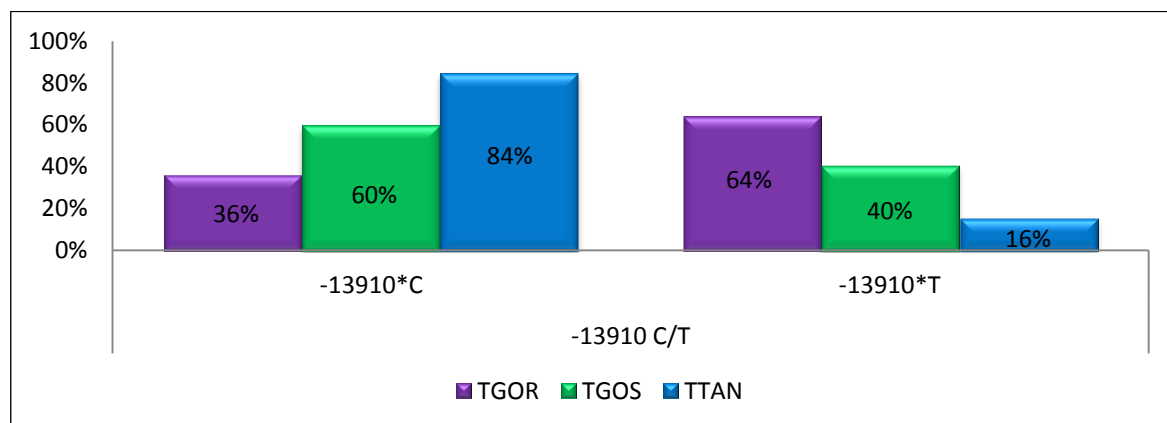
**Obr. 16.** Frekvence mutovaných/nemutovaných alel u jednotlivých populací

Grafy jednotlivých populací Tuaregů znázorňující podíl nemutovaných a mutovaných alel (alel způsobujících LP), se zahrnutím všech tří detekovaných mutací.

Tyto sloupcové grafy jsou oddělené dle jednotlivých skupin Tuaregů. Světlejší barva zde udává vždy frekvenci nemutovaných alel. Fialová barva udává frekvenci mutovaných alel u skupiny Tgor, zelená u skupiny Tgos a modrá u Ttan. Největší a zároveň nadpoloviční frekvenci mutovaných alel jsem našla u skupiny Tgor, kde frekvence dosahovala 68%. Frekvence u skupiny Tgos čítá 40% a nejmenší frekvenci mutovaných alel 16% jsem detekovala u skupiny Ttan.

### 6.2.1. Frekvence jednotlivých mutací

Nejpočetnější mutací v celém souboru je -13910\*T, která se celkem vyskytuje u 54 jedinců. Mutace -13913\*C je zastoupena pouze u dvou jedinců a mutace -13915\*G má zástupce pouze jednoho. Následující graf (obrázek 17) jsem vytvořila pouze pro mutaci -13910\*T (pro zbylé dvě mutace z důvodu nízkých frekvencí grafy neuvádím).



**Obr. 17.** Alelické frekvence polymorfismu -13910 C/T u jednotlivých skupin Tuaregů

Graf znázorňuje frekvenci nemutované alely -13910\*C a mutované alely -13910\*T u tří skupin Tuaregů. Nalevo se nachází alela -13910\*C, na straně pravé -13910\*T. Největší frekvence LP způsobena touto alelou byla zjištěna u skupiny Tgor 64 %, u skupiny Tgos je frekvence 40 % a Ttan má frekvenci pouze 16 %.

Mutace -13913\*C se v celém zkoumaném souboru objevuje pouze ve frekvenci 2,1% (2 heterozygoti) a pouze u jedné ze zkoumaných skupin a to u Tgor.

Poslední ze zjištěných mutací je -13915\*T, která se v celém zkoumaném souboru vyskytuje ve frekvenci 1% (1 heterozygot), byla opět detekována ve skupině Tgor.

### 6.3. Intra-populační analýza

Intra-populační analýzy jsem prováděla pouze u polymorfismu -13910 C/T a výsledky jsem shrnula do tabulky č. 4.

Tabulka č. 4. Intra-populační analýza hodnocených tuarežských populací

Populace	CC	CT	TT	C	T	chí kvadrát	p hodnota	He	Ho	FI
Tgor	6	14	16	0,361	0,639	0,890	0,346	0,461	0,389	0,157
Tgos	12	7	7	0,596	0,404	5,053	0,025	0,482	0,269	0,441
Ttan	21	10	0	0,839	0,161	1,146	0,284	0,271	0,323	-0,192
Celkový soubor	36	34	23	0,586	0,414	9,513	0,002	0,485	0,333	0,313

(Genotypy, alelická frekvence, chí-kvadrát test pro určení Hardy-Weinbergovy rovnováhy, He: očekávaná heterozygotita, Ho: pozorovaná heterozygotita, FI: fixační index)

První údaje v tabulce se týkají počtu homozygotů a heterozygotů a frekvencí jednotlivých alel, kde C je nemutovaná alela a T alela mutovaná, způsobující LP. Dále jsem sledovala vztah mezi frekvencemi genotypů a alel, resp. je-li mezi očekávanými a reálnými frekvencemi rozdíl, tzv. Hardy-Weinbergovu (HW) rovnováhu. Populace Tgor a Ttan jsou v HW rovnováze, v případě populace Tgos tomu tak není. Možnou příčinou odchylky může být malý počet případů zkoumaného souboru. Při zkoumání celkového souboru Tuaregů jsme opět pozorovala odchylku od HW, která může být ovšem způsobena také genetickou strukturou zkoumané populace; této problematice se budu více věnovat v diskuzi. Když se zaměříme na frekvenci jednotlivých alel, jsou zde velké populační rozdíly avšak podíl heterozygotů/homozygotů převládá ve všech populacích ku prospěchu heterozygotů. Nejmenší početní rozdíl mezi heterozygoty/homozygoty je u populace Tgos, jak ostatně ukazuje i odchylka od HW rovnováhy.

## 6.4. Haplotypové pozadí

V souboru populací Tuaregů z Nigeru, Mali a Burkiny Faso jsem pomocí programu Phase rekonstruovala 11 haplotypů. Jednotlivé haplotypy a jejich frekvenci udávám v tabulce č. 5. Tři z těchto jedenácti haplotypů v sobě nesou mutaci pro LP.

Tabulka č. 5. Frekvence haplotypů stanovených podle polymorfismu -13910C/T a 6 SNP variant

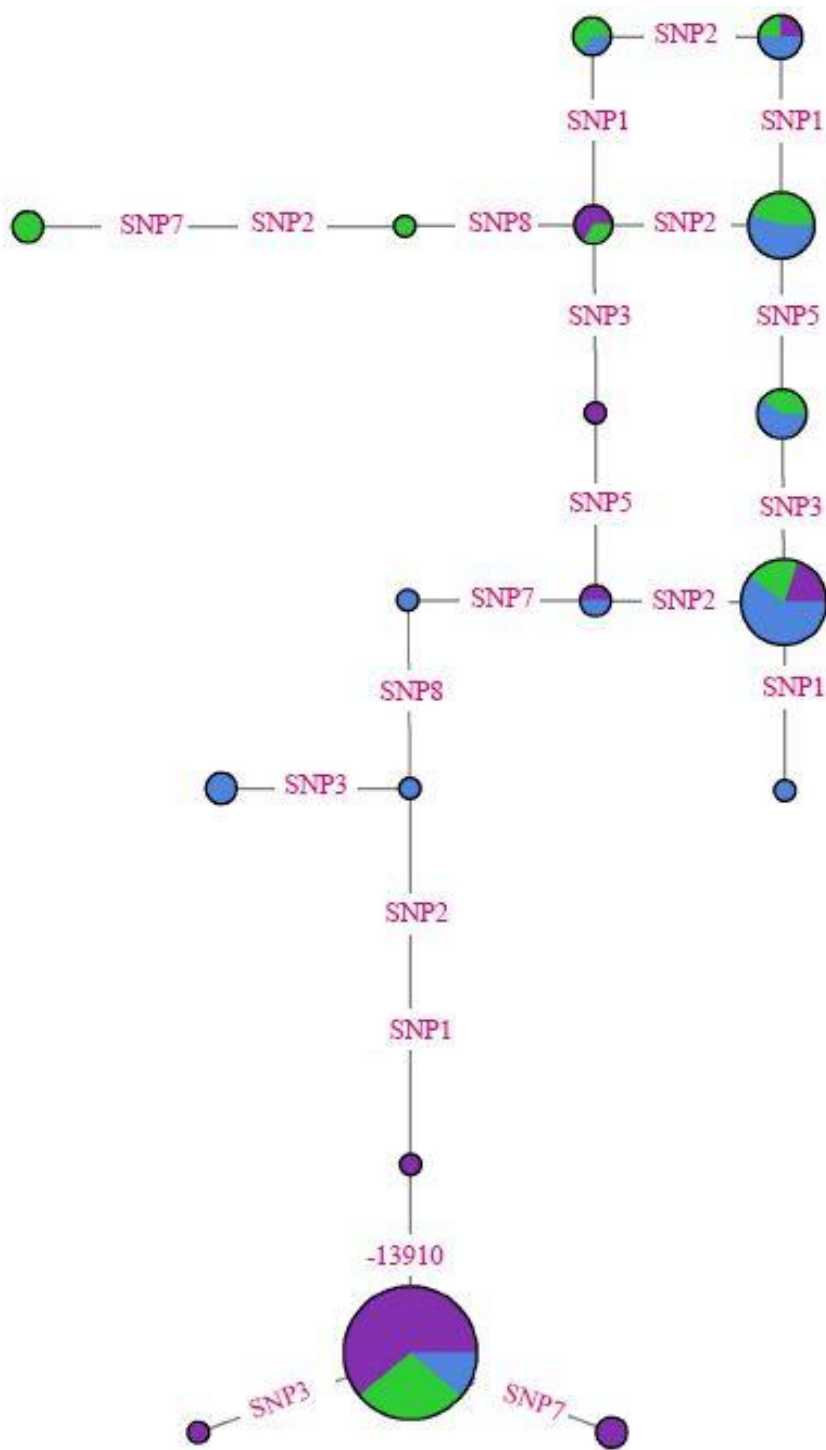
Haplotyp	Frekvence	SNP 8	SNP 7	-13910 C/T	SNP 5	SNP 3	SNP 2	SNP 1
CGTCTCT	0,692307	C	G	T	C	T	C	T
TACTCTG	0,057692	T	A	C	T	C	T	G
TACTCTT	0,057692	T	A	C	T	C	T	T
TACCTTG	0,038463	T	A	C	C	T	T	G
CATCTCT	0,038462	C	A	T	C	T	C	T
CACTCTG	0,019231	C	A	C	T	C	T	G
CGCCTCT	0,019231	C	G	C	C	T	C	T
CGCCTTG	0,019231	C	G	C	C	T	T	G
CGTCCCT	0,019231	C	G	T	C	C	C	T
TGCCTTG	0,019231	T	G	C	C	T	T	G
TACTTTG	0,01923	T	A	C	T	T	T	G

Fialově jsou vyznačené haplotypy nesoucí mutaci -13910\*T

## 6.5. Haplotypové síť

Síť haplotypů je vytvořena z 11 zjištěných haplotypů vyskytujících se u tří populací Tuaregů. Proporční zastoupení je znázorněno následujícími barvami tak jako u předchozích grafů: fialová barva pro Tgor, zelená pro Tgos a modrá pro Ttan.

Haplotypy jsou reprezentovány kruhy, jejichž velikost odpovídá frekvenci daného haplotypu v souboru. Dole vidíme centrální haplotyp (CGTCTCT), který je zastoupen nejvíc (36x) a který obsahuje mutaci -13910\*T. Z něho vycházejí další dva haplotypy, které též nesou mutaci -13910\*T, avšak jejich zastoupení ve zkoumaném souboru je mnohem menší, jak ostatně ukazují kruhy mnohem menší velikosti.



**Obr. 18.** Haplotypová síť znázorňující 6 zkoumaných SNP a polymorfismus -13910 C/T. Poměry haplotypů původem od jednotlivých skupin Tuaregů jsou znázorněny odlišnými barvami (fialová pro Tgor, zelená Tgos a modrá pro Ttan)

## 6.6. Datování demografického růstu -13910\*T

Tabulka č. 6. Datování rozšíření mutace -13910\*T v dané populaci Tuaregů

N	frek	N chr	N hpl	m rek	růst (min; max)	věk g (min; max)	věk r (min; max)
1 300 000	0,433	36	39	0,00129807	1,19 (1.16, 1.25)	70,6 (61,6; 88,0)	1765,7 (1540,6; 2200,4)

(N – nominální velikost, frek – frekvence alely, N chr – počet chromozomů nesoucí hlavní haplotyp, N hpl – celkový počet haplotypů, m rek – rychlost rekombinace, růst – odhadovaný růst populace, věk g – odhadovaný věk mutace v generacích, věk r – odhadovaný věk mutace v letech)

Této analýze byla podrobena mutace -13910\*T testovaná pro celkovou skupinu Tuaregů dohromady. Odhadovaný růst této alely je přibližně 1,19, ale je třeba brát v potaz i hodnotu intervalu spolehlivosti, který je v tabulce ohraničen maximální a minimální hodnotou (udává vlastně rozmezí), kde se daná hodnota může vyskytovat. Z analýzy nicméně vyplývá, že mutace začala expandovat přibližně před 70,6 (61,6 – 88,0) generacemi, takže za předpokladu generační doby 25 let je odhadovaný věk šíření této mutace u sahelských Tuaregů zhruba 1 765 let (1 540,6 – 2 200,4) let.

## 7. DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývá molekulárním výzkumem LP u pastevecké populace Tuaregů obývajících území severní Afriky. Předpokladem pro vznik tohoto výzkumu je fakt, že u populací Berberů, mezi které svým etnickým původem Tuaregové patří, se schopnost zachování trávení laktózy i během dospělosti vyskytuje poměrně hojně. Tuto skutečnost potvrzuje např. i studie Ranciaro et al., (2014), při níž byla mimo jiné LP potvrzena u berberské skupiny Mozabitů z Alžírsko.

### 7.1. Laktázová perzistence

LP se vyskytuje nejčastěji v severní Evropě (Enattah et al., 2002), kde byla pro její šíření vyslovena hypotéza vápníkové asimilace, která je založena na nedostatečném množství slunečního záření. Nedostatek slunečního záření vede ke snížené tvorbě vitamínu D, který řídí hladinu vápníku v krvi a jehož deficit má za následek onemocnění zvané křivice (rachitis). Ta je způsobena nedostatkem vápníku, který je absorbován ve střevním epitelu právě díky vitamínu D. Přísun mléka s vysokým obsahem vápníku tak mohl kompenzovat nedostatek toho vitamínu (Flatz and Rotthauwe, 1973).

Velkým překvapením proto bylo detekování LP u populací žijících na tak slunném místě jako je Afrika, kam hypotéza o nedostatku slunečního záření nezapadala. Cook et al-Torki, (1975) proto vytvořili novou hypotézu, která si zakládá na využití nutričních hodnot mléka v místech, která se vyznačují nedostatkem pitné vody.

V roce 2009 se Gerbault et al., pokusila tuto hypotézu ověřit tím, že analyzovala distribuci LP na různých kontinentech ve vztahu k zeměpisné šířce a stupni pastevectví. Nashromážděné údaje porovnávala pomocí počítačových simulací a velké databáze archeologických dat týkajících se domestikace domácích zvířat v Evropě. Výsledkem bylo potvrzení zvýšené frekvence LP v severozápadní Evropě a také potvrzení výše uvedené hypotézy.

Sverrisdóttir et al., (2014) testoval přirozený výběr analýzou starověké DNA (aDNA) z kosterních pozůstatků osmi neolitických Iberijců u kterých nelze očekávat nedostatek vitamínu D (vysoký sluneční svit) a tedy i vápníku. Všechny vzorky obsahovaly nemutovanou formu -13910\*C. Z výsledků studie vyplývá, že hypotéza

asimilace vápníku není sama o sobě k vysvětlení současného rozšíření LP v Evropě (alespoň v jejich jižních částech) dostačující.

Zatím nebylo uspokojivě vysvětleno ani to, proč se LP objevuje i v Africe. Zde je třeba počítat s tezí geneticko-kulturní koevoluce, která je založená na faktu, že LP se zde vyskytuje především u populací s pasteveckou historií a silnou vazbou na konzumaci mléka (Holden and Mace, 2002). Molekulárně genetické studie založené na vazebné nerovnováze přitom ukazují, že mutace odpovídající LP jsou ovlivněny pozitivní selekcí, a to jak v Eurasii, tak i v Africe (Ingram et al., 2009; Tishkoff et al., 2007).

## **7.2. Laktázová perzistence u Tuaregů**

Vzhledem k mnohaleté pastevecké historii Tuaregů (Briggs, 1960) jsem předpokládala, že se u nich v jisté míře LP projeví. Pro zhodnocení této hypotézy jsem využila celkem tři skupin Tuaregů žijících na odlišných územích afrického sahelu.

V souboru afrických Tuaregů jsem mutace zodpovědné za LP našla u 57 z 93 jedinců (61,3%), což je s ohledem na celosvětový průměr jednoznačně vyšší procento. Dalo by se tedy předpokládat, že více jak polovina Tuaregů může bez problémů trávit mléčný cukr i v dospělosti. Vzhledem k tomu, že Tuaregové jsou známí úzkou vazbou na pastevectví s vysokým podílem mléčné produkce a konzumace čerstvého mléka, potvrdila jsem tím nepřímou také tezi geneticko-kulturní ko-evoluce (Laland et al., 2010).

Vyšší výskyt LP u afrických pasteveckých skupin byl již detekován samozřejmě dříve (Mulcare et al., 2004; Tishkoff et al., 2007; Ranciaro et al., 2014; Priehodová et al., 2014), ale u Tuaregů výzkumy na molekulární úrovni dosud publikovány nebyly. Dosavadní testy týkající se LP u Tuaregů prováděl pouze Flatz et al., (1986) na souboru 118 jedinců, který pomocí dechového testu odhalil četnost LP na 87,3%, což je ještě vyšší podíl než jsem zaznamenala během své molekulárně genetické studie.

## **7.3. LP mutace u Tuaregů**

Jednoznačně nejpočetnější variantou způsobující LP v mém souboru byla -13910\*T, v nízké četnosti jsem dále detekovala i mutace -13915\*G a -13913\*C .

Zajímavým zjištěním byla právě varianta -13913\*C, která byla doposud nalezena jen ve velmi malé míře. Odhalil ji např. Jones et al., (2013), který zkoumal populace žijící

v Etiopii, kde její frekvence činila 7,5%. Vzhledem k její malé celosvětové četnosti doposud nebyly prováděny testy na fenotypové úrovni a proto asociaci s LP nelze potvrdit ani vyloučit.

Souvislost s LP má však docela jistě mutace -13915\*G. Tato mutace se vyskytuje hlavně na Arabském poloostrově (Enattah et al., 2008; Priehodová et al., 2014). Studie Priehodová et al., (2014) přispívá k hypotéze, že -13915\*G má potencionální místo původu v Arábii, přičemž její vyšší frekvence je i v jižnějších oblastech poloostrova, kde je pěstování rostlin zastoupené více než pastevectví. V Africe pozoruje Priehodová et al., (2014) -13915\*G v rekordně vysoké frekvenci (76,9%), ale jen u beduínů Rašajda ve východním Súdánu, jejichž předkové se do Afriky dostali teprve před 150 lety z Hidžázu (Young, 1996). Potvrzuje se tím tedy její vysoká frekvence na území střední Arábie (Enattah et al., 2008).

Mutace -13910\*T se v mém souboru vyskytuje zcela nejčastěji a její frekvence je 43%. S ohledem na ostatní populace afrických pastevců je frekvence této mutace vyšší. Např. u Fulbů z Mali se tato varianta vyskytuje ve frekvenci 37% (Lokki et al., 2011) a Fulbů z Kamerunu 22,9% (Ranciaro et al., 2014). U usedlých zemědělských skupin byla detekována v nižší míře, a sice v 11% u usedlých Fulbů z Kamerunu a 14% u Hausů z Nigérie (Mulcare et al., 2004). Tishkoff et al., (2007) ji ve zkoumaném souboru východní Afriky nenašla a absenci této mutace ve východní Africe potvrzuje i Mulcare et al., (2004). Byla však potvrzena i v dalších oblastech Afriky (Enattah et al., 2008; Inghram et al., 2007) mimo jiné i na jihu (Breton et al., 2014). V nezanedbatelné frekvenci se vyskytuje i v severozápadní Indii a Pákistánu (Itan et al., 2010; Gallego Romeo et al., 2012) a minoritní podíl najdeme v Arábii (Al- Abri et al. 2012; Priehodová et al., 2014). Např. v Jordánsku u beduínů byla -13910\*T nalezena ve frekvenci 6,5% (Ingram et al. 2007). Coelho et al., (2005) uvažují o možnosti, že by mutace -13910\*T mohla vzniknout nezávisle jak v Evropě, tak v Africe. Další variantou spojovanou s LP v Evropě je -22018\*A, jejíž výskyt ale koreluje s výskytem -13910\*T (Enattah et al., 2002; Inghram et al., 2009).

Tishkoff et al., (2007) našla ještě jiné tři varianty, které zvyšují transkripci v *LCT* promotoru a vznikly na odlišném haplotypovém pozadí než -13910\*T. Jednalo se o -14010\*C, -13907\*G a -13915\*G. Lokki et al., (2011) zkoumající populace Fulbů zjistil

krom varianty -13910\*T i variantu -14107\*A, -13906\*C, a stejně jako i já ve své studii, i nízkou frekvenci -13915\*G.

#### **7.4. Původ mutace -13910\*T v Africe**

Majoritní podíl mutace -13910\*T potvrdil moji druhou hypotézu popsanou v úvodu, že právě tato mutace bude u Tuaregů figurovat nejvíce. Její největší výskyt je na severu Burkiny Faso u populace z okolí Gorom-Gorom. Je zajímavé, že se jedná o tutéž skupinu, která obsahuje i nejvyšší počet haplotypů mtDNA euroasijského původu (Pereira et al., 2010) a je tedy nejméně zasažená míšením se subsaharskou populací. Na straně druhé, nejvyšší počet subsaharských mtDNA haplotypů byl nalezen u tuarežské populace z nigerského Tanutu, kde se i -13910\*T vyskytuje v nejmenším zastoupení. Tato populace obsahuje pouze 16% mtDNA haplotypů evropského původu, zbytek z nich jsou převážně původu subsaharského (Pereira et al., 2010).

Zdůvodněním tak rozdílných frekvencí -13910\*T u jednotlivých tuarežských populačních skupin může být právě rozdílný stupeň míšení s populacemi ze subsaharské Afriky. Z etnografických pramenů vyplývá, že Tuaregové (podobně jako i jiné skupiny pastevců) najímali chlapce i dívky ze sousedních populací, kteří se postupně s nimi sžili a převzali dokonce i jejich jazyk; konkrétním příkladem je také etnikum Bella, kam se řadí původně otroci z řady usedlých zemědělců, kteří byli zejména během koloniální vlády propuštěni, a kteří zakládali vlastní pastevecké skupiny (Randall, 2005).

Populace Tgor a Ttan jsou v Hardy-Weinbergerově rovnováze. Oproti tomu jsem odchylku detekovala u populace Tgos, kde byla pozorovaná heterozygotita značně nižší, než bychom očekávali. Mezi možné příčiny této odchylky může patřit např. inbreeding, populační rozdělení či možnost silné selekce. Příčinou však může být i malý populační vzorek, což se v mém případě jeví jako nejpravděpodobnější možnost.

Důležitým předpokladem pro uvedení hypotézy přítomnosti -13910\*T, byl berberský, tedy severoafrický původ Tuaregů a jejich možné kontakty s evropskou populací. Mezi další Berbery, kteří mají zachovanou schopnost štěpit mléko i během dospělosti, patří např. Mzabové z Alžírsko, u nichž byly prokázány mutace -13910\*T a -22018\*A oboje ve frekvenci 21,7% (Bersaglieri et al., 2004).

Anatomicky moderní lidé se začali před 60 000 – 70 000 lety šířit z Afriky do Eurasie (Fernandes et al., 2012), kde se jejich subpopulace postupně diferencovaly prostřednictvím sériového efektu zakladatele (Henn et al., 2012a). Z eurasijských skupin se oddělila ancestrální populace Berberů, která osídlila před více než 12 000 lety sever Afriky z Předního východu (Henn et al., 2012b), přičemž někdy v této době lze analýzou mtDNA haploskupin U5 a H1 doložit i její kontakty s populací Pyrenejského poloostrova (Achilli et al., 2005; Ennafaa et al., 2009; Ottoni et al., 2010). Na základě koalescence z mtDNA haploskupiny M1a2a pozorované v populaci sahelských Tuaregů bylo pak možné odhadnout dobu rozšíření ancestrální tuarežské populace do afrického sahelu v období před 9 000 – 3 000 lety (Pereira et al., 2010). Je otázkou, zda právě v této době se -13910\*T mohla do ancestrální populace sahelských Tuaregů dostat.

## **7.5. Datování mutací a místa vzniku**

Mutace obohacující dnešní genetickou diverzitu člověka mají různý geografický původ a dobu a způsob šíření z místa vzniku, a v současnosti tudíž různou distribuci. V Evropě se LP musela rozšířit v relativně krátkém čase, a to od počátků eneolitu, kdy lidé začali využívat i sekundární zvířecí zdroje (Sherratt, 1981). Dle novějších archeologických dokladů je užívání mléka datováno do období přibližně před 9000 lety a to v Anatolii a později i v severní Africe a Evropě (Evershed et al., 2008; Dunne et al., 2012; Salque et al., 2013).

Odhaduje se, že mutace -13910\*T, vznikla někde na území mezi střední Evropou a Balkánem před 7 500 lety (Ingram et al., 2009). Za současného stavu poznání ale nelze vyloučit, že tato mutace vznikla také v severní či severozápadní Africe nezávisle (Coelho et al., 2005). Z mého výzkumu vyplývá, že u Tuaregů došlo k šíření této alely přibližně před 1 500 – 2 000 lety, tedy mnohem později než v Evropě. Vzhledem k tomu, že v takto mladém období nejsou k dispozici doklady o kontaktech s evropskými populacemi, od nichž by mohla být tato mutace přenesena, přikláněla bych se spíše k samostatnému a nezávislému původu v Africe. Takovou hypotézu nebylo ale možné na základě mých dat potvrdit nebo vyvrátit, kolegyně Mgr. Edita Priehodová nicméně na této problematice (byť s ohledem na sahelské Fulby, u nichž se „evropská“ -13910\*T vyskytuje také) momentálně pracuje.

## 7.6. Selekční tlak

Z publikovaných analýz je patrné, že LP je v Africe pod silným selekčním tlakem (Bersaglieri et al., 2004; Tishkoff et al., 2007). Kromě zvýšení energetické bilance štěpením mléčného cukru nelze vyloučit, že konzumace většího množství mléka může jedinci zvýšit i zdatnost ve smyslu ochrany před malárií (Lokki et al., 2011). Výzkum probíhal na populacích Fulbů a Dogonů v Mali. Výsledky naznačovaly, že by parazitémie mohla být nižší u jedinců s LP. Důvody, proč jsou jedinci s LP odolnější před malárií, zatím známé nejsou. Zvažují se určité mechanismy spojené s nedostatkem regulačních T-buněk (Torda et al., 2008) a odlišné protilátky a cytokiny zodpovědné za obranné reakce (McCall et al., 2010).

Jak již bylo řečeno LP je v Africe podobně jako v Evropě pod selekčním tlakem, neboť tato mutace nejspíše životní zdatnost skutečně zvyšovala. Lidé s touto mutací mohli využívat výhody, které jim mléčná strava přinášela. Někdy je šíření mutací dáno zvýšením zdatností jedince, jindy mají na šíření mutace roli i náhodné procesy jako je např. genetický drift, který může působit proti selekci, zejména v efektivně menších populacích (Jobling et al., 2014). Výhodná mutace se může do populace dostat i genovým tokem jako tomu bylo i při bantuské migraci, která do jižní Afriky přinesla zemědělství a se svými nositeli patrně i LP. V případě sahelských Tuaregů je ale otázka původu LP dosud nezodpovězená. Věřím, že další výzkum vnese do této problematiky více světla.

## 7.7. Budoucí výzkumy

Závěrem bych chtěla zmínit několik dalších myšlenek, které mě během mé diplomové práce napadly a které by snad mohly být přínosem v dalším zkoumání genetické podstaty LP.

1. Zda má mutace -13910\*T konvergentní původ nebo zda byla z Evropy do Afriky přenesena. Výzkum by měl být založen na sledování haplotypového pozadí - pokud by byla tato mutace přenesena z Evropy do Afriky, mělo by být haplotypové pozadí podobné, pokud by měla mít v Africe konvergentní původ, haplotypové pozadí by mělo být odlišné.

2. Lokki et al., (2011) zkoumali u Fulbů, zda má LP vliv při ochraně před malárií, výsledky byly pozitivní avšak ne signifikantní. Sami píší, že pro další poznatky budou potřeba další studie. Jedinci, které zkoumal, pocházeli mimo jiné z území Burkina Faso

a Mali. Vzhledem k tomu, že Tuaregové žijí v podstatě ve stejně malaricky exponované oblasti jako Fulbové, bylo by zajímavé takovým výzkumům podrobit i je.

3. Ingram et al., (2007) při svém výzkumu objevil pět jedinců s mutací -13915\*G, kteří laktózu neštěpili, avšak 4 z nich přitom potvrdili, že při konzumaci méně než 500 ml mléka denně žádné zažívací obtíže nepozorují. Zajímavé by proto bylo zjistit, co tuto schopnost trávení mléka způsobuje i přesto, že jedinci s mutací -13915\*G nejsou LP.

## 8. ZÁVĚR

V této diplomové práci jsem se zabývala LP, tedy schopností štěpit mléčný cukr (laktózu) i během dospělosti. Pro tuto práci jsem měla k dispozici 93 vzorků Tuaregů, pocházejících ze tří skupin kočovných pastevců a to z Burkiny Faso (Tgor), Mali (Tgos) a Nigeru (Ttan). Na základě určení jednobodových změn z intronu 13 genu *MCM6*, které jsem prováděla nejprve amplifikací a následnou sekvenací jejich DNA získané z bukalních stěrů jsem zjistila, že 57 z 93 jedinců nese mutaci způsobující LP, což odpovídá frekvenci LP 61,3%. Největší zastoupení LP je v populaci Tgor a to 91,7%, Tgos má zastoupení 53,8% a Ttan pouze 32,3%. Předpoklad, týkající se přítomnosti LP u Tuaregů, byl nicméně potvrzen. Nicméně jednotlivé populace Tuaregů jsem otestovala testem homogenity a zjistila jsem významné statistické rozdíly. Pozorované a očekávané čenosti jedinců s LP a intolerantních jedinců se od sebe signifikantně lišily.

V souboru Tuaregů jsem detekovala celkem tři mutace asociované s LP: -13910\*T, -13913\*C a -13915\*T. Majoritní mutací je -13910\*T, kde frekvence mutovaných alel v celkovém souboru činí 43% a vyskytuje se u 54 jedinců z 57 laktázově perzistentních. V celkovém souboru jsem detekovala původní nemutovaný genotyp CC ve frekvenci 42%, další dva genotypy způsobující LP jsem našla ve frekvenci CT 33% a TT 25%.

Jednotlivé procentuální zastoupení mutovaných alely -13910\*T je u Tgor 63,9%, u Tgos 40,4% a u Tan 15,6%, tedy opět velmi významně odlišné frekvence. Zbylé dvě mutace se nachází ve velmi malém počtu. Mutace -13913\*C je detekována u dvou jedinců z populace Tgor a její frekvence v celkovém souboru je 2,8%. Mutace -13915\*G má zástupce pouze jednoho, též z populace Tgor a vyskytuje se ve frekvenci 1,4%. Dle výsledků lze říct, že nejvíce variabilní skupinou co se LP týče, jsou Tuaregové z Burkiny Faso.

U vybraných 47 vzorků jsem dále detekovala šest okolních SNP polymorfismů a na základě genotypových dat rekonstruovala 11 haplotypů z nichž tři nesou mutaci pro LP. Pomocí těchto dat jsem odhadla šíření mutace -13910\*T, u Tuaregů na dobu přibližně před 1 500-2 000 lety. Vzhledem k datování mutace i k tomu, že většina Tuaregů má „evropskou“ mutaci -13910\*T, by bylo dobré se dále zaměřit na to, zda jejich předkové tuto mutaci získali díky kontaktu s Evropany, nebo zda u nich tato mutace vznikla nezávisle podobně jako jiné mutace LP ve východní Africe.

## 9. SEZNAM ZKRATEK

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxyribokuleosid-5' - trifosfát
H <sub>2</sub> O	Voda
HRM	High resolution melting, neboli vysokorozlišovací analýza křivek tání
HW	Hardy-Weinbergerova rovnováha
<i>LCT</i>	gen produkující laktázu
LP	laktázová perzistence
<i>MCM6</i>	minichromozom kontrolující správný přepis komponent areálu 6
mtDNA	mitochondriální DNA
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “ polymerázová řetězová reakce
qPCR	„ <i>quantitative PCR</i> “ kvantitativní PCR
SNP	„ <i>single nucleotide polymorfism</i> “ jednonukleotidový polymorfisms
STR	„ <i>short tandem repeats</i> “ krátká tandemová repetice
Tgor	pastevecká skupina Tuaregů obývající území kolem Gorom- Gorom
Tgos	pastevecká skupina Tuaregů obývající území kolem Gossi
Ttan	pastevecká skupina Tuaregů obývající území kolem Tanut
μl	mikrolitr

## 10. LITERATURA

- Achilli A, Rengo Ch, Battaglia V, Pala M, Olivieri A, Fornarino S, Magri Ch, Scozzari R, Babudri N, Santachiara-Benerecetti AS, Bandelt HJ, Semino O, Torroni A. 2005. Saami and Berbers- An unexpected mitochondrial DNA link. *Am J Hum Genet* 76(5): 883-886.
- Al-Abri AR, Al-Rawas O, Al-Yahyaee S, Al-Habori M, Al- Zubairi AS, Bayoumi R. 2012. Distribution of the lactase persistence-associated variant alleles -13910\*T and -13915\*G among the people of Oman and Yemen. *Hum Biol* 84(3): 271–286.
- Alberts B, Bray D, Johson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1998. *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*. New York. Garland Publishing. 740p.
- Anderson B, Vullo C. 1994. Did malaria select for primary adult lactase deficiency? *Gut* 35(10): 1487-1489.
- Anderson BB, Scattoni M, Perry GM, Galvan P, Giuberti M, Buonocore G, Vullo C. 1994. Is the flavin-deficient red blood cell common in Maremma, Italy, an important defense against malaria in this area? *Am J Hum Genet* 55(5): 975-980.
- Anonym. 2003. Tuaregs. [online]. Dostupné z: [http://tuaregs.free.fr/tuareg\\_e/accueil\\_ns.htm](http://tuaregs.free.fr/tuareg_e/accueil_ns.htm) [citováno 21-11- 2014].
- Anonym. 2008. Securing pastoralism in east and west Africa: Protecting and promoting livestock mobility. [online]. Dostupné z : <http://www.sahel.org.uk/documents/SecuringPastoralismsummarysheet.pdf> [citováno 31-1-2015].
- Austerlitz F, Kalaydjieva L, Heyer E. 2003. Detecting population growth, selection and inherited fertility from haplotypic data in humans. *Genetics* 165(3): 1579-1586.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1): 37-48.
- Bártová E. 2011. Gelová elektroforéza. [online]. Dostupné z: [http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-gelova\\_elektroforeza&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz) [citováno 28-2-2015].

- Bates DG. 2004. Human adaptive strategies: ecology, culture and politics. Cambridge. Pearson. 272 p.
- Rota A, Sperandini S. 2009. Livestock and Pastoralists. [online]. Dostupné z: <http://www.ifad.org/lrkm/factsheet/pastoralists.pdf> [citováno 17-1- 2015].
- Beja-Pereira A, Luikart G, England PR, Bradley DG, Jann OC, Bertorelle G, Chamberlain AT, Nunes TP, Metodiev S, Ferrand N, Erhardt G. 2003. Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nat Genet* 35: 311-313.
- Beneš J. 1994. Člověk. Praha. Mladá Fronta. 342 p.
- Bersaglieri T, Sabeti PC, Patterson N, Vanderploeg T, Schaffner SF, Drake JA, Rhodes M, Reich DE, Hirschhorn JN. 2004. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *Am J Hum Genet* 74(6): 1111-1120.
- Blench R. 2006. Archeology, Language, and the African Past. AltaMira Press. 361 p.
- Bouchette F, Schuster M, Ghiennie JF, Denamiel C, Roquin C, Moussa A, Marsaleix P, Durringer P. 2010. Hydrodynamics in holocene lake Mega-Chad. *Quaternary Research* 73(2): 226-236.
- Brett M, Fentress E. 1997. The Berbers: The people of Africa. Oxford. Wiley-Blackwell. 372 p.
- Breton G, Schlebusch CM, Lombard M, Sjödin P, Soodyall H, Jakobsson M. 2014. Lactase persistence alleles reveal partial East African ancestry of southern African Khoe pastoralist. *Curr Biol* 24(8): 852-858.
- Briggs LC. 1960. Tribes of the Sahara. Cambridge. Harvard University Press. 293p.
- Brito JC, Martínez-Freiría F, Sierra P, Sillero N, Tarroso P. 2011. Crocodiles in the Sahara desert: an update of distribution, habitats and population status for conservation planning in Mauritania. *PLoS One* 6(2): e14734.
- Brooks N. 2006. Climate change, drought and pastoralism in the Sahel. [online]. Dostupné z: [http://cmsdata.iucn.org/downloads/e\\_conference\\_discussion\\_note\\_for\\_the\\_world\\_initiative\\_on\\_sustainable\\_pastoralism.pdf](http://cmsdata.iucn.org/downloads/e_conference_discussion_note_for_the_world_initiative_on_sustainable_pastoralism.pdf) [citováno 16-1-2015].

- Burger J, Kirchner M, Bramanti B, Haak W, Thomas MG. 2006. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *PNAS* 104(10): 3736-3741.
- Coelho M, Luiselli D, Bertorelle G, Lopes AI, Seixas S, Destro-Bisol G, Rocha J. 2005. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Hum Genet* 117(4): 329-339.
- Coelho M, Sequeir F, Luiselli D, Beleza S, Rocha J. 2009. On the edge of Bantu expansion: mtDNA, Y chromosome and lactase persistence genetic variation in southwestern Angola. *BMC Evolutionary Biology* 9: 80.
- Connah G. 2001. African civilizations: an archaeological perspective. Cambridge. Cambridge University Press. 358 p.
- Cook GC, al-Torki MT. 1975. High intestinal lactase concentrations in adult Arabs in Saudi Arabia. *Br Med J* 3(5976): 135–136.
- Cook GC. 1978. Did persistence of intestinal lactase into adult life originate on the Arabian Peninsula?. *Man* 13(3): 418-427.
- Coulson D, Campbell A. 2013. Rock Art of the Tassili n Ajjer, Algeria. [Online] Dostupné z: <http://africanrockart.org/wp-content/uploads/2013/11/Coulson-article-A10-proof.pdf> [citováno 1-3-2016].
- Černý V. 2006. Lidé od Čadského jezera. Praha. Academia. 240 p.
- Černý V, Pereira L, Musilová L, Kujanová M, Vašíková A, Blasi P, Garofalo L, Soares, Diallo I, Brdička R, Novelletto. 2011. Genetic structure of pastoral and farmer populations in the African Sahel. *Mol Biol Evol* 28(9): 2491-2500.
- Danubio ME, Martorella D, Rufo F, Vecchi E, Sanna E. 2011. Morphometric distances among five ethnic groups and evaluation of the secular trend in historical Libya. *J Anthropol Sci* 89: 127-138.
- de Filippo C, Bostoen K, Stoneking M, Pakendorf B. 2012. Bringing together linguistic and genetic evidence to test the Bantu expansion. *Proc Biol Sci* 279(1741): 3256-3263.
- Diamond J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418: 700-707.

- Diamond J, Bellwood P. 2003. Farmers and their languages: the first expansions. *Science* 300(5619): 597–603.
- Drake NA, Blench RM, Armitage SJ, Bristow ChS, White KH. 2011. Ancient watercourses and biogeography of the Sahara explain the peopling of the desert. *PNAS* 108(2): 458-462.
- Driscoll CA, McDonald DW, O'Brien SJ. 2009. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *PNAS* 106: 9971-9978.
- Dunne J, Evershed RP, Salque M, Cramp L, Bruni S, Ryan K, Biagetti S, di Lernia S. 2012. First dairying in green Saharan Africa in the fifth millennium BC. *Nature* 486: 390-394.
- Dutta P. 1991. Enhanced uptake and metabolism of riboflavin in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *J Protozool* 38(5): 479-483.
- Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I. 2002. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 30(2): 233-237.
- Enattah NS, Jensen TG, Nielsen M, Lewinski R, Kuokkanen M, Rasinpera H, El-Shanti H, Seo JK, Alifrangis M, Khalil IF, Natah A, Ali A, Natah S, Comas D, Mehdi SQ, Groop L, Vestergaard EM, Imtiaz F, Rashed MS, Meyer B, Troelsen J, Peltonen L. 2008. Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to milk culture. *Am J Hum Genet* 82(1): 57-72.
- Ennafaa H, Cabrera VM, Abu-Amero KK, González AM, Amor MB, Bouhaha R, Dzimir N, Elgaaied AB, Larruga JM. 2009. Mitochondrial DNA haplogroup H structure in North Africa. *BMC Genetics* 10: 8.
- Lewis MP, Simons GF, Fennig ChD. 2016. *Ethnologue: Languages of the World*, Nineteenth edition. Dallas, Texas: SIL International.
- Evershed RP, Payne S, Sherratt AG, Copley MS, Coolidge J, Urem-Kotsu D, Kotsakis K, Özdoğan M, Özdoğan AE, Nieuwenhuys O, Akkermans PMMG, Bailey D, Andeescu RR, Campbell S, Faris S, Hodder I, Yalman N, Özbasaran M, Bicaşci E,

- Garfinkel Y, Levy T, Burton MM. 2008. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature* 455(7212): 528-531.
- Fang L, Ahn JK, Wodziak D, Sibley E. 2012. The human lactase persistence-associated SNP -13910\*T enables in vivo functional persistence of lactase promoter-reporter transgene expression. *Hum Genet* 131(7): 1153-1159.
- Flatz G, Rotthauwe HW. 1973. Lactose nutrition and natural selection. *Lancet* 2(7820): 76-77.
- Flatz G, Schildge C, Sekou H. 1986. Distribution of adult lactase phenotypes in the Tuareg of Niger. *Am J Hum Genet* 38(4): 515-519.
- Flegr J. 2009. *Evoluční biologie*. Praha. Academia. 572 p.
- Fojík P, Falt P, Urban O, Novosad P, Richterová L, Bóday A. 2013. Laktózová Intolerance. *Practicus* 5: 7-12.
- Gallego Romero I, Bassu Mallick C, Liebert A, Crivellaro F, Chaubey G, Itan Y, Metspalu M, Eaaswarkhanth M, Pitchappan R, Villems R, Reich D, Singh L, Thangaraj K, Thomas MG, Swallow DM, Mirazón Lahr M, Kivisild T. 2012. Herders of Indian and European cattle share their predominant allele for lactase persistence. *Mol Biol Evol* 29(1): 249-260.
- Gasse F. 2000. Hydrological changes in the African tropics since the last glacial maximum. *Quaternary Science Reviews* 19(1-5): 189-211.
- Gerbault P, Moret C, Currat M, Sanchez-Mazas A. 2009. Impact of selection and demography on the diffusion of lactase persistence. *PLoS ONE* 4(7): e6369.
- Gifford-Gonzalez D, Hanotte O. 2011. Domesticating animals in Africa: implications of genetic and archaeological findings. *J World Prehist* 22(1): 1-23.
- González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimic Agents* 33(4): 301.
- Grand RJ, Motgomery RK, Chitkara DK, Hirschorn JN. Changing genes; losing lactase. [Online] Dostupné z: <http://gut.bmj.com/content/52/5/619.full.pdf> [citováno 14-7-2015].
- Gwin P. 2011. Ztracení vládci Sahary. *National Geographic* 9.

- Henn BM, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. 2012. The great human expansion. *Proc Natl Acad USA* 109(44): 17758-17764.
- Henn BM, Botigué LR, Gravel S, Wang W, Brisbin A, Byrnes JK, Fadhlouli-Zid K, Zalloua PA, Moreno-Estrada A, Bertranpetit J, Bustamante CD, Comas D. 2012. Genomic ancestry of north Africans supports back-to-Africa migrations. *PLoS Genet* 8(1): e1002397.
- Heyer E, Brazier L, Séquere L, Hegay T, Austerlitz F, Quintana-Murci L, Georges M, Pasquet P, Veuille M. 2011. Lactase persistence in central Asia: phenotype, genotype, and evolution. *Hum Biol* 83(3): 379-392.
- Hoffman TN. Archaeology and ethnohistory of the african iron age. *Annual Review of Anthropology* 11: 133-150.
- Holden C, Mace R. 1997. Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. *Hum Biol* 69(5): 605-628.
- Hollox EJ, Poulter M, Wang Y, Krause A, Swallow DM. 1999. Common polymorphism in a highly variable region upstream of the human lactase gene affects DNA-protein interactions. *Eur J Hum Genet* 7(7): 791-800.
- Homewood K. 2008. Ecology of African pastoralist societies. Ohio. Unisa Press. 320p.
- Ingram CJ, Elamin MF, Mulcare CA, Weale ME, Tarekegn A, Raga TO, Bekele E, Elamin FM, Thomas MG, Bradman N, Swallow DM. 2007. A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: multiple causes for lactase persistence? *Hum Genet* 120(6): 779-788.
- Ingram CJ, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM. 2009. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Hum Genet* 124(6): 579-591.
- Itan Y, Powell A, Beaumont MA, Burger J, Thomas MG. 2009. The origins of lactase persistence in Europe. *PLoS Comput Biol* 5(8): e1000491.
- Itan Y, Jones BL, Ingram CJ, Swallow DM, Thomas MG. 2010. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC Evolutionary Biology* 10: 36.
- Jensen TG, Liebert A, Lewinsky R., Swallow, D. M., Olsen, J, Troelsen JT. 2011. The -13910\*T variant associated with lactase persistence is located between an Oct-1 and

- HNF1 alpha binding site and increases lactase promoter activity. *Hum Genet.* 130(4): 483-493.
- Jiroušková J. 2007. Dějiny odívání. Severní Afrika. Praha. Nakladatelství Lidové noviny. 168 p.
- Jobling MA, Hollox E, Hurles M, Kivisild T, Tyler-Smith Ch. 2014. *Human Evolutionary Genetics* (second edition). United Kingdom. Garland Publishing. 670 p.
- Jones BL, Raga TO, Liebert A, Zmarz P, Bekele E, Danielsen ET, Olsen AK, Bradman N, Troelsen JT, Swallow DM. 2013. Diversity of lactase persistence alleles in Ethiopia: signature of a soft selective sweep. *Am J Hum Genet* 93(3): 538–544.
- Kindermann K, Bubbenzer O, Nussbaum S, Riemer H, Darius F, Pollah N, Smettan U. 2006. Palaeoenvironment and holocene land use of Djara, western desert of Egypt. *Quaternary Science Reviews* 25(13-14): 1619-1637.
- Krätli S. 2001. Education Provision to Nomadic Pastoralis. [online]. Dostupné z: <https://www.ids.ac.uk/files/Wp126.pdf> [citováno 1-3-2015].
- Kratochvílová R. 2010. Kam vedou cesty Tuaregů. [online]. Dostupné z: <http://www.lideazeme.cz/clanek/kam-vedou-cesty-tuaregu> [citováno 3-2-2014].
- Krejčí KA. 1960. Objevení Sahary. Praha. Naše vojsko. 92p.
- Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A, Savilahti E, Orpana A, Järvelä I. 2003. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut* 52(5): 647-652.
- Laland KN, Odling-Smee J, Myles S. 2010. How culture shaped the human genome: bringing genetics and the human sciences together. *Nature Reviews Genetics* 11: 137-148.
- Lee JK, Hurwitz J. 2001. Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(1): 54-59.
- Lhote H. 1962. Objev v Tasíli. Praha. Mladá fronta. 207 p.

- Li S, Schlebusch C, Jakobsson M. 2014. Genetic variation reveals large-scale population expansion and migration during the expansion of Bantu-speaking peoples. *Proc Biol Sci* 281(1793): 20141448.
- Linseele V. 2010. Did specialized pastoralism develop differently in Africa than in the Near East? An example from the West Africa Sahel. *J World Prehist* 23(2): 43-77.
- Loftus RT, MacHugh DE, Bradles DG, Sharp PM, Cunningham P. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(7): 2757-2761.
- Lokki AI, Järvelä I, Israelsson E, Maiga B, Troye-Blomberg M, Dolo A, Doumbo OK, Meri S, Holmberg V. 2011. Lactase persistence genotypes and malaria susceptibility in Fulani of Mali. *Malaria Journal* 10: 9.
- Lomer MC, Parkes GC, Sanderson JD. 2008. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther* 27(2): 93-103.
- Lukášová J. 1999. Hygiena a technologie produkce mléka. Brno. Veterinární a farmaceutická univerzita. Fakulty hygieny. 101 p.
- Malville, Wendorf F, Mazar, Schild. 1988. Late Neolithic structures at Nabta Playa (Sahara), southwestern Egypt. *Nature* 292: 488-491.
- Mattar R, do Socorro Monteiro M, da Silva JMK, Carrilho FJ. 2010. LCT-22018G>A single nucleotide polymorphism is a better predictor of adult-type hypolactasia/lactase persistence in Japanese-Brazilians than LCT-13910C>T. *Clinics*. 65(12): 1399-1400.
- McCall MB, Hopman J, Daou M, Maiga B, Dara V, Ploemen I, Nganou-Makamdop K, Niangaly A, Tolo Y, Arama C, Bousema JT, van der Meer JW, van der Ven AJ, Troye-Blomberg M, Dolo A, Doumbo OK, Sauerwein RW. 2010. Early interferon-gamma response against *Plasmodium falciparum* correlates with interethnic differences in susceptibility to parasitemia between sympatric Fulani and Dogon in Mali. *J Infect Dis* 201(1): 142-152.
- McCracken RD. 1971. Lactase deficiency: an example of dietary evolution. *Current Anthropology* 12(4/5): 479-517.

- Montalto M, Curigliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R, Gasbarrini A, Gasbarrini G. 2006. Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol* 12(2): 187-191.
- Mulcare CA, Weale ME, Jones AL, Connell B, Zeitlyn D, Tarekegn A, Swallow DM, Brandman N, Thomas MG. 2004. The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *Am J Hum Genet* 74(6): 1102-1110.
- Myles S, Bouzekri N, Haverfield E, Cherkaoui M, Dougoujon JM, Ward R. Genetic evidence in support of a shared Euroasian-North African dairying origin. 2005. *Hum Genet* 117(1): 34-42.
- Nicholson MJL. 1984. Pastoralism and milk production. [online]. Dostupné z: [https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/4589/Pastoralism\\_and\\_milk\\_20.pdf?sequence=1](https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/4589/Pastoralism_and_milk_20.pdf?sequence=1). [citováno 10-11-2014].
- Nicoll K. 2001. Radiocarbon chronologies for prehistoric human occupation and hydroclimatic change in Egypt and Northern Sudan. *Geoarcheology* 16(1): 47-64.
- Otoni C, Primativo G, Hooshar Kashani B, Achilli A, Martínez-Labarga C, Biondi G, Torroni A, Rickards O. 2010. Mitochondrial haplogroup H1 in North Africa: an early holocene arrival from Iberia. *PLoS One* 5(10): e13378.
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and reaserch- an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539.
- Pedersen J, Benjaminsen TA. 2008. One leg or two? Food security and pastoralism in the Northern Sahel. *Hum Ecol* 36(1): 43-57.
- Pereira L, Černý V, Cerezo M, Silva NM, Hájek M, Vašíková A, Kujanová M, Brdička R, Salas A. 2010. Linking the sub-Saharan and West Eurasian gene pools: maternal and paternal heritage of the Tuareg nomads from the African Sahel. *Eur J Hum Genet* 18(8): 915-923.
- Plantinga TS, Alonso S, Izagirre N, Hervella M, Fregel R, van der Meer JW, Netea MG, de la Rúa C. 2012. Low prevalence of lactase persistence in Neolithic Sout-West Europe. *Eur J Hum Genet* 20(7): 778-782.

- Priehodová E, Abdelsawy A, Heyer E, Černý V. 2014. Lactase persistence variants in Arabia and in the african Arabs. *Hum Biol* 86(1): 7-18.
- Ranciaro A, Campbell MC, Hirbo JB, Ko W, Froment A, Anagnostou P, Kotze MJ, Ibrahim M, Nyambo T, Omar SA, Tishkoff SA. 2014. Genetic origins of lactase persistence and the spread of pastoralism in Africa. *Am J Hum Genet* 94(4): 496-510.
- Randall S. 2005. The demographic consequences of conflict, exile and repatriation: a case Study od Malian Tuareg. *European Journal of Population* 21: 291-320.
- Reid RJ. 2012. A history of modern Africa: 1800 to the present. New York. John Wiley and Sons. 386 p.
- Ridefelt P, Håkansson LD. 2005. Lactose intolerance: lactose tolerance test versus genotyping. *Scand J Gastroenterol* 40(7): 822-826.
- Richerson PJ, Vila BJ, Mulder MB. 2001. Principles of Human Ecology. [online]. Dostupné z: <http://www.des.ucdavis.edu/faculty/Richerson/BooksOnline/101text.htm>. [citováno 10-12-2014].
- Rota A, Sperandini S. 2009. Livestock and pastoralists. Livestock thematic papers, tools for project design. [online]. Dostupné z: <http://www.ifad.org/lrkm/factsheet/pastoralists.pdf>. [citováno 21.1.2015].
- Sajantila A. 2014. Editor's pick: milk sugar, migration and pastoralism in Africa. *Investigative Genetics* 5: 5.
- Salque M, Bogucki PI, Pyzel J, Sobkowiak-Tabaka I, Grygiel R, Szmyt M, Evershed RP. 2013. Earliest evidence for cheese making sixth millennium BC in northern Europe. *Nature* 493(7433): 522-525.
- Scholte EJ, Njiru BN, Smallegange RC, Takken W, Knols BGJ. 2003. Infection of malaria (*Anopheless gambiae s. s.*) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal* 2: 29.
- Scrimshaw N, Murray EB. 1988. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 48(4): 1079–1159.

- Sherratt A. 1981. Plough and pastoralism: aspects of the secondary products revolution, in the pattern of the past. Cambridge. Cambridge University Press. 261-305 p.
- Schlebusch CM, Skoglund P, Sjödin P, Gattepaille LM, Hernandez D, Jay F, Li S, De Jongh M, Singleton A, Blum MGB, Soodyall H, Jakobsson M. 2012. Genomic variation in seven Khoe-San groups reveals adaptation and complex African history. *Science* 338(6105): 374–379.
- Schwartz HJ. 1993. Pastoral production systems in the dry lowlands of Eastern Africa.
- Simoons FJ. 1969. Primary adult lactose intolerance and the milking habit: a problem in biological and cultural interrelations. I. Review of the medical research. *Am J Dig Dis* 14(12): 819–836.
- Simoons FJ. 1970. Primary adult lactose intolerance and the milking habit: A problem in biological and cultural interrelations. II. A culture historical hypothesis. *Am J Dig Dis* 15(8):695-710.
- Smith JM, Haigh J. 1974. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet Res* 23(1): 23-35.
- Smith AB. 2005. African Herders: Emergence of Pastoral Traditions. AltaMira Press. 251 p.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. 2004. Documentation for PHASE, version 2.1. [online]. Dostupné z: <http://stephenslab.uchicago.edu/instruct2.1.pdf> [citováno 17-7-2015].
- Sverrisdóttir OO, Timpson A, Toombs J, Lecoeur C, Froguel P, Carretero JM, Ferreras JLA, Götherström A, Thomas MG. 2014. Direct estimates of natural selection in Iberia indicate calcium absorption was not the only driver of lactase persistence in Europe. *Mol Biol Evol* 31(4): 975-83.
- Swallow DM. 2003. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 37: 197-219.
- Swezey C. 2001. Eolian sediment responses to late Quaternary climate changes: Temporal and spatial patterns in the Sahara. *Paleoclimatology, Paleoclimatology, Palaeoecology* 167(1-2): 119-155.
- Šerý M. 2014. Regionální Geografie Afriky. Univerzita Palackého v Olomouci. 83 p.

- Šmarda J, Dostál J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J. 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno. Masarykova univerzita. 188 p.
- Šťastná S. 2008. *Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice*. Praha. Ústav dědičných metabolických poruch VFN v Praze. 50 p.
- Tellam R. 2012. How dairying shaped the human genome. *SPLASH! Milk science*.
- Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Babbitt CC, Silverman JS, Powell K, Mortensen HM, Hirbo JB, Osman M, Ibrahim M, Omar SA, Lema G, Nyambo TB, Ghorri J, Bumpstead S, Pritchard JK, Wray GA, Deloukas P. 2007. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat Genet* 39(1): 31–40.
- Tishkoff SA, Reed FA, Friedlaender FR, Ehret Ch, Ranciaro A, Froment A, Hirbo JB, Awomoyi AA, Bodo JM, Doumbo O, Ibrahim M, Juma AT, Kotze MJ, Lema G, Moore JH, Mortensen H, Nyambo TB, Omar SA, Powell K, Pretorius GS, Smith MW, Thera MA, Wambebe Ch, Weber JL, Williams SM. 2009. The genetic structure and history of Africans and African Americans. *Science* 324(5930): 1035–1044.
- Torcia MG, Santarlasci V, Cosmi L, Clemente A, Maggi L, Mangano VD, Verra F, Bancone G, Nebie I, Sirima BS, Liotta F, Frosali F, Angeli R, Severini C, Sannella AR, Bonini P, Lucibello M, Maggi E, Garaci E, Coluzzi M, Cozzolino F, Annunziato F, Romagnani S, Modiano D. 2008. Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(2): 646-651.
- Torniaainen S, Parker MI, Holmberg V, Lahtela E, Dandara C, Jarvela I. 2009. Screening of variants for lactase persistence/ non-persistence in populations from South Africa and Ghana. *BMC Genetics* 10: 31.
- Unep. Africa Atlas of Our Changing Environment. [online] Dostupné z: <http://www.unep.org/dewa/Africa/AfricaAtlas/PDF/en/Chapter1.pdf> [online 22-2-2015].
- Vesa TH, Marteau P, Korpela R. 2000. Lactose Intolerance. *Journal of the American College of Nutrition* 19(2): 165-175.
- Vigne JD. 2011. The origins of animal domestication and husbandry: a major change in the history of humanity at the biosphere. *C R Biol* 334(3): 171-181.

Votrubec C. 1973. Afrika. Zeměpisný přehled kontinentu a jeho oblastně ekonomické problémy. Praha. Státní pedagogické nakladatelství. 593 p.

Xu L, Sun H, Zhang X, Wang J, Sun D, Chen F, Bai J, Fu S. 2010. The -22018A allele matches the lactase persistence phenotype in northern Chinese populations. *Scand J Gastroenterol* 45(2): 168-174.

Záhořík Jan. 2006. Etnologie Afriky. Západočeská univerzita v Plzni.

## 11. PŘÍLOHY

### 11.1. Postup izolace

1. Pustit inkubační box.
2. Vortexovat 1 minutu.
3. Odsát 100  $\mu$ l a přenést do sterilní mikrozkušavky (1.5-2.0 ml).
4. Přidat 500 $\mu$ l extrakčního pufru PB a zvortexovat.
5. Inkubovat při teplotě 60°C 1 hodinu s mícháním (cca 200 otáček) a poté stočit (1 minuta, 12 000 g).
6. Supernatant přenést na 2x do kolonky a stočit (1.5 minuty, 12 000 g).
7. Přidat 200  $\mu$ l extrakčního pufru PB a stočit (1.5 minuty, 12 000 g).
8. Přidat 800  $\mu$ l proplachovacího pufru PE s etanolem a stočit (1.5 minuty, 12 000g).
9. Vylít kolonku, osušit okraje, stočit (3 minuty, 12 000 g) a nechat v boxu v průvanu
10. Vyměnit epp, přidat 40  $\mu$ l EB pufru, inkubovat 5 minut a stočit (1.5 minuty, 12 000g).

Vyhodit kolonku a epp s DNA vložit do mrazáku.

### 11.2. Příprava agarózového gelu

1. V Erlenmayerově bance připravíme roztok gelu smícháním 0,6 g práškové agarózy, 12g BE pufru a 60g destilované H<sub>2</sub>O
2. Roztok přivedeme k varu a necháme ho vařit, dokud se agaróza zcela nerozpustí.
3. Do roztoku přidáme barviva 3 $\mu$ l GelRed, který umožní vizualizaci DNA pod UV světlem. Poté necháme roztok vychladnout.
4. Připravíme si vaničku na gelovou elektroforézu, do které upevníme hřebeny, a vylijeme tam připravený roztok. Necháme tuhnout minimálně 30 minut.

### 11.3. Seznam použitých vzorků

POPULACE	ČÍSLO	POHLAVÍ	VĚK	POPULACE	ČÍSLO	POHLAVÍ	VĚK
TGOR	101	M	60	TTAN	130	F	20
TGOR	102	M	75	TTAN	131	M	52
TGOR	103	M	50	TTAN	132	M	40
TGOR	104	M	50	TTAN	133	M	42
TGOR	105	M	30	TTAN	134	M	50
TGOR	106	F	60	TTAN	135	M	45
TGOR	107	F	40	TTAN	136	M	45
TGOR	108	F	40	TTAN	137	M	47
TGOR	109	F	20	TTAN	138	M	35
TGOR	110	F	45	TTAN	139	M	23
TGOR	111	F	25	TTAN	140	F	45
TGOR	112	F	40	TTAN	141	M	40
TGOR	113	F	55	TTAN	142	F	45
TGOR	114	F	27	TTAN	143	F	25
TGOR	115	M	65	TTAN	144	F	30
TGOR	116	M	23	TTAN	145	M	43
TGOR	117	F	20	TTAN	146	M	35
TGOR	118	F	35	TTAN	147	F	30
TGOR	119	M	55	TTAN	148	F	40
TGOR	120	M	40	TTAN	149	F	24
TGOR	121	M	44	TTAN	150	F	40
TGOR	122	M	55	TGOS	82	F	20
TGOR	123	F	27	TGOS	83	M	65
TGOR	124	F	49	TGOS	84	F	30
TGOR	125	F	15	TGOS	85	F	23
TGOR	126	F	48	TGOS	86	F	26
TGOR	127	F	30	TGOS	87	F	24
TGOR	128	M	38	TGOS	88	F	19
TGOR	129	M	25	TGOS	89	M	16
TGOR	130	M	29	TGOS	90	M	17
TGOR	131	M	63	TGOS	91	M	15
TGOR	132	F	17	TGOS	92	M	15
TGOR	133	F	18	TGOS	93	M	15
TGOR	134	F	30	TGOS	94	F	15
TGOR	135	F	33	TGOS	95	F	18
TGOR	136	M	46	TGOS	96	M	16
TGOR	137	M	50	TGOS	97	M	16
TGOR	138	M	22	TGOS	98	M	16
TTAN	120	M	30	TGOS	99	M	15
TTAN	121	F	30	TGOS	100	M	15
TTAN	122	F	43	TGOS	101	F	16
TTAN	123	M	40	TGOS	102	F	15
TTAN	124	M	50	TGOS	103	x	x
TTAN	125	M	40	TGOS	104	x	x
TTAN	126	M	50	TGOS	105	x	x
TTAN	127	M	60	TGOS	106	x	x
TTAN	128	F	25	TGOS	107	x	x
TTAN	129	F	35				

Barevně jsou zvýrazněny mnou izolované vzorky.